

**CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION
Y DESARROLLO, A. C.**

**"Efecto de la edad sobre la asimilación dietaria de proteína
de soya enzimáticamente modificada, evaluado en ratas"**

Por:

Abraham Wall Medrano

Tesis aprobada por la

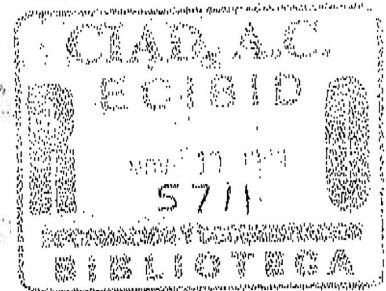
Dirección de Nutrición

Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestría en Ciencias

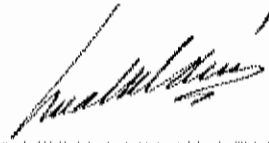
Himnosillo, Sonora

Septiembre de 1999



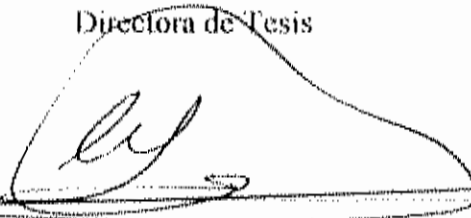
APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Abraham Wall Medrano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.




Dra. Ana Maria Calderón de la Barca C.

Directora de Tesis



Dr. Mauro E. Valencia Juillerat

Asesor



Dra. Gloria M. Yepiz Plascencia

Asesor



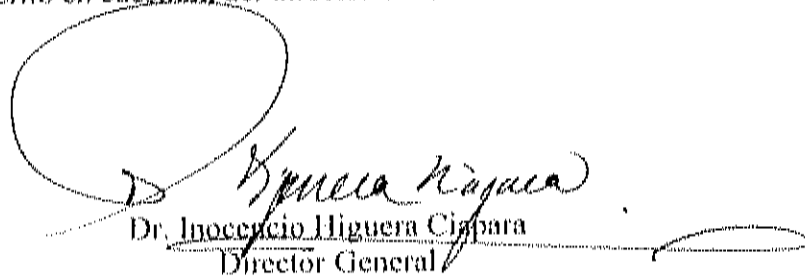
Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Inocencio Higuera Cijpara
Director General

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi gratitud a todos los que hicieron posible que este trabajo haya culminado con éxito. Primeramente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por el apoyo económico y académico brindado hasta el momento. A la planta de maestros y de apoyo técnico del CIAD por toda su ayuda y comprensión. Gracias Ana María, por tu asesoría y apoyo como maestra y amiga y por ofrecerme la oportunidad de ser alguien en tu equipo. A mi familia por ayudarme a ser consistente en mi carrera. A mis asesores, Dra. Gloria Yepiz, Dr. Mauro Valencia y Dr. Francisco Goycoolea por su aporte y participación en el enriquecimiento de este trabajo. Y, por último, a todos mis compañeros, "Güero" Vázquez, Rene, Adriana, Graciela, Fátima, Norma, Vero, Araceli, Martín, Emilia, así como a todos mis compañeros de generación por su amistad y "resistencia".

DEDICATORIAS

*“ A los hombres, a las mujeres
que aguardan vivir sin soledad,
al espeso camaleón callado como el agua,
al aire arisco (es el aire un pájaro atrapado),
a los que duermen mientras sostengo mi vigilia,
a la mujer sentada en la plaza vendiendo su silencio.*

*En fin, diciendo cosas tan reales
es una lengua unánime, amorosa;
a los niños que sueñan en las frutas
y a los que cantan canciones sin palabras en las noches
compartiendo la muerte con la muerte,
los invito a la vida
como un muchacho que ofrece una manzana
me doy fuego
para que pasen bien estos días de invierno...”*

*Donde solo se habla de amor
Juan Bafuelos*

y sobre todo para ustedes

Dr. Tetsuya Ogura Fujii, Dra. Yolanda Sanchez de González, Dra. Ana María Calderón de la Barca y Dr. Nelson Almeida por ser responsables de mis ganas por hacer ciencia, el orgullo de ser y poder seguir adelante. A ti Arturo, por apoyarme durante todo este tiempo. Al “menono” y a todos mis sobrinos por significar mucho más que eso.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Productos para Nutrición Especial: El Mercado en México	4
La Modificación Funcional y Nutricional de Proteínas Dietarias	7
Aspectos Relevantes sobre Hidrólisis y Síntesis Enzimática	8
Tres Generaciones de Productos de Soya	11
Calidad Nutricional de Proteínas Modificadas	14
Edad y Utilización Dietaria de Proteínas	17
Senectud Fisiológica y Funcional del Tracto Digestivo	18
Cambios en el Metabolismo de Proteínas Relacionados con la Edad	24
MATERIALES Y METODOS	27
Reactivos	27
Obtención de Fuentes Proteicas.....	28
Acondicionamiento y Caracterización Parcial de la Materia Prima	28
Hidrólisis Enzimática	28
Síntesis Covalente de Metionina al Hidrolizado	30

	Página
Ultrafiltración (UF) Fraccionada	30
Análisis Proximal	31
Factores Antifisiológicos	32
Preparación de Proteínas de Referencia	33
Bioensayos	33
Animales	33
Dietas	35
Análisis de Muestras Biológicas y Determinación de Indicadores	37
Indicadores de Calidad Proteica	37
Respuesta Post-Prandial de Aminoácidos Plasmáticos y Urea	37
Digestibilidad Aparente Ileal-Yeyunal y Fecal	38
Aminogramas	39
RESULTADOS Y DISCUSION	43
Obtención de las Fuentes Proteicas	43
Hidrólisis de la Materia Prima	43
Síntesis Enzimática	46
Ultrafiltración Fraccionada (UF)	49
Factores Antifisiológicos en la Fracción de Interés	50
Evaluación de la Calidad de Proteína	51
Registros de Bioensayos	55
Indicadores Biológicos	56

	Página
Respuesta Post-Prandial de Aminoácidos Plasmáticos y Urea	61
Urea Plasmática	64
Aminoácidos Básicos y Ácidos	65
Aminoácidos Esenciales y No Esenciales	66
Metionina	67
Glicina y Glutamina	68
Digestibilidad Aparente Ileal-Yeyunal y fecal	70
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFIA	79

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.	Algunos productos para nutrición especial distribuidos en México:
	Fórmulas enterales e hipoalergénicos 6
2.	Composición proximal de las dietas experimentales 36
3a.	Análisis proximal de productos de soya y fracciones ultrafiltradas antes y después de enriquecimiento con metionina 44
3b.	Balance de masa (como proteína) de las fracciones antes y después de enriquecimiento, a partir de la materia prima 45
4.	Composición de aminoácidos de caseína, aislado de soya, pasta, hidrolizado y fracciones ultrafiltradas antes (F ₁₋₁₀) y después (F ₁₋₁₀ E) de la incorporación covalente de metionina (g/100g proteína) 47
5.	Evaluación de la calidad proteica de tres dietas experimentales, evaluada en ratas Sprague Dawley a distintas edades. Registros de Bioensayos 52
6.	Evaluación de la calidad proteica de tres dietas experimentales, evaluada en ratas Sprague Dawley a distintas edades: Indicadores biológicos 53
7.	Calificación química de las fuentes proteicas usadas en dietas experimen tales, basadas en los requerimientos para humano y rata albina 54
8.	Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de aminoácidos: Orden de elución, tiempos de retención y gradientes de la fase móvil 62

Tabla	Página
9. Concentración postprandial de urea y aminoácidos plasmáticos en ratas tres edades alimentadas con caseína, aislado de soya y F ₍₁₋₁₀₎ E como únicas fuentes proteicas	63
10. Digestibilidad yeyunal, ileal y fecal de aminoácidos y nitrógeno en ratas Sprague Dawley alimentadas con caseína (C), aislado de soya (A) y F ₍₁₋₁₀₎ E (FE) a tres edades distintas	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Aprovechamiento Industrial de la soya	13
2. Digestión de péptidos: Fase membranar	21
3. Mecanismo de degradación y transporte de proteínas	23
4. Intercambio de aminoácidos entre órganos	25

RESUMEN

La utilización dietaria de las proteínas depende de su perfil de aminoácidos y biodisponibilidad, por ello puede afectarse por procesos metabólicos propios de la edad. En este estudio, se enriqueció enzimáticamente proteína de soya con metionina y se evaluó su potencialidad de utilización en alimentos geriátricos e infantiles. Para ello, se diseñó un modelo con 3 grupos etarios de ratas Sprague Dawley: neonatas (Grupo 1: 21 días), adultas jóvenes (Grupo 2: 180 días) y adultas maduras (Grupo 3: 480 días). Se utilizó pasta de soya la cual fue hidrolizada, enriquecida con metionina (Met) y fraccionada por ultrafiltración (UF). La hidrólisis se realizó al 4%(p/v) con enzimas pancreáticas porcinas al 4% (p/p), 50°C, 6h y pH 8. Después de secar por aspersion, el hidrolizado resuspendido al 20% (p/v) se incubó con metil ester de Met (7.6% p/p), quimiotripsina 1% (p/p) y glicerol 3M a 37°C, 3h y pH. 7. Antes y después de enriquecimiento (E), el hidrolizado fue fraccionado por UF con membranas de 1 y 10 kDa y se analizó su composición proximal. A la fracción de 1-10 kDa enriquecida (F_{1-10E}) se le cuantificaron factores antifisiológicos y se evaluó biológicamente comparándola con aislado de soya + Met libre (Ais) y caseína ANRC (Cas), además de una dieta libre de nitrógeno. Las dietas fueron isoenergéticas al 10% (Gpo 1) y 7% (Gpo. 2 y 3) de proteína y se estimó con ellas NPU, digestibilidad (DV), Δ peso/g Proteína consumida. También se determinó postprandialmente urea y aminoácidos plasmáticos y se estimó la digestibilidad aparente (DA) ileal-yeyunal-fecal de aminoácidos y nitrógeno con Cr₂O₃. La F_{1-10E} quedó enriquecida con 4 veces más Met que su homóloga antes de síntesis (F₁₋₁₀), y sus factores antifisiológicos se redujeron en un 90%. El NPU fue mayor para Cas en todos los grupos y estadísticamente igual (p>0.05) entre Ais y F_{1-10E}. En las ratas de 21 días se observó un aumento en Δ peso/g Proteína consumida de F_{1-10E} entre los días 10 y 14, siendo este efecto inverso para Ais. La DV y calificación química corregida por esta (CQCD) para F_{1-10E} fueron mejores que las encontradas para las otras dietas suministradas a los grupos 1 y 3. El nivel plasmático de urea (en promedio) fue directamente proporcional a la edad, el perfil dietario de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) y la biodisponibilidad plasmática de estos últimos. La relación de aminoácidos esenciales: no esenciales plasmática (AAE:AANE) en todos los grupos, fue mejor para F_{1-10E}, efecto posiblemente relacionado con su patrón digestible en íleon. La DA de Met y su elevación plasmática en el Gpo. 3, fueron mejores cuando esta estuvo unida a la proteína que cuando se presentó en forma libre, independientemente de su concentración en la dieta. La adición covalente de Met a la soya y el control de tamaño de los péptidos, traen ventajas fisicoquímicas y fisiológicas para la nutrición especial. La Met covalentemente unida, más que libre mejora su digestibilidad y biodisponibilidad plasmático en un estado de balance nitrogenado. Además, se mejoran sustancialmente la calificación química, respuesta plasmática de AAE:AANE y la absorción ileal (por compensación yeyunal). Por ello, la F_{1-10E} podría ser una mejor alternativa que el aislado de soya con Met libre, en los productos enterales para ancianos.

INTRODUCCION

En los últimos años han cambiado las tendencias de producción y desarrollo de nuevos alimentos manufacturados, desde la sustitución de ingredientes para el mejoramiento de procesos tecnológicos y perfil nutricional de alimentos conocidos, hasta el diseño de productos realmente novedosos. La transición más reciente es la sustitución de productos enriquecidos (fortificación/suplementación) por alimentos formulados a base de “ingredientes ideales”. Desde el punto de vista tecnológico, esta nueva forma de producción de alimentos tiene serias implicaciones sobre todo económicas.

En la formulación de productos “ideales” basados en proteína, se debe considerar muy especialmente el perfil nutricional. La búsqueda de proteínas de bajo costo, alto valor nutricional y con características tecnológicas convenientes, ha inducido a la utilización de mezclas de proteínas de origen vegetal como las de cereales o leguminosas (Ulloa y Valencia, 1993; Obanni *et al.*, 1998). Los productos para nutrición enteral como Ensure® o Sustacal®, son algunos ejemplos de productos que contienen proteína animal (caseína) mezclada con proteína vegetal (aislado de soya). A pesar del buen valor nutricional del aislado de soya, sus características funcionales y sensoriales, composición de aminoácidos y actividad remanente de compuestos antifisiológicos, no solo ha restringido su utilización tecnológica sino ha demostrado ser inconveniente en la nutrición especial (Díaz *et al.*, 1997; Anderson y Wolf, 1995).

Los procesos de hidrólisis y síntesis enzimática, son una alternativa para la modificación de proteínas dietarias. Aunque estos procesos han sido aprovechados en la industria farmacéutica, su aplicación no ha sido muy explotada en la industria alimentaria (Jara-Marini, 1997).

Bajo condiciones estrictamente controladas es posible utilizar la actividad bidireccional de las proteasas tanto para la hidrólisis como para la síntesis peptídica (Hajós *et al.*, 1996). El proceso de hidrólisis involucra la ruptura enzimática de los enlaces peptídicos con la consecuente formación de péptidos libres. Estos últimos a su vez pueden servir de sustrato para resíntesis o bien formación de péptidos enriquecidos con aminoácidos o péptidos de otras fuentes adicionados intencionalmente (Kasche, 1990; Gouveai *et al.*, 1998). De esta manera ha sido posible generar hidrolizados de proteínas vegetales y animales con distintas proporciones y composición de péptidos. Algunos de estos productos han probado su eficacia en la terapia nutricional de enfermedades como la colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn (Schmidl *et al.*, 1994; Grimble, 1995), así como en la formulación de productos hipoalergénicos para nutrición infantil (Ruiz-Salazar, 1996).

El empleo de esta metodología enzimática sobre la proteína de soya, ha sido objeto de dos trabajos anteriores realizados en CIAD (Calderón de la Barca *et al.*, 1999a,b). En ambos se demuestran las ventajas tecnológicas y nutricionales, en condiciones de laboratorio, de distintas fracciones ultrafiltradas, que son susceptibles de incorporación en distintos alimentos especiales. En su último trabajo, reportan la buena calidad proteica de dos fracciones para mantener el balance nitrogenado de ratas en

crecimiento al compararse con caseína y un producto comercial para nutrición enteral. Además se sugiere que las fracciones menores a 10 kDa poseen características especiales para el diseño de productos como nutracéuticos o bebidas fortificadas para personas con problemas de mala absorción.

Previendo que las necesidades proteicas y estado fisiológico son distintas en infantes y personas adultas, es posible hipotetizar que el efecto de estas nuevas proteínas modificadas será distinto conforme avanza la edad.

Con el fin de demostrar la eficacia nutricional de una fracción enriquecida con metionina para el diseño de alimentos para ancianos o infantes, se diseñó el presente trabajo. En este estudiamos el efecto que tienen los cambios fisiológicos que acompañan a la edad, en la utilización dietaria de esta fracción de proteína de soya modificada. Con ello se proporciona un precedente experimental para la formulación de alimentos para nutrición especial adecuados a la edad.

ANTECEDENTES

Productos para Nutrición Especial: El Mercado en México

Cuando con los alimentos ordinarios no se satisfacen las necesidades de nutrimentos de un individuo en estado normal o patológico, o cuando existen desordenes fisiológicos de origen alimenticio (alergias) se recurre a alimentos nutritivos especiales (Taylor y Anthony, 1985). El soporte nutricional especial comprende la nutrición parenteral (nutrición clínica) y alimentación enteral (fórmulas comerciales). Esta forma de alimentación debe estar diseñada para proveer apoyo nutricional suplementario o complementario a individuos incapaces de ingerir cantidades adecuadas de alimento en estado sólido o para personas con necesidades fisiológicas y nutricionales específicas (US Congress, 1988). Su consumo puede ser por períodos cortos o como única fuente nutricional durante períodos más largos (Schmidl *et al.*, 1994).

Según la FDA, estos alimentos pueden dividirse en nutricionalmente completos, modulares, para desordenes metabólicos y soluciones de rehidratación oral (IFT, 1992). Así mismo, de acuerdo al contenido proteico se dividen en poliméricos (proteína íntacta), semielementales (hidrolizados) y elementales (aminoácidos libres). Los productos nutricionalmente completos proveen las cantidades requeridas de los distintos nutrimentos para mantener el estado nutricional adecuado de individuos que reciben sólo esta fuente nutricia (Mora, 1992).

Aquí se ubican la mayoría de las fórmulas enterales comerciales como Ensure®, Sustacal®, y algunas fórmulas hipoalergénicas para lactantes como el Pregestimil®.

Las fuentes proteicas juegan un papel muy importante en el diseño de productos enterales y fórmulas infantiles hipoalergénicas. En la Tabla 1 se enlistan algunos de los productos de importación distribuidos en México y la forma proteica utilizada para su formulación. La caseína, las proteínas de lactosuero y el aislado de soya son las principales fuentes de proteínas usadas en la formulación de estos dos tipos de productos. Su contenido porcentual de proteína varía de 8-24% (p/v), y su contenido calórico de 1-2 kcal/mL (Mora, 1992; Torres *et al.*, 1999), para proporcionar un buen valor nutricional. Sin embargo, la digestibilidad y calidad proteica de este tipo de puede verse limitada en algunos casos (Sarwar y Peace, 1994; Diaz *et al.*, 1997; Calderón de la Barca *et al.*, 1999b).

Utilizando nuevas tecnologías y procesos baratos también se han producido fórmulas con proteínas hidrolizadas. Esta tecnología actualmente solo se emplea para producir fórmulas hipoalergénicas y enterales semielementales diseñadas para nutroterapia en patologías específicas (Tabla 1). Estos productos son utilizados principalmente en nutroterapia clínica (ej. Enfermedad pulmonar) y su contenido proteínico es 2 a 3 veces mayor con contenido calórico similar al reportado en el párrafo anterior (Torres *et al.*, 1999). Sin embargo, un problema importante con estos productos es la falta de control del tamaño de los péptidos (Halken *et al.*, 1993) lo cual ocasiona respuestas alérgicas en lactantes con hipersensibilidad (Rugo *et al.*, 1992).

Por otro lado, la adquisición de estos productos resulta cara, sobre todo cuando son prescritos como única fuente de alimentos, especialmente en los países en donde estos no se fabrican.

En México actualmente, ambos tipos de productos están siendo importados a un costo demasiado elevado; por lo que los sistemas de seguridad social y los particulares tienen problemas para mantener este tipo de alimentación. El reto futuro de la industria es, por tanto, producir proteínas con las características más adecuadas y a menor costo. Esto con el fin de formular estos productos, no solo para consumo local, sino para sustituir algunos de los existentes en el mercado internacional.

La Modificación Funcional y Nutricional de Proteínas Dietarias

Desde el punto de vista nutricional, la modificación funcional de proteínas se ha vuelto una necesidad creciente para la producción de nuevos y mejores alimentos especiales. Los experimentos sobre modificación enzimática de proteínas han tenido como propósitos fundamentales el aumentar su calidad nutricia y eliminar al máximo factores antifisiológicos que de manera natural ocurren en las proteínas nativas (Jaramarini, 1997; Hajós *et al.*, 1996). Por otra parte, el desarrollo tecnológico de alimentos para nutrición enteral especial, se ha visto estimulado dado la demanda que tienen (Ziegler *et al.*, 1998; Wahn, 1995).

El tecnólogo en alimentos ha recurrido a distintos procesos para la modificación funcional de proteínas. La manipulación fisicoquímica se utiliza para conferir propiedades distintivas que mejoren el procesamiento, almacenamiento, calidad

organoléptica y eficacia biológica y nutricional de los alimentos (Mahmoud, 1994). Los métodos físicos como la extrusión mecánica, permiten cambios en el tamaño de partícula y remoción de compuestos volátiles. Con los métodos biológicos (fermentaciones) se consiguen modificaciones estructurales en las proteínas, aunque esto se consigue de manera más directa por métodos químicos y enzimáticos como modificaciones de pH, digestión, manipulación de iones y formación de complejos (Pour-El, 1981).

Aspectos Relevantes sobre Hidrólisis y Síntesis Enzimática

La ruptura de moléculas proteicas complejas a péptidos más pequeños es importante en la nutrición especial. Los péptidos se utilizan para alimentar pacientes con problemas gastrointestinales, insuficiencia pancreática y otras enfermedades (Taylor y Anthony, 1985). La hidrólisis de proteínas en alimentos se lleva a cabo por diversas razones: mejoramiento nutricional, retardo en el deterioro y búsqueda de propiedades funcionales más adecuadas de los alimentos (Mahmoud, 1994). Con la hidrólisis también se previenen interacciones indeseables y se remueven sabores, olores y factores antifisiológicos (Feeney, 1986; Lahl y Grindstaff, 1989). Así pues, la utilidad final de una proteína hidrolizada dependerá directamente del conjunto de propiedades que le hayan sido impartidas durante su producción (Jara-Marini, 1997).

La hidrólisis de proteínas puede realizarse por métodos químicos o enzimáticos. El primer método implica la degradación proteica por ácidos o álcalis, mientras que la segunda implica la degradación específica o inespecífica por enzimas proteolíticas (Puigserver, *et al.*, 1978). Esta última ha sido la más usada en la industria de alimentos

ya que produce hidrolizados con perfiles peptídicos adecuados, sin alteración evidente del perfil de aminoácidos que la componen. En cambio, la hidrólisis química puede incurrir en el deterioro de cierto tipo de aminoácidos y formación de sustancias tóxicas como la lisino-alanina (Whitaker y Feeney, 1983).

En principio, las enzimas proteolíticas poseen la capacidad de “romper” las cadenas de proteínas por escisión de sus enlaces peptídicos (Leningher, 1993), lo que trae como consecuencia la liberación de péptidos de tamaño variable aminoácidos libres. La proporción y tamaño de estos productos dependerá directamente de la especificidad y capacidad hidrolítica de la enzima, el sustrato y las condiciones físicas y bioquímicas (pH y temperatura) en que la reacción se lleve a cabo (Lahl y Grindstaff, 1989). Desde el punto de vista industrial, solo en casos muy especiales se usan sistemas enzimáticos puros para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis y se prefiere el uso de mezclas de enzimas de origen pancreático o mezclas de proteasas microbianas (Novo-Nordisk, 1995).

Por otra parte, bajo condiciones estrictamente controladas, es posible utilizar la acción bidireccional de las proteasas para inducir síntesis de péptidos (Lozano y Combes, 1992). Mientras que en las reacciones hidrolíticas se liberan péptidos de proteínas intactas, es posible revertir esta reacción *in vitro* para producir proteínas enriquecidas con aminoácidos limitantes (Arai, *et al.* 1978; Hajós *et al.*, 1996) y/o combinar péptidos de bajo y alto valor nutricional (Gouveia, *et al.*, 1998). Aunque el enriquecimiento de proteínas con aminoácidos también se puede llevar a cabo por reacciones químicas (Puigserver *et al.*, 1978; Lin-Chan y Nakai, 1980), son preferibles

los sistemas enzimáticos por las mismas razones que en el caso de productos hidrolizados.

La síntesis enzimática requiere del control en la proporción de péptidos formados por hidrólisis, exceso de aminoácidos libres de interés y baja concentración de agua (Jara Marini, 1997). La velocidad de incorporación de ésteres de α -aminoácidos depende de sus estructuras, en particular, de la cadena lateral. La especificidad de la enzima utilizada para síntesis también es fundamental. Arai y colaboradores (1978), encontraron que un 85% de la incorporación de metionina a la proteína de soya catalizada por papaina, se realiza principalmente en los carbonos terminales de los péptidos. Esto desde el punto de vista sensorial es de vital importancia ya que al haber aminoácidos de interés en exceso se podría suponer también formación de oligopéptidos (de metionina) e isopéptidos (péptidos con cadenas ramificadas) que influirán en el sabor y utilización biológica de los productos.

La funcionalidad y aplicación industrial de productos hidrolizados y/o enriquecidos no solo está determinada por la acción enzimática. Ya ha sido demostrado que las propiedades funcionales y nutricias de productos hidrolizados son dependientes del tamaño de los péptidos formados y su interacción con otros nutrientes como los azúcares (Feeney y Whitaker, 1977). Por lo tanto se hace evidente que la máxima utilidad de estos productos dependerá de la forma en que se puedan separar las distintas fracciones peptídicas. A nivel semi-industrial, se han utilizado distintos sistemas continuos y discontinuos de separación por ultrafiltración, con reconocida eficacia (Deeslie y Cheryan, 1988). Estos sistemas no solo permiten fraccionar los hidrolizados

de manera conveniente para distintos productos alimenticios, sino también permiten acoplar las reacciones enzimáticas en reactores y la remoción continua de péptidos, abaratando los costos de producción.

Por otra parte, la selección de sistemas y condiciones de secado influye directamente en el tamaño de partícula, características sensoriales e interacciones fisicoquímicas de las proteínas hidrolizadas. El método de secado comercialmente más viable y económico es el de aspersión, en el cual una solución diluida se atomiza en contra de un flujo de aire seco y caliente en una cámara donde no es necesario alcanzar temperaturas de pasteurización, e inmediatamente se enfría (Lahl y Braun, 1994). El control de temperaturas en este sistema es crítico ya que una selección errónea puede ocasionar caramelización y por ende reacciones indeseables en los nutrimentos. Estas reacciones, tales como las de Maillard (azúcares-proteínas), afectan las características fisicoquímicas y nutricionales de los productos secos (Labuza *et al.*, 1977).

Tres Generaciones de Productos de Soya

La utilización de la soya en alimentos asiáticos, ha impulsado el desarrollo tecnológico de nuevos productos en países occidentales. La proteína de soya (definición genérica que se le da a los distintos componentes proteicos, en su mayoría globulinas) presenta un valor biológico (VB) de 62.5% comparable al 73% encontrado para caseína. Su digestibilidad es de 90% comparada a 99% de caseína, 98% de la proteína de huevo y 93% para trigo. Su valor nutricional ha propiciado que esta proteína sea incluida en distintos sistemas alimenticios tradicionales y especiales (Liu, 1997).

Miles de años antes de la introducción de la soya a países occidentales, ésta era cultivada en China. Es precisamente en los países orientales donde nacen lo que ahora conocemos como la primera generación de productos de soya. La soya en forma natural o procesada por medio de procesos sencillos de extrusión, precipitación salina, tostado y/o cocción, permitió desarrollar los primeros productos fermentados y no fermentados. Como ejemplos de estos productos se encuentran la leche de soya, el tofu y la pulpa de soya (Okara), que son productos no fermentados. El jiang, el miso y la salsa soya son ejemplos de productos fermentados (Liu, 1997).

Una segunda generación de productos sucede con la industrialización de la pasta de soya. El producto resultante de la extracción de aceite de soya (pasta) contiene un 40-50% de proteína la cual sería aprovechada para la producción de alimentos de "segunda generación".

Sin entrar mucho en detalle, en la Figura 1, se resume básicamente el proceso de aprovechamiento industrial de la soya. Productos como harinas desgrasadas, texturizados, hojuelas, concentrados y aislados de soya son algunos ejemplos. Para la producción de estos, son necesarios tratamientos de secado, precipitación alcohólica, calor húmedo y seco. Las harinas resultantes han sido utilizadas en la preparación de productos de panificación y embutidos (Simpson, 1982; Hettiarachy y Kalapathy, 1997), así como alimentos para nutrición especial (aislados de soya) y productos análogos a la carne (texturizados).

La tercera generación de alimentos de soya se refiere a productos elaborados con proteína de soya modificada con vías de aplicación potencial.

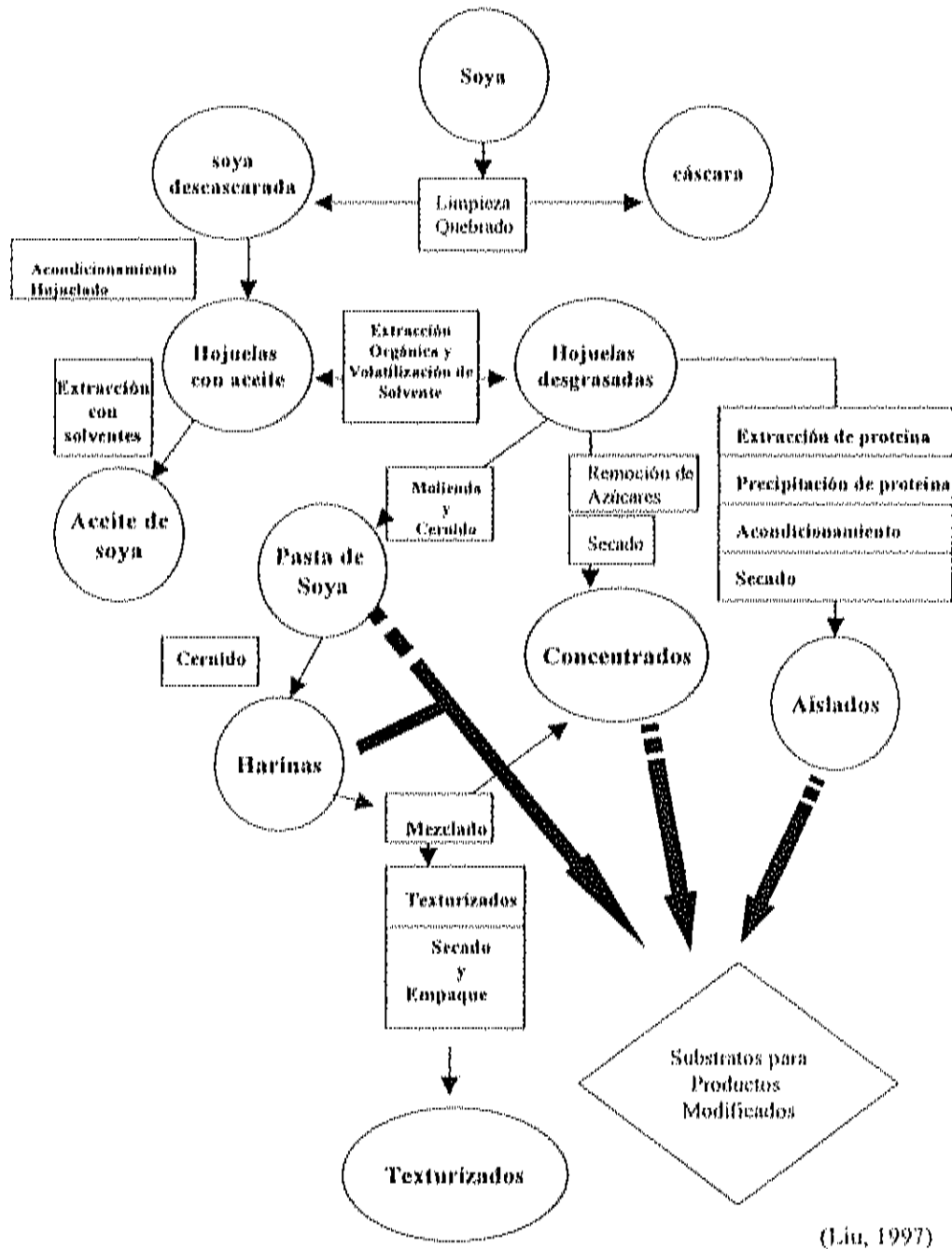


Figura 1 Aprovechamiento industrial de la soya

La búsqueda de nuevas formas de alimentos que permitan satisfacer las necesidades de proteína y energía para grupos con necesidades nutricionales especiales, orilló a realizar la modificación química o enzimática de la soya. En el mercado ya existen productos para nutrición de lactantes alérgicos, basados en hidrolizados proteicos de otras fuentes (Wahn, 1995), siendo los de soya un mercado relativamente nuevo. En CIAD se han obtenido fracciones de proteína de soya modificada que presentan ventajas nutricias superiores al aislado de soya y caseína comúnmente utilizados en fórmulas infantiles y bebidas fortificadas (Calderón de la Barca *et al.*, 1999 a,b).

Calidad Nutricional de Proteínas Modificadas

El deseo principal del nutricionista ha sido el desarrollo de métodos que evalúen de forma precisa la utilización de proteínas y su calidad. Algunos de estos métodos son el balance nitrogenado, recambio proteico, y concentración de aminoácidos plasmáticos postprandiales (FAO/WHO,1991). La calidad de las proteínas alimentarias depende de su habilidad para satisfacer los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos del cuerpo. Aunque la composición de aminoácidos ha sido utilizada como índice de calidad proteica, se ha hecho necesario verificar su valor en estudios *in vivo*. Por ésta razón la digestibilidad verdadera se ha utilizado para corregir el patrón de aminoácidos de cualquier fuente ensayada (Rahman *et al.*,1997). La clasificación de proteínas en base a su valor biológico y perfil de aminoácidos, ha permitido seleccionar las de alta calidad y usarlas como ingredientes en alimentos especiales (Keith y Bell, 1988).

Las proteínas modificadas producidas por hidrólisis y/o síntesis enzimática, han sido objeto de evaluaciones biológicas. Un aspecto particularmente importante en la producción de hidrolizados, es el mejoramiento en la absorción. Se ha observado que la absorción intestinal de di y tri-péptidos de hidrolizados proteicos es más efectiva que la de proteínas intactas (Ziegler *et al.*, 1990), o de aminoácidos libres (Silk, 1981; Grimble, 1995). Zhao y colaboradores (1997), reportaron que el grado de hidrólisis de la proteína de soya influye en su absorción y tránsito intestinal en perros. Estos hechos son particularmente importantes si se piensa que los procesos fisiológicos de asimilación alimenticia como la masticación e hidrólisis gástrica (Clinton *et al.*, 1968), se disminuyen o alteran en condiciones atípicas (enfermedad) o por la edad (Reville *et al.*, 1991; Merry *et al.*, 1992).

Dos trabajos son los que apoyan la importancia de los hidrolizados en la edad avanzada; Chen y colaboradores (1990) así como Ferraris y Vinnakota (1993), encontraron que con el aumento de la edad disminuye el transporte transepitelial y el área de absorción intestinal. Por otra parte, el buen pronóstico de recuperación de pacientes intervenidos quirúrgicamente, puede favorecerse vía alimentación enteral con oligopéptidos (Ziegler, *et al.*, 1998).

Los bioensayos con proteínas de soya enriquecidas enzimáticamente con aminoácidos son pocos; Yamashita y colaboradores (1971), realizaron los primeros enriqueciéndola con metionina. En dicho experimento, se encontró una relación de eficiencia proteica (PER) de 3.38, comparado con los valores de 2.4 para caseína usada como control. Kimura y Arai (1988), al ensayar oligopéptidos de proteína de soya

enriquecidos con metionina, observaron una mayor eficiencia proteica en ratas normales y desnutridas en comparación a mezclas de proteína con metionina libre. Más recientemente, Hájos y colaboradores (1996), reportan que la modificación proteolítica y enriquecimiento con metionina de la proteína de soya, aumenta su valor biológico mejorando su patrón de aminoácidos y reduciendo la actividad de factores antifisiológicos. A pesar del buen efecto biológico ensayado en los tres casos, los niveles de enriquecimiento logrados en los tres estudios no fueron satisfactorios, además en el último no se esclarece con seguridad la razón por la cual eleva su valor nutricio por solo comparaciones cromatográficas entre los productos proteicos de la modificación enzimática y las características y actividad de compuestos antifisiológicos de referencia.

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, pudimos observar que, a expensas de un mismo balance nitrogenado, se mejora la digestibilidad en péptidos de proteína de soya enriquecidos enzimáticamente en comparación con péptidos no enriquecidos, al compararse con caseína (Calderón de la Barca *et al.*, 1999b) y aislado de soya (datos no publicados) Dutra de Oliveira y colaboradores (1998), por su parte han documentado que la suplementación del aislado de soya con metionina, no mejora su valor nutricional en lactantes. Ambas observaciones nos permiten inferir que la hidrólisis enzimática no altera el valor nutricional de la proteína de soya, pero sí lo hace la adición covalente de metionina.

Edad y Utilización Dietaria de Proteínas

El envejecimiento es un proceso normal que inicia con la concepción y termina con la muerte. En la etapa de crecimiento, los procesos anabólicos exceden a los catabólicos. Una vez que el cuerpo llega a la madurez fisiológica, el índice catabólico o los cambios degenerativos son mayores que el índice de regeneración celular. En cualquier caso, el funcionamiento de cada órgano y su integración al metabolismo general es distinto. Mientras que durante el crecimiento el funcionamiento de los órganos está determinado por su madurez y diferenciación celular, el deterioro de los mismos es ineludible con el envejecimiento. Además, las patologías características de cada etapa evolutiva, condicionan de forma especial el correcto funcionamiento del organismo (Green y Green, 1984).

Desde el punto de vista nutricional, el estado fisiológico y limitación funcional de los órganos determina la utilización y destino de nutrimentos. El proceso de asimilación de nutrimentos es complejo, por lo que se hace necesario simplificar cada etapa funcional de acuerdo con su degradación (Adibi, 1976). En los siguientes párrafos nos abocaremos a discutir primeramente el comportamiento fisiológico de distintos órganos desde la perspectiva de degradación de nutrimentos (particularmente proteínas). En segundo término se mencionarán los aspectos relacionados con el comportamiento bioquímico de las proteínas y aminoácidos, de acuerdo a la edad.

Senectud Fisiológica y Funcional del Tracto Digestivo

El funcionamiento del aparato digestivo, como regulador de la asimilación dietaria de proteínas, se centra en dos actividades principales: la digestión y la absorción (Sleisenger y Kim, 1979; Adibi, 1976). La degradación mecánica del bolo alimenticio, digestión preparativa (química) y la digestión intestinal (enzimática) a nivel de lumen, membrana e intracelular, son parte de la fase de digestión (Cunningham, 1992). El proceso de absorción corresponde básicamente al transporte transmembranal de péptidos y aminoácidos libres y los mecanismos para su liberación a la circulación (Silk, 1981; Mathews y Payne, 1980). El estado fisiológico de los órganos, por lo tanto, influirá en su capacidad para efectuar estas actividades y llevar la utilización dietaria de proteína a buen nivel. A continuación se detallan las principales alteraciones en los procesos de degradación proteica, producidas por inmadurez o incapacidad (no patológica) en los órganos y la edad.

Cavidad oral. La secreción salival y masticación son las responsables de la degradación mecánica inicial del bolo alimenticio. Como a los infantes se les dan alimentos predigeridos y o emulsificados, no presentan problemas a este nivel como tampoco los hay en la edad adulta. Sin embargo, la baja producción de saliva con la edad avanzada, trae como consecuencia problemas dentales (Bowman *et al.*, 1992).

Esófago. A cualquier edad se pueden dar ligeros problemas de motilidad, en ausencia de problemas neurológicos y de obstrucción pero desde el punto de vista nutricional no son significativos (Bowman *et al.* 1992). Sin embargo, con el paso de la edad existen cambios en inervación y peptidérgica en este y otros esfínteres (Belai *et al.*, 1995).

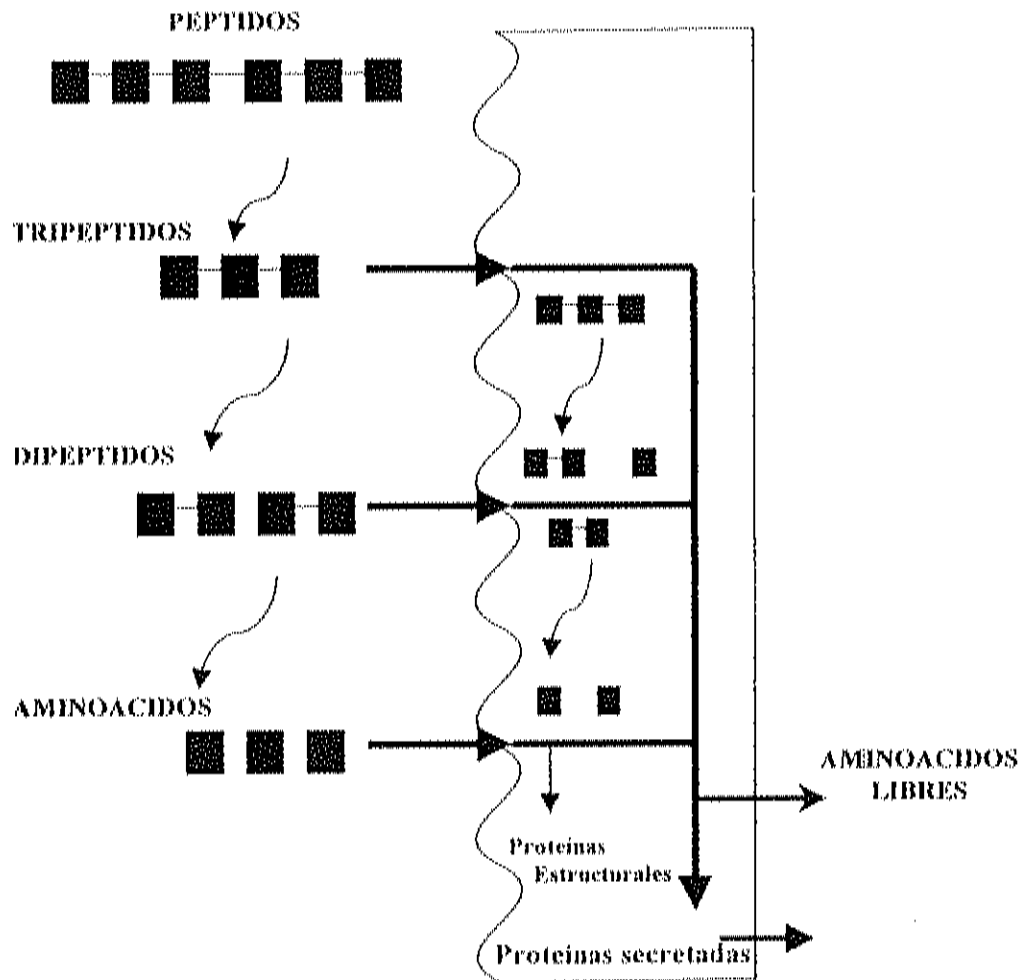
Estómago. Aunque la digestión gástrica (degradación química) no se considera como esencial en la digestión de nutrimentos, si existen algunos problemas en relación a ella. La maduración en la actividad secretoria se intensifica a un nivel aceptable hasta los 6 meses de edad (Grand *et al.*, 1979). Con la edad avanzada ocurre la aclorhidria (disminución en la producción de ácido) y disminuye el tiempo de vaciamiento gástrico. Aunque ambas situaciones no provocan alteración significativa en la asimilación de proteína dietaria, la producción limitada de ácido puede influir en la activación posterior de los sistemas encargados de la digestión enzimática de las proteínas (Green y Green, 1984).

Páncreas e hígado. A edad temprana la secreción pancreática, hepática y el metabolismo de ácidos biliares son reducidos (Grand *et al.*, 1979). En la edad avanzada, se han documentado cambios morfológicos en ambos órganos, aunque no se conoce su significancia fisiológica (Texter *et al.*, 1968). La alteración más significativa se relaciona generalmente a estados patológicos como insuficiencia hepática inducida por fármacos y/o deficiencia en la biosíntesis de enzimas pancreáticas y bicarbonato. Estas alteraciones generalmente no se registran en edad temprana. En la edad avanzada, la secreción reducida de enzimas por deficiencia funcional de los órganos o en la expresión de genes codificadores de enzimas metabolizadoras de nitrógeno, ocasionará escasa degradación de proteínas (Dhabbi *et al.*, 1999); mientras que la secreción pobre de bicarbonatos causará desequilibrios ácido-base que pueden inducir eliminación de aminas primarias para compensar el problema (Gallagher y Emley, 1994). De forma exógena, la presencia de factores antifisiológicos dietarios puede ocasionar la inhibición

en la producción y/o inactivación enzimática e hipertrofia pancreática, lo que influye en la utilización de la proteína (Gumbmann y Friedman, 1987).

Intestino delgado. La fase intestinal constituye sin duda el paso crítico en la asimilación de proteína dietaria. A nivel intestinal ocurren tanto la digestión como la absorción de nutrientes (Mathews y Payne, 1980). La digestión enzimática a este nivel se realiza en tres etapas: digestión luminal, digestión membranar e intracelular. La primera es catalizada por las enzimas proteolíticas de origen pancreático, cuya acción permite desdoblar proteínas hasta péptidos de distintos tamaños y aminoácidos libres. La segunda se realiza por las amino-oligopeptidasas membranales en las microvellosidades, cuya acción es sobre péptidos de más de 4 residuos, degradándolos a di o tripéptidos o aminoácidos libres, para ser absorbidos (Mathews y Payne, 1980). Esta degradación se esquematiza en la Figura 2.

Las alteraciones más significativas en el Intestino delgado se relacionan con el tiempo de maduración de enterocitos (Fry y Kohn, 1961), la activación de enzimas lúmicas y diferenciación de las enzimas membranales (Trier y Colony, 1979; Cunningham, 1992). Sea cual fuere el defecto, el resultado es la imposibilidad de digestión de péptidos y la consecuente eliminación de los mismos vía fecal. También, la disminución en la motilidad intestinal puede ocasionar que algunos péptidos dietarios inmunoreactivos permanezcan en el lumen el tiempo suficiente para desencadenar reacciones inmunológicas secundarias, lo cual trae como consecuencia la afectación del borde cepillo del intestino (Sanderson y Walker, 1995).



(Cunningham, 1992)

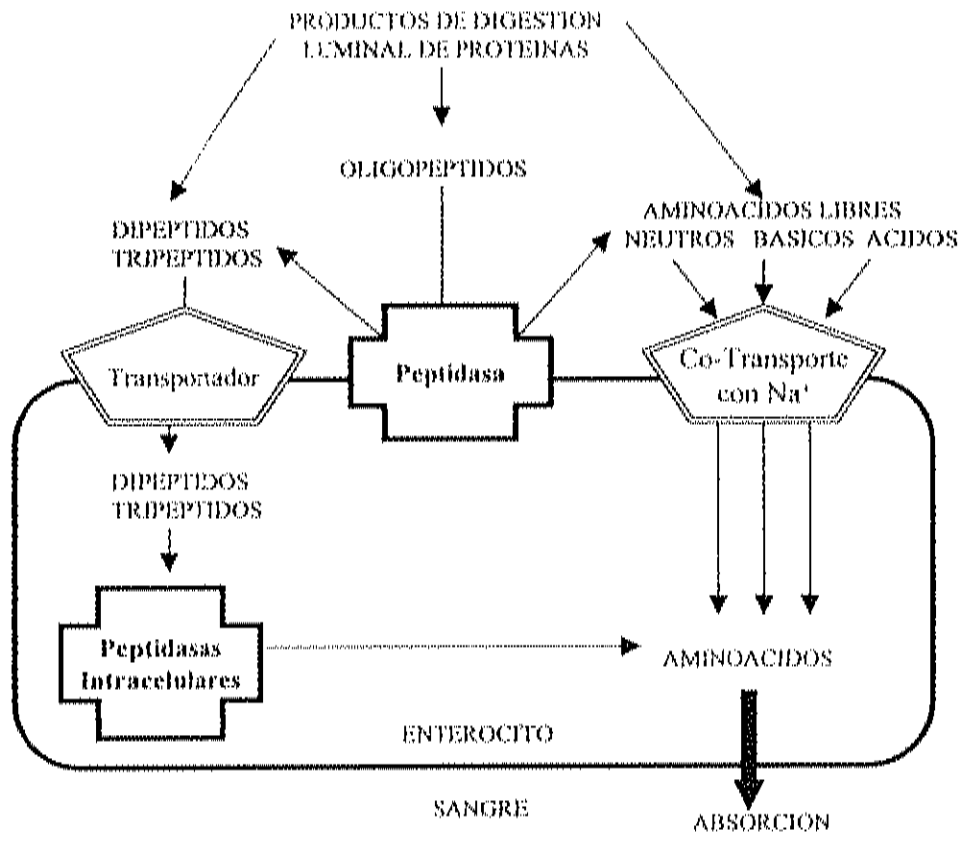
Figura 2 Digestión de péptidos: Fase membranal

Las deficiencias en la degradación enzimática de péptidos simples (di y tripéptidos) en el citoplasma del enterocito, parece no afectar los procesos de digestión y absorción de nutrientes cuando las peptidasas membranales trabajan bien (Adibi, 1971,1976; Mathews y Payne, 1980).

El transporte transmembranal también se ve afectado con la edad. El estado de maduración de los sistemas de transporte (Ugolev *et al.*,1979), el funcionamiento electro-osmótico y la diferenciación de múltiples sistemas de transporte para aminoácidos libres, di y tripéptidos y macromoléculas, depende de la edad (Sanderson y Walker, 1995; Selesenger y Kim, 1979; Burnston *et al.*, 1979).

La Figura 3 muestra los principales mecanismos de digestión y transporte del intestino. El transporte de macromoléculas hacia el torrente circulatorio es una característica del intestino inmaduro. En esta etapa, la expresión genética de sistemas de digestión y transporte especializados (Tiruppathi *et al.*, 1993), realiza el transporte de polipéptidos que, aunque conveniente para los sistemas de defensa del neonato, implica el desencadenamiento de fenómenos inmunes. Este es el principio de los fenómenos alérgicos y memoria inmunológica a proteínas dietarias.

Por otra parte, los sistemas de transporte para aminoácidos y distintas presentaciones de péptidos no son homogéneos a lo largo del intestino delgado del organismo maduro (Mathews y Adibi., 1976). Este hecho, la marcada pérdida de superficie absorptiva (Holt *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1990), los fenómenos de adaptación funcional producidos con la edad (Ferraris y Vinnakota, 1993; Reville *et al.*, 1991) y la



(Cunningham, 1992)

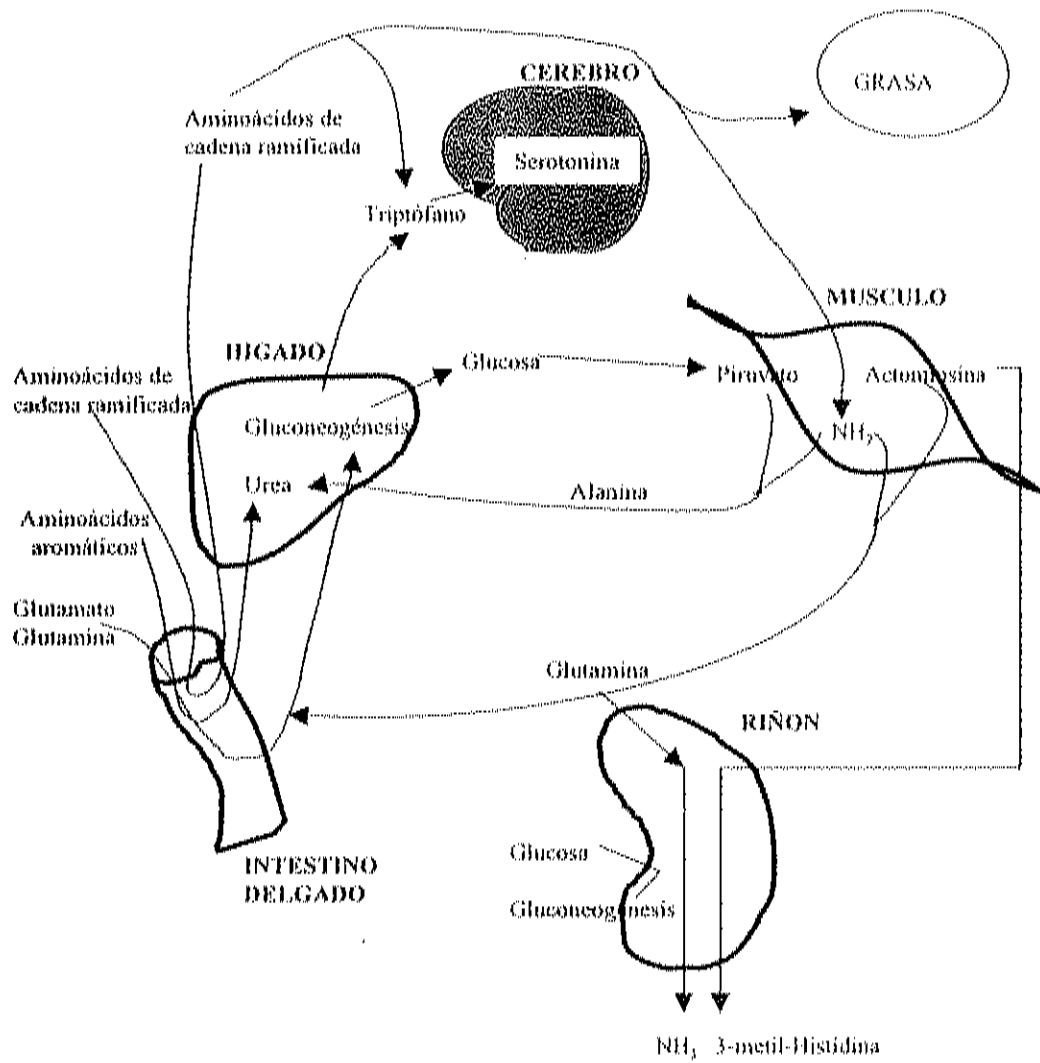
Figura 3 Mecanismos de degradación y transporte de proteínas

respuesta a señales reguladoras substrato-específica (Ferraris *et al.*, 1988; Cheeseman, 1986; Ferraris y Diamond, 1989), condicionan la asimilación de proteína dietaria y su respuesta plasmática.

Cambios en el Metabolismo de Proteínas Relacionados con la Edad

La biodisponibilidad plasmática de aminoácidos dietarios es consecuencia del trabajo conjunto de distintos órganos (Figura 4). Las particularidades en la funcionalidad de estos órganos y la edad determinarán la cantidad y forma en que los aminoácidos entren a la circulación portal. La edad temprana no ha sido objeto de muchos estudios sobre el comportamiento de los aminoácidos dietarios y/o endógenos, restringiéndose su evaluación a estudios de balance nitrogenado total. Lo anterior obedece al hecho de que la utilización de aminoácidos de origen exógeno es máxima pues se requiere para síntesis de proteína.

Existen variadas evidencias que indican que la síntesis de proteína declina con el envejecimiento y la restricción alimenticia (fenómeno colateral en la edad avanzada) en la mayoría de los órganos (Merry *et al.*, 1992; Heydari y Richardson, 1990). Debido a que la masa proteica de los tejidos se incrementa o mantiene hasta la senectud; se ha predicho y confirmado experimentalmente que la velocidad de degradación disminuye también con la edad (Morais *et al.*, 1997; Segal, 1990). Ambos mecanismos mantienen la homeostasis de proteína biodisponible (endógena y dietaria) y por lo tanto el balance nitrogenado en el anciano sano, como fenómeno de adaptación.



(Bender, 1985)

Figura 4 Intercambio de aminoácidos entre órganos

Sin embargo, la disfunción de muchos órganos para realizar sus funciones (ej. riñón) dentro del metabolismo proteico se ven alterados y por ende la biodisponibilidad de aminoácidos y nitrógeno asimilable en el anciano, según se ha demostrado en ciertos estudios de balance nitrogenado (Baldwin y Griminger, 1985). Así mismo, el incremento en la vida media de proteína celular puede contribuir a la acumulación anormal de proteínas y como consecuencia llevar a la disfunción de órganos (Adelman y Decker, 1985).

MATERIALES Y METODOS

El objetivo principal del presente trabajo fue el de evaluar biológicamente, en un modelo con ratas a distintas edades, las ventajas que ofrece una fracción de soya ultrafiltrada y enriquecida enzimáticamente con metionina (F_{1-10E}), en la formulación de productos para nutrición especial de ancianos y/o infantes; esto en comparación con proteínas de probada calidad (aislado de soya y caseína) comúnmente usadas en fórmulas comerciales para estos dos grupos. Acorde con este objetivo, el presente trabajo se dividió en 4 etapas:

1. Obtención de las fuentes proteicas
2. Bioensayos
3. Análisis de muestras biológicas y determinación de indicadores
4. Análisis estadístico

Reactivos

Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, perclorato de potasio, ácido nítrico, ácido bórico, éter etílico, ácido acético y cloruro de calcio fueron de Merck-México, S.A.; Tris (hidroximetil-aminometano), glicerol, azida de sodio, BAPNA (benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl), tripsina y quimiotripsina comercial, ácido sulfosalicílico, ácido tricloroacético, tioglicolato de sodio, β-ercaptoetanol, metil éster de metionina, óxido de cromo y etanol de Sigma Chemical Co. (St Luis, MO,

USA). El Zelazol® (clorhidrato de tiletamina + clorhidrato de solazepam) fue de los Laboratorios Fort Dodge (México, D.F.). El citrato de sodio, Brij-35, OPA (O-ftalaldehído), Buffer de borato de potasio y de citratos, ácido alpha-aminobutírico, tetrahidrofurano, metanol, estándares de aminoácidos de Pierce (Rockford IL, USA). El rojo de metilo y tetrahidrofurano fueron de Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Este último y el metanol (EM Science; Gibbstown NJ, USA) fueron de grado cromatografía líquida de alta resolución y todos los demás reactivos grado analítico.

Obtención de Fuentes Proteicas

Acondicionamiento y Caracterización Parcial de la Materia Prima

Se usó pasta de soya desgrasada (GAMESA, S.A.), transportada hasta las instalaciones de CIAD y mantenida en refrigeración hasta su uso. Para reducir el tamaño de partícula, la pasta fue molida mecánicamente (Laboratory Mill 1500). La harina resultante fue caracterizada utilizando mallas estándar Tyler, de 425, 250, 180, 150 μm , por Ruiz-Salazar (1996). A esta misma le fue practicado un análisis proximal de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC, como se describirá posteriormente.

Hidrólisis Enzimática

La harina de soya total obtenida en el paso anterior, se sometió a hidrólisis utilizando un extracto enzimático de páncreas porcino (EEPC) preparado y caracterizado por Valdez-Espinoza (1997), con actividad semejante a tripsina (AST) de 12.45 $\mu\text{g p-}$

nitroanilida/min/mg de proteína y semejante a quimi tripsina (ASQ) de 2.25 μg p-nitroanilida/min/mg de proteína. Empleando el procedimiento descrito por Calderón de la Barca *et al.* (1999a), la reacción se realizó a una concentración de sustrato (harina) de 4% p/v, relación enzima-sustrato de 4% p/p, a 50°C y durante 6 h en baño de agua y ajustando el pH a 8 con NaOH 0.5 N. La inactivación enzimática se realizó a 85°C por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 403 x g, 10 min a 15°C, utilizando una centrífuga IEC Centra, modelo GP8R (International Equipment, Co. Needham HTS, MA, EUA). El material hidrolizado soluble (sobrenadante), fue entonces separado y mantenido en refrigeración hasta el momento del secado por aspersión.

Dado que la intención en nuestro trabajo era la de producir material hidrolizado de manera intensiva, las soluciones de hidrolizado fueron secadas en un secador de espreas (APV Anhydro A/S; Søborg, Dinamarca). Las condiciones fueron las siguientes: T(°C) entrada=200, T(°C) salida = 90, 5kwatts, 100,000 rpm y flujo de 2 L/h. El hidrolizado seco fue recuperado en bolsas de polietileno y guardado en refrigeración hasta su uso.

La hidrólisis, centrifugación y secado fueron repetidos 10 veces procesándose 657g de harina de soya por día (10 L de hidrolizado en suspensión). El grado de hidrólisis se determinó con la ecuación de Adler-Nissen (1986) utilizando el volumen gastado de NaOH 0.5N para mantener el pH de la reacción. Los cálculos de rendimiento se expresaron como porcentaje de proteína extraída de la materia prima original.

Síntesis Covalente de Metionina al Hidrolizado

El enriquecimiento con metionina (aminoácido limitante de la proteína de soya) del hidrolizado se realizó por el método descrito por Calderón de la Barca *et al.* (1999a): concentración de sustrato (hidrolizado seco) al 20% (p/v), relación quimiotripsina comercial (55 U/mg proteína)/sustrato 1/100 p/p, glicerol 3 M, 0.07585 g de metil éster de metionina (ME-Met)/g de hidrolizado (equivalente a 0.05666 g de metionina/g hidrolizado) El procedimiento fue el siguiente: en un matraz Erlenmeyer de plástico fueron puestos 200 g de hidrolizado seco, 15.17 g de ME-Met, 780.7 mL de agua destilada, 219.3 ml de glicerol y 2 g de quimiotripsina comercial. La reacción se llevó a cabo a 37°C, 3 h a 100 rpm de agitación, ajustándose el pH a 7 con HCl ó NaOH 2N. Al término de este periodo la enzima fue inactivada de la misma forma que en la hidrólisis. Las soluciones fueron enfriadas para posteriormente fraccionarse por ultrafiltración. Este procedimiento fue repetido tantas veces como hidrolizado fuera obtenido por el paso anterior. La estimación del enriquecimiento de las fracciones hidrolizadas y enriquecidas se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) como se describe más adelante, asegurándose la remoción total de aminoácidos libres por ultradiafiltración.

Ultrafiltración (UF) Fraccionada

El fraccionamiento del hidrolizado antes (control de enriquecimiento) y después de la síntesis covalente se hizo utilizando un sistema de ultrafiltración de cartuchos en

espiral (Amicon, mod CH2) y una bomba peristáltica (Masterflex I/P, mod. 77601-10) a una presión de 20-30 psi. Los cortes de membrana fueron primeramente de 3 y 10 kDa, colectándose sus correspondientes eluidos (fracciones menores a estos cortes) en un solo matraz y asegurándose la completa elución con tres volúmenes de agua destilada por cada volumen de extracto a Ultradiafiltrar. La fracción recuperada en este paso fue mayor a 10 kDa. El eluido colectado (fracción < 10 kDa) se pasó posteriormente por membrana de corte de 1 kDa, asegurándose la remoción de péptidos menores y aminoácidos libres en el eluido, ultradiafiltrando con agua del mismo modo. La fracción recuperada en este caso fue entre 1 y 10 kDa. Posteriormente se liofilizaron todas las fracciones a sequedad completa (Liofilizador Labconco; LIPH-LOCK12). Los procedimientos analíticos y tratamiento de las muestras, fueron similares a los reportados por Jara-Marini (1997).

Análisis Proximal

A la pasta de soya, hidrolizado sin enriquecer y a las fracciones antes y después del enriquecimiento se les practicó un análisis proximal, con los métodos aprobados por la AOAC (1990): Proteína (N x 6.25; Método No. 9.201.05), humedad (Método No. 4.934.01), cenizas (Método No. 4.920.39), grasa (Método No. 4.920.39), y fibra cruda (Método No. 7.024.00). También se les determinó sodio (Na) por absorción atómica como contaminante derivado residual del proceso de hidrólisis.

Factores Antifisiológicos

A la fracción de interés F₁₋₁₀E, le fueron determinados actividades de lectina e inhibidor de tripsina. Este último también se le determinó al aislado e hidrolizado de soya.

Actividad de inhibidor de tripsina. Se determinó por el método 71-10 de la A.A.C.C. (1976). La extracción se hizo por triplicado agitando a baja velocidad 1 g de muestra en 50 mL de NaOH 0.01N por 3 h. Se realizaron diluciones seriadas en agua destilada mismas que se dejaron reaccionar con la enzima (tripsina) para posteriormente medir la actividad residual de esta con BAPNA (benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl), deteniendo la reacción con ácido acético al 30%. Los resultados fueron reportados como unidades inhibitorias de tripsina por gramo de proteína (UIT/g proteína).

Actividad de lectina. Esta se estimó por medio de una prueba de hemaglutinación utilizando eritrocitos humanos tripsinizados al 2% en PBS (Allen *et al.*, 1973). Se cargaron 25 µl de PBS a todos los pozos en una placa de microaglutinación, y diluyeron seriadamente las muestras cuidando de mezclar bien antes de transferir. Se aplicaron en cada pozo 25 µl de la suspensión de eritrocitos humanos tripsinizados. Después, se puso la placa en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. El título de hemaglutinación se tomó como el inverso de la última dilución en donde se observó visualmente aglutinación (Calderón de la Barca *et al.*, 1999b).

Preparación de Proteínas de Referencia

Con fines comparativos en la evaluación biológica de la fracción de interés, fueron incluidas fuentes proteicas alternas para la formulación de las dietas: caseína ANRC y aislado de soya SUPRO 500E (ProteinTechnologies, Inc.). Estas estuvieron sujetas a análisis proximal (no incluyendo fibra cruda y sodio) de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Así mismo, para efecto de añadir metionina libre al aislado al nivel de enriquecimiento de la fuente proteica de interés (F_{1-10E}), también se determinó su perfil de aminoácidos como se describe posteriormente.

Bioensayos

Animales

La descripción del manejo y trato de los animales se realizó de acuerdo con las recomendaciones dictaminadas por un comité de ética interno. Para la selección de la edad de los animales se tomaron en cuenta los siguientes criterios: (a) edad cronológica y madurez digestiva, (b) desgaste fisiológico (# de aparcamientos) y (c) comportamiento colectivo, de acuerdo con las recomendaciones de la NRC (1981). De esta forma se seleccionaron tres grupos de ratas Sprague Dawley: recién destetadas (grupo 1: 21 días, 46 g aprox.), adultas jóvenes (grupo 2: 180 días, 290 g aprox.) y adultas maduras (grupo 3: 480 días, 450 g aprox.). Todos los animales pertenecientes a los grupos 2 y 3 fueron proveídos, en dos etapas, por el bioterio de la Universidad de Sonora (UNISON) y fueron ingresados a las instalaciones del CIAD un mes antes de cumplir la edad

correspondiente. Los animales del grupo 1 fueron obtenidos del apareamiento de 14 parejas de ratas del grupo 3, en las instalaciones del CIAD. Antes de los bioensayos los animales fueron mantenidos en jaulas plásticas con libre acceso a dieta (pellet comercial) y agua.

Los bioensayos fueron practicados una edad a la vez, alojándose los animales en jaulas metabólicas (NALGENE) distribuidas aleatoriamente en un modelo completamente al azar procurando una distribución 1:1 de machos y hembra, en condiciones termoreguladas a 25°C, ciclos luz-obscuridad de 12 h, agua y dieta de adaptación *ad libitum*. Los bioensayos se realizaron por grupo etario, asignándose 6 ratas por dieta experimental incluyendo dieta libre de nitrógeno (24 ratas en total).

Entre los días 1-10 (todos los grupos) y 10-14 (grupo1) se llevaron los registros cada tres días de ingestión dietaria, peso corporal y diaria de excreción de orina y heces de las 24 ratas por grupo de estudio (6 ratas/dieta). Para evaluar la evolución nutricia de cada animal durante el bioensayo (incluyendo los asignados a dieta libre de nitrógeno), se realizó un examen general de orina por medio de tiras reactivas para orina (Combur 10 Test-Lakeside; Mannheim RF, Alemania) y registrándose en la bitácora. La orina fue colectada y diluida en HCl conc. (0.1 mL HCl / mL orina). Las heces se secaron en horno de convección. El último día de bioensayo, a cada grupo dietario se les permitió libre acceso a la dieta en intervalos de 2 h (vespertino). Al término de este período, las ratas fueron anestesiadas con 40 mg/kg peso de Zelazol® (50% clorhidrato de zolazepan y clorhidrato de tiletamina 50%). Previo al sacrificio, durante el período de anestesia, a todas las ratas se les realizó extracción sanguínea por punción cardíaca y colectándose

en tubos con y sin anticoagulante (EDTA), para las determinaciones de aminoácidos y urea plasmática, respectivamente. Para el estudio de digestibilidad ileal, se realizaron cortes y extracción de digesta en yeyuno e ileon terminal de acuerdo al procedimiento descrito por Donkoh y Moughan (1994).

Dietas

La composición de las dietas experimentales se hizo de acuerdo con las recomendaciones de la AOAC (1990) para lograr dietas isoenergéticas al 10% de proteína para las dietas correspondientes al grupo de recién destete y 7% para los otros dos grupos. Estos niveles de proteína fueron escogidos para evaluar calidad proteica (10%) durante el crecimiento animal (FAO/WHO, 1991) y mantenimiento en ratas adultas (7%) según la NRC (1978). Tres tipos de dietas fueron formuladas basadas en caseína ANRC (C), F₁₋₁₀E (FE), aislado de soya (A); a esta última se le adicionó metionina libre para alcanzar el nivel de enriquecimiento de la proteína de interés (FE). La composición basal de las dietas se muestra en la Tabla 2. Se incluyó además un 0.2% de óxido de cromo como marcador para las determinaciones de digestibilidad. Las dietas libre de nitrógeno se prepararon de la misma forma pero en lugar de proteína se completó con carbohidratos. Todas las dietas fueron suministradas diariamente y se mantuvieron en refrigeración. Se determinó experimentalmente el contenido de proteína de cada dieta para control de la formulación.

Tabla 2 Composición porcentual de las dietas experimentales ¹

Ingredientes ²	Grupos		
	1	2	3
	%		
Aceite de Maiz	8.0	8.0	8.0
Premezcla de Vitaminas	1.0	1.0	1.0
Premezcla de Minerales	5.0	5.0	5.0
Cr ₂ O ₃	0.2	0.2	0.2
Celulosa	1.0	1.0	1.0
Agua	5.0	5.0	5.0
Cloruro de Colina	0.2	0.2	0.2
Fuente de Proteína ^{3,4}	10.0	7.0	7.0
Almidón y Dextrosa para hacer 100% de la dieta			

¹ Aceite de maíz, premezcla de minerales, celulosa y agua fueron ajustados de acuerdo a la análisis proximal de las fuentes proteicas de acuerdo con el método 43.212 de la AOAC .

² Todos los ingredientes excepto el aceite de maíz, cloruro de colina y fuentes proteicas fueron de USB Amersham Life Science, Inc.

³ Niveles de proteína 10% recomendado para evaluación de calidad proteica (AOAC, 1990) y 7% para mantenimiento de ratas adultas (NRC, 1978)

⁴ Fuentes proteicas: Caseína ANRC (USB Amersham Life Science), Aislado de Soya SUPRO 500E (Protein Technologies, Inc.) suplementado con metionina libre para alcanzar 4.33 g/100g proteína y F_{1,10} E.

Análisis de Muestras Biológicas y Determinación de Indicadores

Indicadores de Calidad Proteica

El contenido de nitrógeno ($N \times 6.25$) en las muestras de dietas orina y heces se determinó por micro Kjeldahl (método 920.105; AOAC, 1990). Se calcularon las cantidades totales de excreción de orina y heces y la ingestión total de nitrógeno. También se hicieron las correcciones correspondientes por pérdidas endógenas de los grupos sujetos a dieta libre de nitrógeno. Con esos datos, se determinaron los indicadores biológicos. Estos fueron: utilización neta de proteína (NPU), digestibilidad verdadera (DV) y calificación química corregida por digestibilidad (CQCD) (FAO/WHO, 1991). Así mismo se incluyó un estimador de utilización de proteína para crecimiento expresado como el aumento de peso / g de proteína consumida ($\Delta \text{peso} / \text{g Proteína}$) a 4, 10 y 14 días para el primer grupo de ratas (21 días de edad). A los datos de registro (consumo de dieta, peso corporal, excreción de orina y heces) y a los indicadores calculados se les hizo análisis de varianza (GLM-ANOVA) y prueba de comparación de medias por Tukey (NCSS, 1996).

Respuesta Post-Prandial de Aminoácidos Plasmáticos y Urea

Primeramente, el plasma sanguíneo fue separado por centrifugación a $1000 \times g$ durante 20 min en una centrifuga refrigerada a 10°C (IEC Centra). En un vial ependorff de 1 mL se pusieron 500 μL de plasma y se precipitó la proteína con 21.7 μL de una

solución al 70% de ac. sulfosalicílico (Ziegler *et al.*, 1992), agitándose en vortex por 5 segundos, para posteriormente centrifugarse a 1000 x g por 20 min. El sobrenadante fue separado y mantenido en refrigeración hasta su uso. La determinación de aminoácidos por CLAR en el sobrenadante se realizó por una modificación al método reportado por Vázquez *et al.* (1995). La determinación de urea plasmática se realizó por medio de un equipo kit cinético ureasa-GLDH (Reactivos SPINREACT, S.A; México). Los valores para cada aminoácido plasmático a las dos horas de la ingestión dietaria (puntual) fueron comparados por dieta dentro de cada grupo de ratas por la prueba de Tukey-Kramer.

Digestibilidad Aparente Ileal-Yeyunal-Fecal.

La recolección y análisis de muestras para la determinación de digestibilidad se realizó por el método descrito por Donkoh y Moughlan (1994). Inmediatamente después del sacrificio se extrajo la porción próxima a la válvula ileocecal (íleon) y la porción media del intestino delgado (yeyuno), por incisión abdominal en condiciones asépticas. Las digestas ileal (grupos 1,2 y3) y yeyunal (grupos 2 y 3) se recuperaron por perfusión intraluminal con solución salina al 0.9% en cama de hielo. A ambas digestas y heces correspondientes a los últimos dos días de ingestión y la dieta experimental se les determinó cromo total por digestión ácida con ácido nítrico-perclórico y cuantificación por absorción atómica (Ramos, 1997). Los aminoácidos de las mismas muestras se cuantificaron por CLAR (Vázquez *et al.*, 1995). El cálculo de digestibilidad aparente ileal, yeyunal y fecal se hizo por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de digestibilidad} = (1 - (axd)/(bxc)) \times 100,$$

donde : a= cromo en alimento, b= aminoácido en alimento, c= cromo en digesta ileal, fecal o yeyunal, d= aminoácido en contenido ileal, yeyunal o heces. La digestibilidad total de nitrógeno de cada proteína se estimó de acuerdo con la cantidad y porción digestible de cada uno de los 15 aminoácidos ensayados. Esta estimación se realizó en cada una de las tres zonas digestibles (yeyuno, ileon y heces).

Dada la imposibilidad de realizar estos ensayos de digestibilidad por cada rata y a que las muestras correspondientes fueron recolectadas por grupo etario y dieta suministrada, La comparación estadística de los porcentajes de digestibilidad de aminoácidos y urea entre las tres dietas suministradas a cada grupo etario se sustentó en medidas de tendencia central. (NCSS,1996).

Aminogramas

En el presente trabajo se utilizaron diversas variantes de digestión y/o condiciones cromatográficas al método descrito por Vázquez *et al.* (1995) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase reversa. Dichas variantes se enumeran a continuación:

Agente derivatizante, estándar interno y estándar de aminoácidos. La derivatización de todas las muestras se realizó empleando *O*-ftalaldehído (OPA), el cual fue preparado de la siguiente manera: en un matraz de 10 mL se pesaron 10 mg de OPA y se le agregaron 250 μ L de metanol y 3 mL de buffer de borato de potasio 0.5 M pH 10.4. Se agitó y seguidamente se agregaron 37.5 μ l de Brij 35 al 30%, y 25 μ L de 2-mercaptoetanol.

La muestra se aforó a 10 mL con el mismo buffer de borato y se dejó la mezcla en un vial obscuro por una noche a 4°C.

El estándar interno (ac. α -aminobutírico) se preparó a una concentración de 2.5 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ en agua grado CLAR para la preparación de las muestras digeridas y estándares de aminoácidos a inyectar y a una concentración de 0.475 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$ para las inyecciones de las muestras plasmáticas. La mezcla de estándares de aminoácidos utilizada para los aminogramas de muestras hidrolizadas se preparó de la siguiente manera: a 2 mL de la mezcla de aminoácidos Pierce (0.1 μmol de cada aminoácido/ μl) se les añadieron 2 mL de estándar interno (2.5 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$) y posteriormente se aforó a 50 mL con agua grado CLAR, manteniéndose en refrigeración hasta su uso. De la misma forma se preparó el estándar de aminoácidos para los aminogramas séricos (sin hidrólisis), solo que se adicionaron Asn, Glu, y Trp (aminoácidos que se pierden en la hidrólisis de muestras). La concentración de estos fue de 0.1756, 0.1588 y 0.1136 $\mu\text{moles}/\mu\text{L}$ respectivamente.

Digestión, preparación e inyección de muestras

Hidrólisis ácida y rotaevaporación. Las fracciones obtenidas antes y después del enriquecimiento y fraccionación y el aislado de soya, fueron sometidos a este procedimiento: 0.001-0.0015 g de cada muestra fueron colocados en un tubo digestor Pierce al que se le agregó posteriormente la misma cantidad de tioglicolato de sodio y 3 mL de HCl 6 N. A este tubo se le hizo vacío por 2 min, se selló y se dejó digerir por espacio de 6 h, en un digestor Reacti-Therm modelo 18870 (Pierce, Rockford, IL) a 150-155°C. Las muestras fueron enfriadas posteriormente y el digerido fue transferido a

matraces bola de 125 mL, evaporándose a sequedad bajo vacío utilizando un rotavapor Buchi modelo 011, provisto de baño de agua a 65°C. El matraz fue lavado dos veces con 2 mL de agua grado CLAR, se resuspendió en 2 mL de buffer de citrato de sodio 0.2M pH 2.2 y se almacenó a 4°C hasta su análisis. 200 µl de ésta solución se combinaron con 40µl de estándar interno (2.5 µmoles/µL) y la mezcla se llevó 1 mL con buffer de citrato 0.2M pH 2.2. Para la inyección de la muestra fueron utilizados 0.25 mL de esta solución o de la mezcla de estándares mas 0.25 mL de OPA preparado (dilución 1:1) mezclándose en jeringa de 10 mL provista de filtro acuoso de poro de 0.22 micras. Transcurridos 2 min de reacción se inyectaron por la portilla de inyección (10µL) de la bomba Varian 9010 (Solvent Delivery System) del equipo cromatográfico. La separación de los aminoácidos en la muestra se dio en una columna Microsorb Shortone RP C-18 (80-200 Rainin) de 10 cm de largo por 4.6 mm de diámetro con sistema a gradientes de la fase móvil metanol /Acetato de Sodio+Tetrahidrofurano. La detección de los complejos OPA-aminoácido se realizó utilizando un detector Fluorochrom II Varian con lámpara de deuterio a una velocidad de 1.5 mL/min, 25-27°C durante 30 min. El análisis de los cromatogramas se realizó con la base de datos Varian Star Chromatography versión 4.0.

Hidrólisis por microondas (HMO). En este caso, la hidrólisis ácida fue igual pero la digestión de las muestras se realizó en un horno microondas (mod. MDS-200; CEM Co.; Mathews, NC) 2 µg y 50 µL de HCl 6N fueron colocados en tubos de vidrio y en chaqueta de digestión especiales para HMO (Vapor phase hydrolysis kit; CEM Co.). El programa de hidrólisis (Hi) y secado (S), a vacío y en ambiente de N₂, fue el

siguiente: H_i = 10 min (40 psi), 5 min (60 psi), 5 min (80 psi), 10 min (100 psi); S = 10 min (0 psi) La dilución e inyección de las muestras fueron similares a las que se describieron para el otro método de digestión. Este procedimiento fue utilizado para todas las muestras de dietas, heces, digesta ileal y yeyunal de todos los grupos.

Muestras no hidrolizadas. Las muestras de plasma sanguíneo (obtenidas de centrifugar las sangres a 1000xg por 20 min) precipitadas con ac. sulfosalicílico fueron inyectadas en forma directa bajo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. La preparación de la inyección se hizo de la siguiente manera: 150 µL del sobrenadante se mezclaron con 40 µL de estándar interno (0.475 µmoles/µl) en el momento de la inyección. Con esta variación en la dilución se aseguró que la concentración teórica de estándar interno inyectada en cada muestra (0.05 µmoles/µL) fuera la misma que en las inyecciones del estándar de aminoácidos. Los resultados finales fueron expresados en µmoles/L.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de las Fuentes Proteicas

Hidrólisis de la Materia Prima

La pasta de soya molida (harina), tuvo un tamaño de partícula y composición proximal similar al reportado por Ruiz-Salazar (1996). Poco más del 70% de este material eran partículas menores a 180 μm (datos no mostrados). El contenido de sodio en el hidrolizado y en las fracciones indica contaminación por NaOH durante el proceso de hidrólisis, perdiéndose gradualmente durante la ultradialfiltración de las fracciones (Tabla 3a). Por ello sería recomendable aumentar el número de lavados en la ultradialfiltración, para remover completamente el sodio. El contenido de proteína en base seca de la harina inicial y el hidrolizado obtenido fue de 50.13% y 59.8% respectivamente, reduciéndose la humedad por secado en un 6%. A pesar de que la proteína en el hidrolizado se concentró un 19.3% con respecto a la pasta, solo fue posible recuperar el 65.93 de la proteína en reacción (Tabla 3b), con un grado de hidrólisis de 23.5% según la ecuación de Addler Niessen (1986). La pérdida de material proteico a este nivel se atribuye a dos puntos del proceso: 17.6% del material se pierde durante la hidrólisis y centrifugación leve aplicada al material para separar el hidrolizado del material no digerido. En este caso se debe recordar que la hidrólisis es parcial y que parte de la proteína original, no está digerida.

Tabla 3a Análisis proximal de productos de soya y fracciones ultrafiltradas antes y después de enriquecimiento con metionina^{1,2}

Material	Proteína %	Humedad %	Grasa %	Ceniza %	Sodio ppm	Fibra cruda %
Pasta de Soya GAMESA	50.13	11.49	0.83	6.47	<0.5	3.20
Aislado SUPRO 500E	90.00	9.53	1.00	3.57	<0.5	<0.05
Hidrolizado no enriquecido	59.80	6.30	0.33	9.15	9.82	<0.05
F>10 kDa no enriquecido	73.96	1.44	1.54	8.50	1.47	<0.05
FE>10 kDa enriquecido	68.44	1.57	0.16	6.32	1.11	<0.05
10>F>1 kDa no enriquecido	67.38	3.15	1.73	9.12	1.32	<0.05
10>FE>1 kDa enriquecido	68.05	4.16	1.00	5.30	1.05	<0.05

¹ Expresados en materia seca (AOAC, 1990)

² Media de tres réplicas

Tabla 3b Balance de masa (como proteína) de las fracciones antes y después de enriquecimiento, a partir de la materia prima^{1,2}.

Material	% Proteína Original
Pasta de Soya	100.00
Hidrolizado Liofilizado	82.43
Hidrolizado seco por aspersión	65.93
F>10 kDa no enriquecido	24.76
FE>10 kDa enriquecido	26.18
10>F>1 kDa no enriquecido	21.31
10>FE>1 kDa enriquecido	23.26
F<1 kDa no enriquecido ³	19.86
FE< 1 kDa enriquecido ³	16.49

¹ % de proteína recuperado (Nx6.25) del 100% de proteína de pasta de soya en reacción.

² Medias ajustadas de 20 réplicas

³ Calculado teóricamente del porcentaje extraído en el hidrolizado completo.

Jara Marini, (1997) reportó pérdidas del 11.4% para un proceso similar de hidrólisis pero de 12 h. Aunado a lo anterior, Calderón de la Barca *et al.* (1999b) señalan que la eficiencia en la hidrólisis es dependiente del tiempo y actividad enzimática de los extractos pancreáticos utilizados. Por otra parte, al comparar los rendimientos de secado por liofilización y aspersion en nuestro trabajo, se observó una pérdida adicional del 16.5%. Algunos autores señalan pérdidas menores al 5% entre uno y otro sistema de secado (Desobry *et al.*, 1997; Dziezak, 1988). Esta pérdida, aunque significativa, podría ser no ser significativa si se considera que el secador de espreas procesa 2 L de hidrolizado en una hora, sin afectar las propiedades funcionales del producto. Estas aseveraciones se hacen en base a la comparación de las propiedades y el rendimiento obtenidos para el hidrolizado liofilizado de éste y un estudio anterior (Calderón de la Barca *et al.*, 1999a). Desde el punto de vista industrial, es mas conveniente el secador de espreas, ya que muy pocas industrias cuentan con un liofilizador.

Síntesis Enzimática

Las condiciones experimentales fueron seleccionadas para lograr un nivel de enriquecimiento en las fracciones hidrolizadas ($F > 10$ y $10 > F > 1$) adecuado a las recomendaciones para preescolares y adultos (FAO/WHO, 1991). Aquí se logró enlazar un 3.47% extra de metionina en la fracción de interés (F_{1-10} E) al 0.86% que contenía su fracción homóloga hidrolizada antes de enriquecerla. Así en total había un 4.33% de metionina, sin verse alterada significativamente la composición porcentual de los otros aminoácidos esenciales (Tabla 4).

Tabla 4 Contenido de aminoácidos de caseína, aislado de soya, pasta, hidrolizado y fracciones ultradialfiltradas de interés antes (F₁₋₁₀) y después (F₁₋₁₀E) de la incorporación covalente de metionina (g/100g proteína)^{1,2}

Aminoácido	Caseína ³	Aislado ⁴	Pasta	Hidrolizado	F ₁₋₁₀	F ₁₋₁₀ E
Ac. Aspartico	7.38	12.14	11.52	11.28	10.41	10.37
Ac. Glutámico	19.91	22.82	20.17	18.78	18.74	18.83
Serina	5.24	4.75	3.68	3.78	2.43	2.47
Histidina	2.47	1.92	2.64	2.57	2.07	2.74
Glicina	1.64	4.97	5.72	4.34	4.92	4.48
Treonina	3.12	3.86	3.95	4.71	4.12	5.93
Arginina	3.03	7.73	8.12	6.88	5.56	3.95
Alanina	2.81	5.70	4.75	4.33	3.10	3.75
Tirosina	5.04	3.48	3.95	3.25	2.41	2.25
Metionina	3.87	1.18	1.77	1.45	0.86	4.33
Cisteína ⁵	0.51	1.17 ³	1.17 ³	1.17 ³	1.17 ³	1.17 ³
Valina	4.75	5.31	5.61	5.38	4.51	4.39
Fenilalanina	4.61	5.78	5.97	5.18	3.36	2.45
Isoleucina	3.86	5.04	5.31	4.84	5.10	6.90
Leucina	8.44	8.45	6.99	7.24	8.39	5.68
Lisina	6.92	6.37	6.56	6.19	9.81	11.93

¹ Caseína ANRC, Aislado de Soya SUPRO500E (Protein Technologies, Inc.), Pasta de Soya (GAMESA), hidrolizado secado por aspersión, F(1-10) = Fracción hidrolizada (F) y enriquecida (FE) con metionina.

² Medias de 4 réplicas

³ (Keith y Bell, 1988)

⁴ (Calderón de la Barca *et al.*, 1999a)

⁵ Cisteína + Cistina

Este nivel de enriquecimiento y la poca alteración del perfil de aminoácidos de la proteína original durante la modificación enzimática y fraccionación, fue similar al reportado por Calderón de la Barca *et al.* (1999a). FAO/WHO (1991) recomienda 4.2 % de Metionina+Cisteína (Met+Cis) para infantes y 2.5 % de estos mismos, para los otros grupos de edad. Considerando de 1-2% de Cis en la soya (Bressani, 1981; Adler-Nissen, 1986), se requeriría un 3.2 % de Met para una fórmula infantil y 0.5 % para otros productos. Por ello, la metionina sola enlazada sobrepasa el requerimiento de aminoácidos azufrados para cualquier grupo etario, mejorando la relación Met:Cis de 0.7:1 a 3.7:1 . Raguso *et al.*, (1997) y Pszcola, (1999) afirman que el contenido de cisteína en la dieta afecta la cinética y oxidación de metionina cuando su relación es 1:1, aún cuando se satisfaga la relación de aminoácidos azufrados en el adulto. Este último estudio menciona además que una relación 3:1 de metionina y cisteína, como el encontrado para proteínas lácteas, ofrece una mayor posibilidad de satisfacer el requerimiento de aminoácidos azufrados para personas de la tercera edad.

Por otra parte, la cantidad de metionina añadida a la mezcla de reacción fue de 3 a 8 veces menor que la utilizada por Hajós *et al.* (1996) y Hussein *et al.* (1995) para enriquecer otras proteínas con el mismo aminoácido para el mismo nivel de enriquecimiento. También el tiempo de reacción disminuyó en 5.3 veces con respecto al utilizado en los dos estudios señalados. La disminución en los dos parámetros, significa una posibilidad grande de abatir costos y de llegar a hacer de este proceso una aplicación real.

Ultrafiltración Fraccionada (UF)

Las distintas fracciones hidrolizadas (F) y enriquecidas (FE) obtenidas por ultrafiltración, se clasifican como concentrados ya que su contenido proteico es superior a 60% pero menor de 90% (Badui, 1984; Liu, 1997). La primer fraccionación del hidrolizado antes y después de enriquecimiento, correspondía al corte de 10 kDa. La recuperación de proteína en péptidos mayores a este corte fue ligeramente superior en el hidrolizado enriquecido (26.18%) que en el no enriquecido (24.76%).

Lo mismo se observó para la fracción de ($F_{1-10}E$) en donde se recuperó un 23.26% de la proteína original, ligeramente superior al de su homóloga sin enriquecer (F_{1-10} ; 21.31%). Teniendo en cuenta que estas últimas fracciones tienen casi el mismo porcentaje de proteína en base seca (68.05 y 67.38 respectivamente) esto nos permite inferir que la actividad de la quimiotripsina fue preferentemente como sintetasa y no hidrolasa (Deeslie y Cheryan, 1988; Kasche, 1990). Este hecho es respaldado por la menor recuperación de péptidos <1 kDa y aminoácidos libres del hidrolizado enriquecido (Tabla 3b).

En términos generales, a partir de la cantidad de proteína sometida a reacción (pasta de soya) fue posible recuperar cerca de un cuarto en la fracción enriquecida de interés. Para fines de producción industrial es recomendable un control más estricto de los puntos críticos (secado, centrifugación) o un proceso de remoción secuencial de péptidos enriquecidos durante la síntesis. Por ahora, es posible justificar estas pérdidas solo desde el punto de vista económico: a) por la utilización de una materia prima barata y b) la posible incorporación de esta nueva fuente proteica en formulas enterales

comerciales (ej. Ensure® y Sustacal®). En este tipo de fórmulas, se podría sustituir las fuentes proteicas originales las cuales son de alto costo, teniendo como valor agregado el mejoramiento tecnológico y nutricional de estos productos (Calderón de la Barca *et al.*, 1999b).

Factores Antifisiológicos en la Fracción de Interés

El deterioro en la digestibilidad y valor biológico de los productos de soya se atribuyen, entre otras causas, a la presencia de factores antifisiológicos (Liener, 1994). Por esta razón, a la fracción de interés (F_{1-10E}) le fue cuantificada la actividad hemaglutinante (lectina) e inhibidores de tripsina. La fracción no mostró actividad hemaglutinante, pero se encontró una actividad de inhibidor de tripsina de 4,444 UIT/g proteína. La pasta de soya (Ruiz-Salazar, 1996) y el aislado de soya mostraron una actividad de 47,778 y 14,180 UIT/g proteína, lo que significa una reducción del 90 y 70% de la actividad en la fracción de interés con respecto a cada uno de estos materiales, respectivamente. Durante la primer etapa de modificación enzimática (hidrólisis) se pierde la mayor parte de la actividad (85%) de inhibidores, ya que el hidrolizado seco (por aspersión) mostró una actividad de 7,333 UIT/g de proteína. Considerando que la actividad de nuestra fracción es similar a lo reportado para fracciones menores a 10 kDa enriquecidas (Calderón de la Barca *et al.*, 1999b), esto nos permite inferir que la actividad de inhibidor de tripsina no se modifica durante la etapa de síntesis. La actividad residual del inhibidor de tripsina en las fracciones enriquecidas se atribuye al inhibidor de Kunitz que no se inactiva por completo durante la proteólisis limitada

(Vaintrub y Yataru, 1995) y a la posible restitución de la actividad a pH neutro o ligeramente alcalino (Koide *et al.*, 1974).

Evaluación de la Calidad de Proteína

Las Tablas 5 y 6 muestran los resultados de los registros de bioensayos y los indicadores biológicos de calidad proteica y utilización de proteína para crecimiento (Δ peso/gProteína) para las fuentes ensayadas, en los tres grupos etarios de ratas Sprague Dawley. La realización de estos bioensayos tuvo dos propósitos particularmente importantes. Primero, estudiar el efecto de distintas formas de proteína sobre su utilización dietaria en tres grupos de edad. Segundo, comparar el efecto fisiológico del hidrolizado modificado de interés, con el encontrado para el aislado de soya (ingrediente común en alimentos para nutrición especial).

Antes de iniciar la discusión de resultados, se deben de considerar algunas premisas: La fracción enriquecida de soya (P_{1,10E}) presenta péptidos de 1 a 10 kDa con una proporción mayor de metionina covalentemente unida que la requerida para cubrir las necesidades de aminoácidos esenciales de humanos (preescolares y adultos) y ratas adultas pero no cubre la necesidad de Fenilalanina+Tirosina para rata en crecimiento (Tabla 7). El aislado de soya es una fuente de proteína intacta no digerida a la cual se adició metionina libre al nivel de enriquecimiento de la fracción proteica de interés (4.33% de metionina). Este material satisface los requerimientos de los mismos grupos señalados para la fracción de interés, pero no los de rata en crecimiento siendo en este caso triptófano el aminoácido limitante.

(Vaintrub y Yataru, 1995) y a la posible restitución de la actividad a pH neutro o ligeramente alcalino (Koide *et al.*, 1974).

Evaluación de la Calidad de Proteína

Las Tablas 5 y 6 muestran los resultados de los registros de bioensayos y los indicadores biológicos de calidad proteica y utilización de proteína para crecimiento (Δ peso/gProteína) para las fuentes ensayadas, en los tres grupos etarios de ratas Sprague Dawley. La realización de estos bioensayos tuvo dos propósitos particularmente importantes. Primero, estudiar el efecto de distintas formas de proteína sobre su utilización dietaria en tres grupos de edad. Segundo, comparar el efecto fisiológico del hidrolizado modificado de interés, con el encontrado para el aislado de soya (ingrediente común en alimentos para nutrición especial).

Antes de iniciar la discusión de resultados, se deben de considerar algunas premisas: La fracción enriquecida de soya (P_{1-10E}) presenta péptidos de 1 a 10 kDa con una proporción mayor de metionina covalentemente unida que la requerida para cubrir las necesidades de aminoácidos esenciales de humanos (preescolares y adultos) y ratas adultas pero no cubre la necesidad de Fenilalanina+Tirosina para rata en crecimiento (Tabla 7). El aislado de soya es una fuente de proteína íntacta no digerida a la cual se adicionó metionina libre al nivel de enriquecimiento de la fracción proteica de interés (4.33% de metionina). Este material satisface los requerimientos de los mismos grupos señalados para la fracción de interés, pero no los de rata en crecimiento siendo en este caso triptófano el aminoácido limitante.

Tabla 5 Evaluación de calidad proteica de tres dietas experimentales, evaluada en ratas Sprague Dawley a distintas edades: Registros de bioensayo ^{1,2,3}

Parámetro	21 días n=6			180 días n=6			450 días n=6		
	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE
	Peso Inicial (g)	45.12 ^a	42.27 ^a	46.42 ^a	294.00 ^a	292.83 ^a	291.83 ^a	401.44	432.54
Peso Final (g)	92.24 ^a	82.77 ^b	82.93 ^b	310.00 ^a	301.33 ^b	316.17 ^a	397.92	440.22	442.90
Perdida de peso LN (g) ⁴	4.88	4.88	4.88	29.33	29.33	29.33	42.20	42.20	42.20
Proteína consumida (g)	11.69 ^a	10.35 ^b	11.11 ^a	10.28 ^a	10.67 ^a	11.93 ^b	8.15	12.56	13.44
Perdida fecal de proteína (g)	0.57 ^a	0.82 ^b	0.50 ^a	1.44 ^a	1.76 ^b	1.92 ^c	1.38	1.78	1.63
Perdida Fm (g) ⁵	0.19	0.19	0.19	0.88	0.88	0.88	0.85	0.85	0.95
Perdida urinaria de proteína (g)	3.24 ^a	2.41 ^b	3.6 ^a	4.9 ^a	5.66 ^b	5.71 ^b	6.24	9.37	10.09
Perdida Ue (g) ⁵	0.71	0.71	0.71	1.47	1.47	1.47	2.48	2.48	2.48

¹ Grupos etarios: (1) 21 días, (2) 6 meses y (3) 16 meses

² (C): Caseína ANRC, (A): Aislado de soya + metionina libre (4.33%final), (FE): Fracción de interés (F₁₋₁₀FE)

³ Medias de 6 ratas / dieta / grupo. Distintas letras por indicador por cada grupo denotan diferencias significativas (P<0.05)

⁴ Dieta libre de nitrógeno (LN)

⁵ Perdida de Proteína por ratas asignadas a LN, (Fm) = Fecal Metabólico y (Ue) = Urinario Endógeno

a,b,c Distintas letras denotan diferencias significativas entre dietas en cada grupo (p<0.05)

Tabla 6 Evaluación de calidad proteica de tres dietas experimentales, evaluada en ratas Sprague Dawley a distintas edades: Indicadores biológicos ^{1,2,3,4}.

Parámetro	21 días			180 días			480 días		
	n=6			n=6			n=6		
	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE
Balance de Nitrógeno	8.78 ^a	8.03 ^a	7.92 ^a	7.0987 ^a	5.67 ^a	8.02 ^a	3.86	4.74	5.04
Δ peso / gProteína a 4 días	8.30 ^a	2.33 ^b	8.13 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ peso / gProteína a 10 días	3.94 ^a	3.43 ^a	3.29 ^a	1.47 ^a	0.73 ^b	2.04 ^c	0.00	0.00	0.00
Δ peso / gProteína a 14 días	3.52 ^a	3.4 ^a	3.56 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NPU	75.14 ^a	77.48 ^b	71.11 ^a	71.37 ^a	60.25 ^b	61.01 ^b	47.27	39.36	41.26
Digestibilidad Verdadera (%)	96.74 ^a	93.9 ^b	97.22 ^a	95.66 ^a	90.33 ^b	91.39 ^b	93.04	92.96	95.03
COCD ⁵	0.69 ^a	0.854 ^a	0.924 ^c	0.97 ^a	0.90 ^b	0.9139 ^b	0.93	0.93	0.95

¹ Grupos etanos: (1) 21 días, (2) 6 meses y (3)16 meses

² (C): Caseína ANRC, (A): Aislado de soya + metionina libre (4.33%/final), (FE): Fracción de interés (F_{1-16E})

³ Medias de 6 ratas / dieta / grupo. Distintas letras por indicador por cada grupo denotan diferencias significativas (P<0,05)

⁴ Cálculos para un periodo de 10 días a menos que se indique lo contrario

⁵ COCD = Calificación química corregida por digestibilidad, calculado en base a la calificación química de cada dieta para satisfacer el requerimiento de rata albina en crecimiento.

^{a,b,c} Distintas letras denotan diferencias significativas entre dietas en cada grupo (p<0,05)

ND No determinado

Tabla 7 Calificación química de las fuentes proteicas usadas en dietas experimentales, basados en lo requerimientos para humano y rata albina ^{1,2}.

Requerimiento	Caseína	Aislado + Met ³	F ₁₋₁₀	F ₁₋₁₀ E
Rata				
Crecimiento	0.71 (Met+Cis)	0.91 (Trp)	0.41 (Met+Cis)	0.95 (Fen+Trp)
Mantenimiento	---	---	---	---
Humano				
Preescolar	---	---	0.77 (Met+Cis)	---
Adulto	---	---	---	---

¹ Requerimientos estimados para rata con un consumo promedio de 12 g de dieta al 12% de proteína (NRC, 1978)

² Requerimientos para humanos para preescolares y adultos con consumos promedio de 1.10 y 0.75 g/kg de proteína de referencia respectivamente (FAO/WHO/UNU, 1991)

³ Aislado de soya + metionina libre a una concentración final de 4.33% g/100g proteína.

Por último, se tiene además caseína ANRC, una proteína intacta de origen animal sin adición de metionina libre. Esta también tiene la misma capacidad de satisfacer los requerimientos para humanos (preescolar y adulto) y rata adulta, pero no la necesidad de aminoácidos azufrados (Met+Cis) para soportar el crecimiento de ratas recién destetadas.

Registros de Bioensayos

La distribución de pesos iniciales y sexos de las ratas no fueron estadísticamente distintos ($p > 0.05$) entre dietas para cada grupo. Sin embargo, se observó una estrecha relación del sexo y peso inicial con la ingestión diaria de alimento sobre todo para los grupos 2 y 3 (ratas de 6 y 16 meses). Este fenómeno fue considerado en la estimación de las diferencias en la respuesta biológica a las tres dietas para cada grupo, incluyéndose como agentes covariantes dentro del análisis. Por otra parte, solo se observó aumento de peso durante el ensayo del grupo 1, lo cual era de esperarse ya que estos estaban en crecimiento exponencial.

Un detalle particularmente interesante es la pérdida de peso casi estandarizada (10% en 10 días) de todos los animales asignados a las dietas libres de nitrógeno, en los tres grupos etarios. Sin embargo, la respuesta metabólica al stress por la restricción proteica no fue la misma entre grupos de edad. Se observó una significativa excreción urinaria diaria de hemoglobina en los grupos de edad avanzada, siendo marcadamente superior en el grupo grupo 3 (datos no mostrados). En este mismo grupo, se observó una pérdida porcentual superior de proteína, cuerpos cetónicos y pigmentos biliares en orina.

Por otra parte, conforme avanza la edad se favoreció la eliminación de compuestos nitrogenados por vía urinaria más que por la fecal, en estado de privación proteica.

Indicadores Biológicos

Grupo No. 1. En este grupo de ratas recién destetadas, no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos presentaciones de soya ensayadas (aislado y FE) en cuanto a balance de nitrógeno y Δ peso/g Proteína consumida a los 10 y 14 días (Tabla 6). A pesar de que el aislado de soya produjo una utilización de proteína más eficiente que la fracción de interés, esta última fue tan digestible como la caseína. Esta mejoría en la digestibilidad, en comparación con la proteína de soya intacta, permitió reconocer la superioridad nutricional de la fracción de interés para satisfacer la necesidad real de proteína de la rata en crecimiento, según lo demuestra la calificación química corregida por digestibilidad (CQCD).

En experimentos paralelos con ratas de la misma edad (21 días), se estudió el efecto de la cantidad de metionina adicionada sobre el mismo aislado de soya. Se ensayaron dos concentraciones distintas de metionina (g/100g de proteína) además del 4.33% ya descrito: 7.55% y 3.36%. El NPU aumentó significativamente (a 78) en la dieta con metionina total de 7.55%, ya que una rata en crecimiento requiere 6% de metionina (NRC, 1978). En la otra dieta (con 3.36% de metionina total), el NPU no fue diferente ($p > 0.05$) al de la dieta con 4.33% de metionina ya descrita. En los tres casos la

digestibilidad del aislado de soya fue la misma independientemente de la metionina añadida. En base a esta observación y al valor de NPU y digestibilidad encontrados para la fracción de interés, esto nos permite afirmar que la incorporación covalente de metionina a la molécula es la responsable de la mejoría en la digestibilidad. Aunado a lo anterior, desde el punto de vista tecnológico, la incorporación covalente de aminoácidos, es mejor que la adición de aminoácidos libres ya que éstos últimos provocan sabores desagradables y se pueden perder durante almacenamiento y/o procesamiento de alimentos (Arai *et al.*, 1978).

En otra evaluación biológica realizada en nuestro laboratorio (Calderón de la Barca *et al.*, 1999b), se ensayaron una fracción con menor peso molecular sin enriquecer ($F_{0.5,3}$) y una de mayor peso molecular pero enriquecida ($F_{>3}E$), producidas de la misma fuente proteica. El NPU de nuestra fracción actual ($F_{1.10}E$) resultó superior a estas últimas (64.7 y 64.4 respectivamente). Grimble y colaboradores (1986) reportan que la absorción individual de aminoácidos en péptidos de bajo peso molecular (<4 aminoácidos) es superior a la observada con péptidos de alto peso molecular (>4 aminoácidos). Estos argumentos nos permiten predecir que una combinación correcta de péptidos menores y el enriquecimiento de los mismos, mejorará sustancialmente el valor biológico de la proteína. Quizás se pueda llegar a una fracción comparable a proteínas consideradas como de alto valor nutricional como la de huevo intacta o hidrolizada (Gutiérrez *et al.*, 1998).

Grupo No. 2. Este grupo fue incluido en el diseño experimental con el propósito de evaluar el efecto de la fracción proteica de interés en el mantenimiento de ratas adultas.

La ventaja de este grupo es la madurez digestiva suficiente para evaluar mantenimiento, pero sin las alteraciones catabólicas propias del envejecimiento (como las del grupo 3). Otra razón de su inclusión estuvo relacionada con el tipo de alimentación que recibían los animales de este grupo y los del grupo 3 (adultas seniles). Antes de su ingreso a las instalaciones del CIAD, desde su nacimiento estas ratas fueron alimentadas con pellets comerciales, cuya formulación incluía pasta de soya como una de las fuentes proteicas. Aunque la concentración de pasta de soya en esta formulación era baja, la presencia de compuestos antifisiológicos en esta dieta inicial, podría enmascarar el efecto nutricional real de las dos dietas de soya (aislado y FE). Dado a que se esperaría un deterioro en la capacidad absorbente intestinal en las ratas seniles (grupo 3), el grupo 2 pretendió ser un control al no tener el mismo grado de disfunción intestinal de grupo 3.

En este grupo 2, no se observaron diferencias significativas entre los animales de las dietas con la fracción de interés y el aislado de soya ($p > 0.05$) para NPU, DV y calificación química corregida por digestibilidad, pero sí al compararse con los de caseína. Este efecto puede atribuirse al tipo de alimentación previa que recibían los animales antes del bioensayo. Los factores antifisiológicos activos, pudieron haber inducido inhibición de la secreción del páncreas o respuesta inmunogénica a proteínas de soya (Gumbmann y Friedman, 1987; Hajós y Gelencser, 1995; Dreau *et al.*, 1994). El mejor balance de nitrógeno se observó en las ratas alimentadas con FE en comparación con A, pero este no fue distinto al encontrado para caseína ($p > 0.05$).

De esto inferimos de nuevo que, la ausencia de factores antifisiológicos en la fracción de interés dio un mejor efecto al observado para el aislado, el cual contiene factores antifisiológicos activos. Nielsen *et al.* (1994), realizaron un bioensayo con ratas Wistar (hembras) del mismo peso y edad que en nuestro estudio, con dietas de caseína intacta e hidrolizados de caseína y proteína de soya (0.3 a 3 kDa). Las tres dietas al 8% de proteína produjeron el mismo balance de nitrógeno a expensas de distinto recambio proteico endógeno. Dado que este efecto fue similar al encontrado en nuestro caso entre caseína y la fracción de interés (F₁₋₁₀E), se puede inferir que el enriquecimiento no altera la utilización nutricional de la proteína de soya, en el mantenimiento de ratas adultas.

Grupo No. 3. El criterio de selección de los animales en este grupo se basó primordialmente en su desgaste funcional. Algunos estudios de envejecimiento señalan que una edad de 18-20 meses en ratas Sprague Dawley, corresponde a la senectud (Sarwar y Peace, 1994). Otros autores fundamentan el envejecimiento en base al desgaste físico que presentan los animales (NRC, 1981; Reville *et al.*, 1991; Holt *et al.*, 1984). Dado que nuestras exigencias se basaban principalmente en el comportamiento digestivo y metabólico y al alto costo de las ratas de 20 meses de edad (150 dólares cada una aproximadamente), consideramos una edad de 16 meses para las evaluaciones dietarias. Si bien es cierto que tal edad las podría clasificar como adultas maduras, su índice de mortalidad, su comportamiento social y sedentarismo correspondían a ratas envejecidas.

La fracción de interés y el aislado de soya tuvieron un efecto similar en NPU, el cual fue estadísticamente mayor para el grupo de caseína. Por el contrario, el balance de

nitrógeno calculado, favoreció a ambas dietas de soya. Esto se explica por el marcado aumento en la excreción urinaria y fecal de nitrógeno producido por las dietas de soya como se puede observar en la Tabla 5. Existen evidencias que indican que la velocidad de síntesis y degradación proteica en enterocitos, declina conforme avanza la edad (Merry *et al.*, 1992), por lo que es razonable pensar que el aumento significativo de la proteína fecal es consecuencia de la baja utilización dietaria de la proteína de soya. Sin embargo, a pesar de esta eliminación elevada, es claro que al mantenerse el balance de nitrógeno positivo (mayor en el caso de la fracción de interés) la respuesta podría ser una mayor dinámica en la utilización endógena de esta forma de proteína. Este hecho aunado a una mejor digestibilidad de la fracción que para el aislado, nos permite asegurar que la fracción de interés provoca un mejor efecto en el equilibrio nitrogenado del organismo senescente.

Eliminando el posible efecto que tiene la naturaleza de la proteína, si comparamos los datos obtenidos del grupo 3, con los de los grupos 1 y 2, observamos una mejoría sustancial en la digestibilidad y calificación de aminoácidos corregida para todas las dietas. Sarwar y Peace (1994) reportan digestibilidades (relativas a una caseína +metionina con digestibilidad del 95%) para varios productos enterales comerciales que variaban del 94 al 98% en ratas de 18 meses. La digestibilidad de FE (relativa a la caseína ensayada) fue del 100%, lo que apoya la idea de que FE es una mejor alternativa en la formulación de productos geriátricos. Además, tiene una eficacia comparable al aislado (proteína generalmente incluida en las formulas enterales) para el mantenimiento de personas adultas.

Respuesta Post-Prandial de Aminoácidos Plasmáticos y Urea

Desde un punto de vista nutricional, las concentraciones de aminoácidos plasmáticos deben reflejar el balance entre su entrada a la sangre vía alimentación y el catabolismo de proteínas endógenas y su salida hacia los tejidos para síntesis (Abumrad *et al.*, 1995). Cuando esta dinámica se estudia en animales, el patrón de respuesta puede no ser fidedigno, debido al desorden en la ingestión, pasando de ser una estimación cuantitativa, un dato meramente estimativo (Harper, 1968). En esta tesis no se pretendió estudiar el declinamiento en la concentración de aminoácidos plasmáticos en intervalos de tiempo como en la mayoría de los estudios con aminoácidos plasmáticos. Solo estandarizamos la ingestión y la respuesta plasmática a las dos horas en todos los grupos, para de esta manera inferir alguna respuesta relacionada con la ingestión de las proteínas de prueba. Por lo tanto, el análisis que se presenta a continuación se basará en mediciones puntuales para cada grupo y cualquier correlación encontrada con las dietas suministradas, necesariamente debe sustentarse *a posteriori* con estudios más especializados (Ej. recambio proteico).

Dado que todas las muestras de plasma colectado de cada rata no estuvieron sujetas a ningún tipo de hidrólisis (solo se precipitaron con ac. sulfosalicílico), se modificaron y estandarizaron las condiciones cromatográficas descritas por Vazquez *et al.* (1995) para incluir Asn, Gln y Trp; dichas condiciones se presentan en la Tabla 8. La concentración promedio (6 ratas/dieta/grupo) de aminoácidos (por este método) y urea (kit cinético) plasmáticos expresados en $\mu\text{moles/L}$, se enlistan en la tabla 9.

Tabla 8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de aminoácidos: Orden de elución, tiempos de retención y gradientes de la fase móvil ¹.

Aminoácido	Orden de Elución	Tiempo de Retención	Fase Móvil (%)	
			Solvente A ²	Solvente B ³
		0.00	100	0
		0.50	80	20
Ac. Aspartico	1	2.03	80	20
Ac. Glutámico	2	2.85	80	20
Asparagina	3	4.56	80	20
Serina	4	5.58	80	20
Glutamina	5	6.44	80	20
Histidina	6	6.70	80	20
Glicina	7	9.14	80	20
Treonina	8	9.65	80	20
		10.00	50	50
Arginina	9	10.12	50	50
Alanina	10	11.08	50	50
Tirosina	11	11.23	50	50
Estándar Interno ⁴	12	12.20	50	50
Triptófano	13	13.15	50	50
Metionina	14	13.41	50	50
Valina	15	13.80	50	50
Fenilalanina	16	14.54	50	50
Isoleucina	17	16.59	50	50
Leucina	18	16.96	50	50
		18.00	20	80
Lisina	19	18.09	20	80
		20.00	0	100
		23.00	100	0

¹ Modificación al método reportado por Vazquez, et al. (1995) incluyéndose Gln, Asn y Trp para cuantificación de aminoácidos plasmáticos (muestras no hidrolizadas).

² Buffer de acetato de sodio 0.1M + Tetrahidrofurano 1% (pH 6.2)

³ Metanol CLAR

⁴ Ac. alfa-aminobutírico

Tabla 9 Concentración postprandial de urea y aminoácidos plasmáticos en ratas a tres edades alimentadas con caseína, aislado de soya y F₍₁₋₁₀₎E como únicas fuentes proteicas^{1,2,3}.

Aminoácido	(1) 21 días			(2) 180 días			(3) 480 días		
	C	A	EEM ⁴	C	A	EEM ⁴	C	A	EEM ⁴
Ac. Aspártico	13.7 ^a	9.1 ^a	12.4 ^a	7.4 ^a	9.5 ^a	0.99	6.0 ^a	6.6 ^a	10.5 ^a
Ac. Glutámico	164.8 ^b	112.1 ^b	129.0 ^{bc}	193.0 ^a	140.4 ^b	7.91	119.4 ^a	92.4 ^b	104.4 ^{bc}
Asparagina	41.3 ^{bc}	53.1 ^b	27.1 ^c	37.7 ^a	35.5 ^a	9.49	53.3 ^a	78.9 ^a	45.9 ^a
Serina	504.1 ^a	393.7 ^b	359.0 ^b	524.4 ^a	361.1 ^b	100.13	318.6 ^a	400.9 ^a	300.5 ^a
Glutamina	492.7 ^a	365.0 ^b	387.5 ^b	451.4 ^a	419.0 ^a	37.36	320.5 ^a	311.3 ^a	326.9 ^a
Histidina	169.5 ^a	151.3 ^{bc}	131.4 ^c	172.7 ^a	186.1 ^a	14.17	186.6 ^a	181.3 ^a	118.5 ^b
Glicina	460.6 ^a	456.5 ^a	451.8 ^a	553.4 ^{bc}	593.3 ^a	42.77	449.9 ^a	314.1 ^a	411.0 ^a
Treonina	178.7 ^a	63.6 ^b	70.1 ^b	101.2 ^a	104.8 ^a	5.08	175.3 ^a	117.5 ^a	264.7 ^a
Arginina	119.1 ^a	42.4 ^b	45.7 ^b	67.5 ^a	69.9 ^a	3.35	25.4 ^a	78.3 ^a	10.7 ^a
Alanina	891.0 ^a	729.4 ^a	247.5 ^b	1129.7 ^a	885.1 ^b	51.70	487.9 ^a	867.9 ^a	756.0 ^a
Tirosina	134.0 ^a	145.5 ^a	489 ^a	77.2 ^a	73.2 ^a	17.90	91.5 ^a	114.9 ^a	86.4 ^a
Triptófano	82.6 ^a	70.4 ^a	32.6 ^b	52.8 ^a	47.6 ^a	2.26	37.6 ^a	45.5 ^a	43.9 ^a
Metionina	85.8 ^a	33.47 ^b	54.5 ^b	46.1 ^a	42.0 ^a	3.42	36.12 ^a	30.15 ^a	40.5 ^a
Valina	137.5 ^a	95.5 ^a	84.5 ^a	107.3 ^a	76.7 ^b	3.07	121.92 ^a	119.5 ^a	81.0 ^b
Fenilalanina	56.2 ^a	54.9 ^a	50.6 ^a	53.1 ^a	42.0 ^b	1.78	70.1 ^a	55.2 ^a	68.9 ^a
Isoleucina	102.4 ^a	73.6 ^b	56.0 ^c	97.9 ^a	86.1 ^{bc}	5.55	93.7 ^a	80.7 ^a	53.9 ^b
Leucina	47.3 ^a	46.2 ^a	15.6 ^b	28.9 ^a	32.4 ^a	7.93	125.1 ^a	85.0 ^a	63.3 ^b
Lisina	1280.2 ^a	590.2 ^b	192.7 ^c	590.7 ^{bc}	792.6 ^a	66.67	446.1 ^a	521.5 ^a	493.8 ^a
Aminoácidos totales	5094.2 ^a	3669.9 ^b	3140.4 ^b	4483.1 ^a	4535.3 ^a	247.90	3789.2 ^a	3779.6 ^a	4232.4 ^a
AA Esenciales (AAE)	1916.1 ^a	1131.0 ^b	586.3 ^c	1080.2 ^{bc}	1291.0 ^a	90.44	1378.6 ^a	1023.6 ^b	1215.4 ^{bc}
AAE:AAE ⁵	3.5 ^{bc}	2.9 ^a	4.2 ^c	4.4 ^a	6.4 ^b	0.41	2.2 ^{bc}	1.6 ^a	2.7 ^c
AA Básicos ⁶	1575.6 ^a	726.6 ^b	427.4 ^c	830.9 ^{bc}	1028.6 ^a	81.55	942.8 ^a	765.3 ^a	873.7 ^a
AA Ácidos ⁶	3739.6 ^a	3087.8 ^a	2997.8 ^a	3652.3 ^a	3478.0 ^b	203.05	2846.6 ^a	3006.2 ^a	2997.1 ^a
Urea	3.4 ^a	2.9 ^a	3.2 ^a	8.6 ^a	8.3 ^{bc}	0.37	7.9 ^a	9.0 ^{bc}	6.6 ^b

¹ Concentración en $\mu\text{moles/L}$ a las 2hrs

² (C): Caseína ANRC. (A): Aislado de Soya + Metonina libre (4.33%). F(1-10) E: Fracción hidrolizada y enriquecida con metonina (4.33%)

³ Ratas Sprague Dawley (n=6/dieta/grupo etario) : Grupo 1= 21 días; Grupo 2= 5 meses; Grupo 3=16 meses

⁴ EEM = Error estándar medio

⁵ AA:EE (Aminoácidos no esenciales) : AAE (Aminoácidos esenciales) = Glicina / Leucina + Valina (Gibson, R.S., 1990)

⁶ Formas ionizadas a pH plasmático (7.4) : Básicos (Lis, Arg, His), Ácidos (los demás).

***: Diferentes letras entre dietas por grupo denota diferencias significativas (p < 0.05)

A continuación detallaremos los aspectos mas importantes derivados de esta información:

Urea Plasmática

De manera muy general la urea plasmática, refleja el catabolismo proteico y por ende el fin de la utilización de aminoácidos endógenos o dietarios. Fisiológicamente, su homeostasis depende de su ciclo y la circulación entero-hepática de urea formada. En el ciclo de la urea están involucrados algunos compuestos de interés como citrulina, aspartato, arginina, glutamina y el ion amonio. Pareciera fácil entonces pensar que los aminoácidos dietarios que sufren más rápidamente desaminación, tendrán algún mejor efecto en la concentración de urea (Lehninger, 1993).

Aparentemente hay una relación directamente proporcional entre la concentración de urea plasmática y la edad, ya que en promedio se obtuvieron concentraciones de 3.2, 7.9, 8.9 para los grupos 1 2 y 3, respectivamente. Aunque hubo diferencias significativas en la concentración de urea entre dietas para los grupos 2 y 3, no se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) para el grupo 1. Rubio y colaboradores (1998) reportan que la pasta de soya provoca una elevación de urea plasmática de 2.8 mmol/L en ratas Hooded-Lister recién destetadas. En nuestro caso, la elevación plasmática de urea para las ratas del grupo 1 fué de 2.9 y 3.2 mmol/L para el aislado y FE respectivamente a casi el mismo nivel de retención de nitrógeno, por lo que posiblemente la elevación plasmática de urea deba tener relación con la digestibilidad total de nitrógeno y la forma de la proteína dietaria. Por otra parte, su elevación no se

relaciona tampoco con las concentraciones plasmáticas de arginina y glutamina en ninguno de los grupos. Como ya mencionamos en anteriores secciones, la síntesis y degradación de proteínas en tejidos periféricos declina con el paso de la edad, por lo que esta elevación pudiera deberse a una mejor circulación entero-hepática y no a síntesis *de novo*.

Aminoácidos Básicos y Ácidos

A nivel intestinal, existen distintos mecanismos de transporte de nutrimentos generalmente asociados con el carácter hidrofóbico/hidrofílico o ácido-básico de las moléculas a absorber. Algunos autores utilizan este último sistema para estudiar las relaciones existentes en el perfil de aminoácidos de proteínas dietarias y la capacidad de absorción intestinal (Harper, 1968). Ahora bien, teniendo en cuenta que el pH intestinal y plasmático es similar, es posible inferir sobre la respuesta plasmática de cualquiera de estos grupos de aminoácidos y los posibles mecanismos de absorción involucrados. Las formas básicas (AABa) a pH fisiológico están representadas por los aminoácidos lisina, arginina, histidina. Los demás se encuentran en forma ácida (AAAc) (Lehninger, 1993).

No existieron diferencias significativas ni entre dietas ni entre grupos para la elevación plasmática de AAAc. La mayor proporción plasmática de AABa lo exhibieron los grupos de caseína, y su elevación parece estar relacionada con la edad como en el caso de la urea. Este fenómeno podría deberse a que si hay mayor proporción de aminoácidos con grupos amonio ionizables, estos serán liberados provocando una mayor biodisponibilidad y estimulando con esto la producción de urea, cuando la

necesidad energética-protéica sea mínima (Adelman y Deekker, 1985; Abumrad *et al.*, 1995).

En un experimento paralelo al bioensayo del grupo 1 (datos no mostrados) se realizaron determinaciones de urea urinaria en tres días distintos y se buscó su relación con la cantidad de proteína ingerida en cada período. Se encontró una estrecha relación entre la cantidad excretada y el tipo de dieta, siendo caseína la de mayor efecto. Esto, aunado a la observación anterior nos permite inferir que existe una relación directa entre el perfil de aminoácidos de la proteína dietaria, la respuesta plasmática de AABA y la elevación de urea plasmática (Bender, 1985).

Aminoácidos Esenciales y No Esenciales

Un aminoácido esencial es aquel que no puede ser sintetizado por el organismo en cantidades adecuadas para satisfacer las necesidades de síntesis de proteína corporal. La presencia de cantidades inadecuadas (superiores o inferiores) de aminoácidos esenciales provoca balances de nitrógeno negativos, debido a que el catabolismo normal de las proteínas continúa pero la síntesis es limitada, aún cuando la ingestión de proteína sea adecuada (Bender, 1985). Salvo en el grupo 2, la caseína parece aportar la mayor cantidad de estos aminoácidos, en comparación con las dietas de soya.

Además de los aminoácidos estrictamente esenciales, también son importantes para infantes y animales jóvenes la histidina y arginina debido a que su velocidad de biosíntesis es pobre para soportar crecimiento (NRC, 1978; Lehninger, 1993). De nuevo, la caseína produjo la mayor elevación de estos aminoácidos en plasma, en comparación

con las otras dietas en todos los grupos. Sin embargo, la elevación plasmática de estos aminoácidos no se correlacionó con su contenido en las fuentes proteicas ensayadas, en todos los casos.

Bajo condiciones especiales, la demanda de aminoácidos no esenciales puede ser mayor a la capacidad biosintética y por lo tanto ser temporalmente esenciales (Cunningham, 1992). Aunado a lo anterior, algunos autores señalan que la correcta utilización de los esenciales depende en gran manera de los no esenciales, y por lo tanto es posible mantener un balance de nitrógeno aceptable. (Baldwin y Grimminger, 1985; Dutra de Oliviera, *et al.*, 1998). En la mayor parte de los grupos etarios, la fracción de interés parece lograr una mejor proporción de aminoácidos no esenciales: aminoácidos esenciales.

Metionina

El propósito fundamental de nuestro trabajo fue el estudiar el efecto de una fracción enriquecida con metionina (F_{1-10E}) sobre su asimilación dietaria en los tres grupos. La elevación plasmática de metionina es particularmente importante ya que fue la que se unió covalentemente a la fracción de interés. Además, la biodisponibilidad de este aminoácido (junto con cisteína que no pudo ser cuantificada) es importante para la promoción del crecimiento animal (Grupo 1).

Además, la metionina interviene en procesos de metilación y remoción de radicales libres (Dutra de Oliviera *et al.*, 1998; Bender, 1985). La cantidad de aminoácidos azufrados totales en las proteínas ensayadas era de 4.33, 4.33 y 3.03 g/100g

de proteína para F_{1-10E}, aislado + metionina y caseína respectivamente. La elevación plasmática de metionina se debe a la forma en que esté presente en la proteína ensayada mas que a la cantidad total de la misma. Zijlstra y colaboradores (1996), mencionan que la presentación de metionina en péptidos en comparación a su misma concentración pero en proteína intacta, provoca una mayor elevación de este aminoácido a los 120 minutos. Del 4.33 % de metionina total en el aislado, solo el 1.18% estaba covalentemente unida y el 3.15 restante en forma libre. Esto ubica al aislado como el más pobre de metionina unida, seguido de caseína y luego la fracción enriquecida. La respuesta plasmática fué directamente proporcional al contenido de metionina para las dietas ensayadas en los grupos 2 y 3. Este comportamiento varió para el grupo 1 donde la elevación fue mayor para caseína, seguido por la fracción de interés (FE) y por último el aislado de soya. Bender (1985) afirma que existe una bioconversión dinámica entre la Met-Cis durante el crecimiento, por lo que la disminución de Met para el grupo 1, alimentados con FE haya sido temporal, y por lo tanto el nivel de cisteína (aminoácido no cuantificado) haya estado elevado.

Glicina y Glutamina

Estos aminoácidos son de especial importancia porque constituyen piezas claves en el metabolismo. La glicina (Gli) generalmente es usada en estudios de recambio proteico por tener la capacidad de “marcar” la reserva de aminoácidos corporales y dietarios una vez que estos entran en la dinámica de síntesis y degradación proteica (Matthews *et al.*, 1981). La naturaleza de este aminoácido y su participación en

mecanismos metabólicos relativamente sencillos lo hace un elemento particularmente importante en la donación de grupos α -amino. Por su parte, la glutamina (Gln) es un metabolito intermediario indispensable en mecanismos biosintéticos de diversa índole (gluconeogénesis y síntesis de purinas).

Los patrones de distribución plasmática para Gli y Gln no mostraron correlación con la edad. La elevación promedio (todas las dietas) de Gli fué mayor en el grupo 2 (562 $\mu\text{mol/L}$) pero semejante entre los grupos 1(456 $\mu\text{mol/L}$) y 3 (392 $\mu\text{mol/L}$). Este mismo efecto se observó para Gln (451, 280 y 320 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente). Mientras que para Gli se observaron diferencias significativas ($p < 0.005$) entre el aislado de soya (A) y la fracción de interés (FE) suministradas al grupo 2, para Gln solo se observó diferencia, aunque más baja, en el grupo 1. Decsi y colaboradores (1998), reportan que dos fórmulas infantiles cuya única diferencia era la forma intacta e hidrolizada de la caseína utilizada en su formulación, producían la misma respuesta plasmática de aminoácidos en infantes a los 5, 30, 60, 90 y 120 días. En nuestro caso, la composición porcentual de estos aminoácidos en las proteína de soya intacta (A) e hidrolizada (FE) y su respuesta plasmática a las 2 h es similar, esto nos permite señalar que el metabolismo de ambos aminoácidos dietarios, no sufre alteración alguna por la hidrólisis y síntesis enzimática en FE.

En conclusión, el significado biológico que justifica estudiar a los aminoácidos plasmáticos es la de asegurar su biodisponibilidad para síntesis de proteínas. Para observar esto, se recurren a mediciones continuas por espacios no mayores de 2 a 3 h. Las mediciones que aquí se realizaron fueron exactamente a las dos horas, tiempo

considerado como suficiente para asegurar niveles plasmáticos estacionarios. Las diferencias entre dietas (por grupo) a las dos horas, nos permitieron inferir sobre el posible nivel basal que cada aminoácido tenía a tiempo cero. Aunque inferir la eficiencia de una proteína por medio de su respuesta plasmática tiene sus limitaciones, el comportamiento observado en todos los grupos revela información valiosa sobre el efecto de los procesos de modificación enzimática de la proteína de interés, en comparación a la forma y presentación de las proteínas para las otras fuentes ensayadas.

Digestibilidad Aparente Ileal-Yeyunal y Fecal

La inclusión del método de digestibilidad con marcador indigestible (Cr_2O_3), tuvo varios propósitos: (a) Corroborar la exactitud del método de digestibilidad verdadera (DV) y digestibilidad fecal de nitrógeno (DFN) estimada para los distintos grupos etarios, (b) observar las diferencias y comportamiento de cada aminoácido por nivel de absorción, (c) revelar cualquier fenómeno de adaptación fisiológica producida con la edad para la absorción de cada aminoácido y sección intestinal específicos y (d) correlacionar la eficiencia en absorción con la respuesta plasmática de cada aminoácido.

En la Tabla 10 se muestran los porcentajes de digestibilidad yeyunal, ileal y fecal para las 3 dietas ensayadas en los 3 grupos etarios. Como puede observarse de esta, los porcentajes de digestibilidad para cada aminoácido no difieren de manera significativa en cada nivel de absorción y grupo etario, dado que las proteínas ensayadas eran altamente digestibles (ver digestibilidad verdadera en Tabla 6). Sin embargo, existen ciertas particularidades que deben denotarse, las cuales se explican a continuación.

Tabla 10 Digestibilidad aparente yeyunal, ileal y fecal de aminoácidos y nitrógeno en ratas Sprague Dawley alimentadas con Caseína (C), Aislado de Soya (A) y F_(1:10) E (FE) a tres edades distintas^{1,2}.

Aminoácido	Concentración (g/100g Proteína)			Digestibilidad yeyunal ³						Digestibilidad ileal						Digestibilidad fecal											
	C ³		A ⁴	FE	180 días		480 días		180 días		480 días		21 días		180 días		480 días		21 días		180 días		480 días				
	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE	C	A	FE			
Ac. Aspártico	7.4	12.1	10.4	89	91	92	90	86	89	96	95	96	93	92	93	95	95	98	96	94	95	89	91	92	95	90	94
Ac. Glutámico	19.9	22.8	18.8	86	91	90	86	86	89	98	96	96	96	92	94	96	94	97	97	95	96	93	94	92	91	92	93
Serina	5.2	4.8	2.5	95	93	94	89	88	84	94	96	94	94	93	95	94	95	93	96	95	95	87	89	90	96	91	92
Histidina	2.5	1.9	2.7	89	93	93	86	86	87	95	97	95	96	94	95	94	95	96	97	95	96	93	90	89	92	92	93
Glicina	1.6	5.0	4.5	94	92	89	97	84	85	97	98	95	95	92	94	94	92	96	96	97	93	87	87	85	94	94	94
Treonina	3.1	3.9	5.9	95	87	92	88	85	86	96	91	97	94	89	91	93	92	94	98	92	97	87	79	88	91	97	94
Arginina	3.0	7.7	4.0	88	86	91	87	91	89	95	94	98	92	90	92	95	94	95	96	90	97	90	93	91	94	89	93
Alanina	2.8	5.7	3.8	92	88	92	83	85	86	85	94	96	93	91	93	92	93	94	95	94	98	89	86	90	90	85	95
Tirosina	5.0	3.5	3.1	92	89	92	86	84	88	94	95	97	91	92	94	96	97	97	97	94	97	92	89	90	96	87	94
Metionina	3.9	4.3⁵	4.3	91	92	93	86	84	86	98	96	98	95	93	95	96	95	98	96	95	98	94	85	91	94	92	96
Valina	4.8	5.3	4.4	93	90	88	88	85	88	96	97	94	92	91	93	92	93	98	96	95	96	91	86	88	96	91	96
Fenilalanina	4.6	5.8	3.2	89	89	90	86	84	84	94	96	96	94	91	92	92	91	96	97	95	94	94	87	90	95	92	94
Isoleucina	3.9	5.0	6.9	93	86	89	91	84	86	95	98	93	93	89	92	94	92	96	99	97	98	92	90	91	94	87	95
Leucina	8.4	8.5	5.7	90	91	90	90	82	86	98	94	95	93	92	91	95	92	95	97	92	96	94	90	90	93	86	95
Lisina	6.9	6.4	11.9	91	86	92	91	86	88	97	93	95	94	92	90	94	92	97	95	96	97	95	92	92	95	82	94
Nitrógeno⁷	14.7	14.4	10.9	90	90	91	88	86	87	96	95	96	94	92	93	95	93	96	97	94	96	92	90	91	93	90	94

¹ Cálculo de digestibilidad con Cr₂O₃ como marcador indigestible (Donkoh y Moughan, 1984); ² ratas/rotatorrumento

³ Media de tres réplicas

⁴ Keith y Bell, 1983

⁵ Calderón de la Barca et al. 1995b.

⁶ Digestibilidad yeyunal para gpo. 1 no fue calculado

⁷ 1.18 (contenido original) + 3.12 (metionina libre)

⁸ Estimado por el contenido y % de digestibilidad de cada uno de los 15 aminoácidos cuantificados, en cada sección de intestino

La correlación existente entre la DV y la digestibilidad fecal de nitrógeno (DFN) es alta para todos los grupos ($r = 0.998$). Hay que recalcar que DFN es un estimador calculado en base al contenido y porción digestible (a cada nivel de absorción) de cada uno de los 15 aminoácidos cuantificados en las proteínas ensayadas. Mientras que la digestibilidad ileal (DIN) y fecal (DFN) de nitrógeno, son buenos indicadores de absorción en las ratas en crecimiento (21 días), DFN subestima a DIN en las ratas adultas (180 días) y seniles.

Por lo tanto, este último indicador se supone más realista en la valoración de la absorción real de las proteínas de prueba particularmente para este último grupo (Donkoh y Moughan, 1994), donde también se observa disfunción yeyunal.

El proceso de absorción yeyunal se vio reducido en las ratas del grupo 3 en comparación al del grupo 2. Reville y colaboradores (1991), encontraron que existe un fenómeno de adaptación ileal a la disfunción yeyunal en ratas Wistar de edad avanzada. Este fenómeno de incapacidad yeyunal obedece a varios factores: disminución de la capacidad absorbente por deficiencias epiteliales y/o superficie absorbente (Holt *et al.*, 1984), reducción en la capacidad reguladora (Poullain *et al.*, 1991) y una lenta actividad y regeneración de la superficie entérica (Ferraris y Vinakkota, 1993). Por su parte el íleon responde incrementando su velocidad de regeneración celular, aumentando la superficie absorbente y actividad de hidrolasas y transportadores. En nuestro caso, mientras que en las ratas de 180 días se conseguía un 2-5% más en la absorción individual de aminoácidos en íleon al ya alcanzado a nivel de yeyuno,

esta misma absorción ileal es mayor (7-9%) en el grupo 3, consistente con una disminución en la absorción yeyunal de un 2-4% observado entre los grupos 2 y 3 .

Al comparar la digestibilidad de cada aminoácido del aislado de soya , con la observada en las ratas del alimentadas con FE en el grupo 3, esta última fue mejor tanto a nivel de yeyuno como de ileon. Este hecho nos hace suponer que la absorción y transporte transepitelial de aminoácidos es preferentemente en forma de péptidos más que de aminoácidos libres. Esto se debe a que la distribución de transportadores para estos últimos, se restringen a la porción proximal del intestino (yeyuno), mientras que los transportadores de péptidos están distribuidos a todo lo largo del mismo (Leichbach y Ganapathy, 1996).

Para el caso del aislado de soya (A), aunque también se presenta fenómeno de adaptación ileon-yeyuno, el comportamiento en la absorción individual de aminoácidos es más variable que para FE. En el aislado de soya, además de que la proteína es integral, hay compuestos antifisiológicos como los inhibidores de proteasas, que generan una respuesta distinta en la secreción y actividad de diversas enzimas (Reseland *et al.*, 1996). Es por esto posiblemente que los péptidos formados por la degradación del aislado (A), parecen tener una absorción similar a la de FE a nivel yeyunal pero no ileal, ya que la acción antifisiológica e inactivación enzimática se da principalmente en la porción distal (ileon) del intestino (Pusztai *et al.*, 1997; Ferraris *et al.*, 1988).

De forma general la absorción de aminoácidos de FE es superior a la del aislado (A) y caseína (C) en todos los niveles de absorción. Grimble y colaboradores (1986), compararon la eficiencia en la absorción yeyunal de dos hidrolizados de bajo (< 4

residuos) y alto peso molecular (>4 residuos) de lactalbumina, encontrando que la velocidad de absorción de aminoácidos del primero es mucho más rápida. Poullain y colaboradores (1989 y 1991), por su parte, estudiaron el efecto fisiológico de la proteína de lactosuero intacta y en forma hidrolizada (péptidos entre 1-10 kDa) en ratas normales y desnutridas, observando un mejor efecto en balance nitrogenado, velocidad de absorción y recuperación nutricia con la solución de péptidos en ves de la proteína intacta.

Por otra parte, la absorción ileal de metionina (Met) guardó una relación muy estrecha con su elevación plasmática en todos los grupos etarios y dietas suministradas. Aunque este efecto sea resultado de complejos mecanismos reguladores, es posible que el contenido y forma unida de la metionina en cada proteína sea muy determinante. Una posible causa es la relación de metionina:cisteína presente en cada proteína; teniendo en cuenta que la mayor proporción de metionina en el aislado de soya venía en forma libre, esto limitará el equilibrio 3:1 de Met:Cis, sugerido para un buen metabolismo y absorción de metionina (Pszczola, 1999), en tanto que la mayor parte de la metionina libre se absorbe en la porción proximal del intestino, mientras que la cisteína y metionina covalentemente unidas se absorberán mejor a nivel distal. Es por esto posiblemente que la digestibilidad de Met para el aislado en todos los grupos etarios fue menor. Además, la absorción intestinal y distribución portal de aminoácidos azufrados, provoca distinta activación de enzimas hepáticas para cada proteína ensayada dependiente de su relación de aminoácidos azufrados: no azufrados. Lo anterior ocasiona distinta disponibilidad plasmática y cinética en su utilización, por activación de

diversas enzimas como la cistein- dioxigenasa y γ -glutamilcisteínsintetasa (Bella *et al.*, 1999).

La absorción total de nitrógeno a su vez guarda una relación estrecha con la elevación de urea plasmática en todos los grupos. Como se señaló en una sección anterior, la urea refleja de alguna manera la utilización y catabolismo de aminoácidos. En este estudio, la mayor digestibilidad de nitrógeno y aminoácidos observadas para las dietas de caseína y FE, fueron directamente proporcionales a la elevación total de aminoácidos plasmáticos y urea.

Este efecto es consistente, aunque menor, con el observado para las dietas de aislado en los tres grupos etarios.

Finalmente, la digestibilidad de aminoácidos y nitrógeno de FE son superiores para el Grupo 3 en comparación al aislado de soya, a cualquier nivel de absorción. Este hecho es consistente con el observado para el valor de digestibilidad verdadera reportado en la tabla 7. Si tomamos en cuenta que la degeneración yeyunal es un proceso natural que acompaña a la vejez y que en la edad muy avanzada o en condiciones patológicas, el ileón puede tener capacidad absorptiva reducida (Poullain *et al.*, 1991), esto nos conduce a afirmar que la FE podría ser una mejor alternativa en la alimentación geriátrica.

Por otra parte, Rubio y colaboradores (1998) reportan digestibilidad ileal y fecal (con Cr_2O_3) de 85.4 y 82.8% respectivamente para pasta de soya, ensayada en ratas Hooded-Lister recién destetadas; estas digestibilidades son menores para el aislado y todavía menos en FE en las ratas recién destetadas de nuestro estudio. Este hecho está directamente relacionado con la cantidad y actividad a nivel de ileon (Pusztai *et al.*,

1997), de compuestos antifisiológicos presentes en la pasta y aislado y la reducción significativa en FE. Lo anterior permite asegurar que nuestra fracción de interés también es una buena opción en la formulación de alimentos infantiles para nutrición especial.

CONCLUSIONES

El enriquecimiento enzimático de la proteína de soya por medio de hidrólisis y síntesis enzimática, tiene varias ventajas. Primeramente, la utilización de pasta de soya como materia prima reduce significativamente el costo de producción de proteínas "ideales" como el aislado de soya. La fraccionación por ultrafiltración de la proteína hidrolizada diversifica la utilización de fracciones peptídicas en la formulación de distintos alimentos. Además, el fraccionamiento peptídico trae ventajas funcionales, tecnológicas y nutricionales que permiten formular alimentos atractivos para distintos grupos con necesidades nutricias especiales. Desde el punto de vista biológico, se hace necesario resaltar que el proceso de enriquecimiento enzimático con metionina aumenta el valor nutricional de la proteína, al mejorar su digestibilidad. La adición covalente de metionina, mas que su adición libre a proteínas de soya, permite mejorar la calidad nutricional (CQCD), haciéndola comparable a proteínas de reconocida calidad como el huevo.

Aunque F_{1-10E}, representa una buena alternativa para la formulación de productos para diversos grupos etarios, es particularmente buena alternativa en alimentos geriátricos. Mantiene el balance nitrogenado similar al aislado de soya (ingrediente muy usado en fórmulas enterales) pero con mayor digestibilidad proteica. Otro valor agregado es el mejoramiento en la biodisponibilidad de aminoácidos azufrados en sangre

y una reducción significativa de compuestos antifisiológicos que podrían ocasionar alteraciones nutricionales en el anciano. Por último, la adición específica de metionina a la proteína de soya, permite elevar su relación Met:Cis a niveles recomendados (3:1), para lograr un metabolismo correcto de metionina y demás compuestos azufrados en el anciano.

BIBLIOGRAFIA

- AACC (1976) Method 71-10: Determination of trypsin inhibitor activity in soy products. In: American Association of cereal chemists Inc. Approved Methods comitee, compilers. St Paul (MI): American Association of Cereal Chemists.
- Abumrad, N.N.; Darmaun, D.; Cynober, L.A. (1995) Approaches to studying amino acid metabolism: from quantitative assays to flux assessment using stable isotopes. In: Cynober, L.A. Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional disease. ; Boca Ranto (FL): CRC Press Inc.; pp. 15-30.
- Adelman, R.C.; Deckker, E.E. (1985) Modification of proteins during aging, In: Mod. Aging Res.; V.7.; New York;Alan R. Liss. pp. 1-35.
- Adibi, S.A. (1971) Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absortion. *J. Clin. Inv.* 50:2266-2274.
- Adibi, S.A. (1976) Intestinal phase of protein assimilation in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 29 (February): 205-215.
- Adler-Nissen, J. (1986) Some fundamental aspects of food protein hydrolysis. A review of food protein hydrolysis. *Methods in food protein hydrolysis. En: Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publichers, London.* pp. 9,57 y 110.
- Allen, A.K.; Neuberger, A.; Sharon, N. (1973) The purification, composition and specificity of wheat germ agglutinin. *Biochem. J.* 131:155.
- Anderson, R.L.; Wolf, W.J. (1995) Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125:581S-588S.
- AOAC, (1990) Official methods of analysis. 15th ed. Virginia, U.S.A.
- Arai, S.; Yamashita, M.; Fujimaki, M.; (1978) Nutritional improvement of food proteins by means of the plastein reaction and its novel modification, In: Nutritional improvement of food and feed proteins. Friedman, M.; Plenum Press Inc.; New York-London, pp. 587-612.

- Badui, S.D (1984) Química de los alimentos. Alhambra Mexicana, 2da. Ed. pp. 61-63.
- Baldwin, J.K.; Grimminger, P. (1985) Nitrogen Balance studies in aging rats. *Exp. Gerontol.* 20:29-34.
- Belai, A.; Wheeler, H.; Burnstock, G. (1995) Innervation of the rat gastrointestinal sphincters: changes during development and aging. *Int J Dev Neurosci* 13(2):81-95.
- Bella, D.L; Hahn, C.; Stipanuk, M.H. (1999) Effects of nonsulfur and sulfur amino acids, in the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Endocrin Metab* 277(1):E144-E153.
- Bender, D.A. (1985) Amino acid metabolism. John Wiley & Sons, edit. ; II ed.; Great Britain: 46-50.
- Bressani R. (1981) The role of soybeans in food systems. *JAOCS*; 58:392.
- Bookwalter, G.N. (1978) Soy protein utilization in food systems. In: Nutritional improvement of food and feed proteins. Friedman, M. ed. v.105; New York: Plenum Press Inc.
- Bowman, B.A.; Rosenberg, I.H.; Johnson, M.A. (1992) Gastrointestinal Function in the Elderly. In: Munro, H. Schlieff, G. editors; Nutrition of the elderly. Nutrition Workshops series, v. 29; New York: Nestle Ltd, Vevey/Raven Press; pp. 43-45.
- Burnston, D.; Taylor, E.; Mathews, D.M. (1979) Intestinal handling of two tetrapeptides by rodent small intestine *in vitro*. *Biochem. Biophys Acta*, 553:175-178.
- Calderón de la Barca AM, Ruiz Salazar RA, Jara MME (1999a) Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *J Food Sci.* In press.
- Calderón de la Barca AM; Wall, MA; Jara, MME; Gonzalez, CAF; Ruiz, SRA (1999b) Modificación enzimática de las propiedades funcionales, nutricias y sensoriales de la soya para alimentación especial. *Arc. Latinoam. Nutr.* (con el editor).
- Chen, T.S.; Currier, G.J.; Wabner, C.L. (1990) Intestinal transport during life span of the mouse. *J. Gerontol.* 45(4): B129-133.
- Cheeseman, C.I. (1986) Expression of amino acid and peptide transport systems in rat small intestine. *Am. J. Physiol.* 14:G636-641.

- Clinton, T.E.; Chou, C-C; Laureta, H.C.; Vantrappen, G.R. (1968) Intestinal digestion and absorption of proteins and amino acids, In: Physiology of the gastrointestinal tract. The C.V. Mosby, Co.; Saint Louis, Mi. pp. 233-239.
- Cunningham, J.G. (1992) Digestion and absorption: The nonfermentative processes, In: Textbook of veterinary physiology. 1^o. ed.,USA: W.B. Saunders Co.; pp. 286-313.
- Deesi, T.; Veitl, V.; Burus, I. (1998) Plasma amino acid concentrations, indexes of protein metabolism and growth in healthy, full term infants fed partially hydrolyzed infant formula. *J. Pediat. Gastroent. Nutr.* 27:12-16.
- Deeslie, W.D.; Cheryan, M. (1988) Functional properties of soy protein hydrolyzates from continuous ultrafiltration reactor. *J. Agric. Food. Chem* 57(2):411-413.
- Desobry, S.A.; Neto, F.M.; Labuza, T.P. (1997) Comparison of Spray Drying, Drum-Drying and Freeze-Drying for β -carotene encapsulation and preservation. *J. Food. Sci.* 62(6): 1158-1162.
- Dhabhi, J.M.; Mote, P.L.; Wingo, J.; Tillman, J.B.; Walford, R.L.; Splindler, S.R. (1999) Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic and nitrogen-metabolizing enzymes. *Endoc Metab* 277(2):E352-E360.
- Dréau, D.; Lallés, J.P.; Philouze-Romé, V. ; Salmón, H. (1994) Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 72:2090-2098.
- Díaz, G.J.M.; Vázquez, G.E.M.; Rizo, H.M.F.; Nápoles, R.F.; Navarron, L.M.E.; Romero, V.E. (1997) Recuperación nutricional en lactantes con marasmo alimentados con fórmula láctea de inicio o aislado de soya con incremento de la densidad energética. *Bol. Med. Hosp. Inf. Mex.* 54(10):477.
- Donkoh, A.; Moughan, P. (1994) The effect of dietary crude protein content on apparent and true ileal nitrogen and amino acid digestibilities. *Brit. J. Nutr.* 72(1):59-68.
- Dutra de Oliveira, J. E.; de Souza, N.; Jordao, A.A.; Marchin, J.S. (1998) Methionine supplementation of soya products: Effects on nitrogen balance parameters. *Arch. Latinoam. Nutr.* 48(1):35-39.
- Dziezak, J.D. (1988) Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.* 2(4):136-140.
- FAO/WHO (1991) Protein quality evaluation. Report 1991. Bethesda, Md. U.S.A.

- Feeney, R.E.; Whitaker, J.R. (1977) Food proteins: improvement through chemical and enzymatic modification. *Adv. Chemistry Ser.* 160. American Chemist's Society, Washington, D.C.
- Feeney, R.E. (1986) Tailoring proteins for food and medical uses: state of the art and interrelationships (Chapter 1) In: Feeney, R.E. Whitaker, J.R. editors. *Protein tailoring for food and medical uses.* New York: Marcel Decker, Inc.; p. 1-40.
- Ferraris, R.P.; Kwan, W.W.; Diamond, J. (1988) Regulatory signals for intestinal amino acid transporters and peptidases. *Am J. Physiol.* 255:G151-156.
- Ferraris, R.P.; Diamond, J.M. (1989) Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Annu. Rev. Physiol.* 51:425-441.
- Ferraris, R.; Vinnakota, R. (1993) Regulation of intestinal nutrient transport is impaired in aged mice. *J. Nutr.* 123:502-511.
- Fry, R.J.M. Kohn, H.I. (1961) Age effect on cell-transit time in mouse jejunal epithelium. *Am. J. Physiol.* 201(1):213-216.
- Gallagher, A.C.R. Emley, S.J. (1994) Specific dietary interventions, diabetes, osteoporosis, and renal disease. *Prim. Care* 21(1):175-189.
- Gibson, R.S. (1990) Assesment of protein status, In: *Principles of Nutritional Assesment.* New York: Oxford University Press.
- Gouveai P.M.C; Guedes de Miranda, L.C.; Kling de Moraes, G.E.; Esteves, P.L. (1998) Avaliacao da qualidade nutricional da proteina da folha de mandioca combinada com a caseina pela reacao de plasteina. *Arch. Lationoam. Nutr* 48(4): 311-315.
- Grand, R.J.; Stuphen, J.L. Montgomery, R.K.(1979) The immature intestine: implications for nutrition of the neonate, In: *Development of mammalian absorptive processes.* Ciba Foundation Symposium 70 (new series)
- Green, M. Green, H.L. (1984) The role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Moore, J.L. ed.; London: Academic Press Inc.
- Grimble, G.K.; Kheohane, B.E.; Higgins, B.E.; Kaminski, M.V.; Silk, D.B.A. (1986) Effect of peptid chain lenght on amino acid and nitrogen absortion from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin Scie* 71:65-69.

- Grimble, G.K. (1995) Quantitative and qualitative aspects of nitrogen supply in enteral nutrition in relation to free amino acids and peptides, In: Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional disease. Cynober, L.C.; CRC Press Inc. U.S.A. , pp. 319-335.
- Gumbmann, M. Friedman, M. (1987) Effect of sulfur aminoacid supplementation of raw soy flour on the growth and pancreatic weight of rats. *J. Nutr.* 117:1018-1023.
- Gutierrez, M.A.; Mitsuya, T.; Hatta, H.; Kojetsu, M.; Kobayashi, R.; Junesa, L.R.; Kim, M. (1998) Comparison of egg-yolk protein hydrolyzate and soybean protein hydrolysate in terms of nitrogen utilization. *Brit. J. Nutr.* 80:477-484.
- Hájos, G.; Gelencsér, E.; Grant, G.; Bardocz, S.; Sakhri, M.; Duguíd, T.J.; *et al.* (1996) Effect of the proteolytic modification and methionine enrichment on the nutritional value of soya albumins. *J. Nutr. Biochem.*; 7:481.
- Hájos, G. y Gelencsér, E (1995) Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. *J. Agric. Food Chem.* 43:165-170.
- Halken S, Host A, Hansen L, Osterballe O. (1993) Safety of a new, ultrafiltered whey hydrolysate formula in children with cow milk allergy: A clinical investigation. *Pediatr Allergy Immunol* 4:53.
- Harper, A.E. (1968) Diet and plasma amino acids *Am. J. Clin. Nutr.* 21(5):358-366.
- Hettiarachchy, N. Kalapathy, U. (1997) Soybeans protein products, In: International Thompson Publishing ; Soybeans: Chemistry, technology and utilization. Cap. 8, New York: Chapman&Hall, Inc.; p. 379-411.
- Heydari, A.R. y Richardson, A.G. (1990) Effect of aging and dietary restriction on protein synthesis, In: Protein Metabolism in Aging. New York:Willey-Lis, Inc. Pp. 277-289.
- Holt, P.R.; Pascal, R.R.; Kotler, D.P. (1984) Effect of aging upon small intestinal structure in the fisher rat. *J. Gerontol.* 39(6): 642-647.
- Hussein, S.; Gelencsér, E.; Hajós, G.Y. (1995) Reduction of allergenicity and increasing biological value of buffalos milk proteins by enzymatic modification. *J. Food Biochem.* 19:239-252.
- IFT Expert Panel of Food Safety and Nutrition. Medical Foods. A scientific status summary. *Food Technol* 1992; 46(4): 87-96.

- Jara, M.M.E. (1997) Obtención de hidrolizados funcionales y nutritivos de soya por medio de la hidrólisis y síntesis enzimática y ultrafiltración. Tesis de maestría. CIAD. Hermosillo, Son., Mex.
- Kasche, V. (1990) Proteases in peptide synthesis. In: Proteolytic enzymes. A practical approach. R.J. Beynon & J.S. Bond, Cap. 7, IRL Press, Oxford Eng., p. 125-143.
- Keith, M.O.; Bell, J.M. (1988) Digestibility nitrogen and aminoacids in selected food sources. *J. Nutr.* 118:561-568.
- Kimura, H.; Arai, S. (1988) Oligopeptide mixtures produced from soy protein by enzymatic modification and their nutritional qualities evaluated by feeding tests with normal and malnourished rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 34:375-386.
- Koide, T.; Ikenaka, T.; Ikeda, K.; Hamaguchi, K. (1974) Studies on soybean trypsin inhibitors. IX. Reconstitution of an active derivative from two inactive fragments and the contribution of tryptophan-93. *J. Biochem.* 75:805-823.
- Labuza, T.P.; Warren, T.P. and Newell, J.A. (1977) The physical aspects of drying with respect to water and non-enzymatic browning, In: Friedman, M. Edit. Protein crosslinking, nutritional and medical consequences. New York: Plenum Press Inc.
- Lahl, W.J.; Grindstaff, D.A. (1989) Spices and seasoning: Hydrolysed proteins. Proceeding of the 6th. SIFST symposium on food ingredients-applications, status and safety, april 27-29, Singapore Institute of Food Science & Technology, pp 51-65, Singapore.
- Lahl, W.J.; Braun, S.D. (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48(10):68-71.
- Leibach, F.E.; Ganapathy, V. (1996) Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* 16:99-119.
- Lehninger, A. (1993) *Bioquímica*, 2^o. Ed. ; Barcelona: Omega; p. 59-95.
- Li-Chan, E.; Nakai, S. (1980) Covalent attachment of N^ε-Acetyl Lysine, N^ε-benzylidene lysine and threonine to wheat gluten for nutritional improvement. *J. Food Scie.* 45(3): 514-17.

- Liu, K. (1997) Chemistry and nutritional value of soybean components. En : soybeans: Chemistry, technology and utilization, International Thompson publishing, Cap. 2; New York:Chapman & Hall Inc.; p. 25-113.
- Lozano, P.; Combes, D. (1992) α -chymiotrypsin in Plastein Synthesis. Effect of hidroxylyated additives en enzyme activity. *Appl. Biochem Biotechnol.* 33:51.
- Mahmoud, M.I. (1994) Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food. Tech.* 48(10):89-95.
- Mathews, D.M.; Adibi, A.A. (1976) Peptide Absortion. *Gastroenterology* 71:151-161.
- Mathews, D.M.; Payne, J.W. (1980) Transmembrane transport of small peptides. *Current topics in membranes and transport.* 14:331-365.
- Matthews, D.E.; Conway, J.M.; Young, V.R.; Bier, D.M. (1981) Glycine nitrogen metabolism in man. *Metabolism*, 30(9): 886-892.
- Merry, B.J.; Lewis, S.E.M.; Goldspink, D.F. (1992) The influence of age and chronic restricted feeding on protein synthesis in the small intestine of the rat. *Exper. Geront.* 27:191-200.
- Mora, R.J.F. (1992) Soporte nutricional especial. Bogotá (Col): Editorial Médica Panamericana; p. 165-169.
- Morais, J.A.; Gougeon, R.; Pencharz, P.B.; Jones, P.H.; Ross, R.; Marliss, E.B. (1997) Whole-body protein turnover in the healthy elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 66:880-9.
- NCSS, (1996) Number Cruhner Statistical Systems (computer program) Statistical system for windows, version 6.0, USA: Hintze JL.
- Nielsen, K.; Kondrup, J.; Elsner, P.; Juul, A.; Jensen, A.; Jensen, E.S. (1994) Casein and soya-bean protein have different effects on whole body protein turnover at the same nitrogen balance. *Brit. J. Nutr.*, 72(1):69-81.
- Novo-Nordisk (1995) Short introduction to proteins and protein hydrolysis. Klaus Pommer and BFA protein, Novo Nordisk A/S, EM-9514345, Bagsvaerd, Denmark.
- NRC (1978) Nutrient requirements of the laboratory rat, In: Nutrient requirements of laboratory animals. 3rd. ed. National Academy of sciences. Washington, D.C. pp. 7-27.

- NRC (1981) Mammalian models for research on aging. Publication 3094. National Research Council. Committee of animal models for research on aging. Washington (DC): National Academy Press.
- Obanni, M.; Mitchel, C.; Medcalf, D. (1998) Healthy ingredients and foods from rice. *Cereal Foods World*, 43(9): 696-698.
- Pour-El, A. (1981) Protein functionality: classification, definition and methodology. En Cherry, J.P., edit. *Protein Functionality in Foods*, Cap. 1., ACS Symposium series, USA: American Society, pp 1-19.
- Poullain, M.G.; Cezard, J.P.; Roger, L.; Mendy, F. (1989) Effect of whey proteins their oligopeptide hydrolysates and free amino acids mixture on growth and nitrogen retention in feed and starved rats, *JPEN* (13): 382-386.
- Poullain, M.G.; Cezard, J.P.; Marche, C.; Macry, J.; Roger, L.; Grasset, E. and Broyart, J.P. (1991) Effects of dietary whey proteins, their peptides or amino-acids on the ileal mucosa of normally fed and starved rats. *Clin Nutr* 10:49-54.
- Pszczola, D.E. (1999) It's Never Too Late: Ingredients for the aging. *Food Technol* 53(5):60-68.
- Puigserver, A.J.; Sen, L.C.; Clifford, A.J.; Feeney, R.E.; Whitaker, J.R. (1978) A method for improving the nutritional value of food proteins: covalent attachment of amino acids, In: *Nutritional improvement, of food feed proteins*. Friedman, M.; Plenum Press inc.; New York-London, pp. 587-612.
- Pusztai, A.; Grant, G.; Bardocz, S.; Gelencser, E.; Hajos, G.Y. (1997) Novel dietary strategy for overcoming the antinutritional effects of soyabean whey of high agglutinin content. *Brit. J. Nutr.* 77:933-945.
- Raguso, C.A.; Ajami, A.M.; Gleason, R.; Young, V.R. (1997) Effect of cystine intake on methionine kinetics and oxidation determined with oral tracers of methionine and cysteine in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 66(2):283-92.
- Rackis, J.J.; McGee, J.E.; Gumbmann, M.R.; Booth, A.N. (1979) Effects of soy proteins containing trypsin inhibitors in long term feeding studies in rats. *J.A.O.C.S.*, Marzo; 56:162-167.
- Ramos, R.R.E. (1997) Cuantificación de oxido de cromo (marcador indirecto de digestibilidad) empleando el método de digestión por microondas y la espectroscopia de absorción atómica. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, México.

- Rahman, M.H. Hossain, I.; Moslehuddin (1997) Nutritional value of sweet lupin (*Lupinus angustifolius*): Net protein utilization (NPU), Nitrogen Balance and fractionation studies. *Brit. J. Nutr.* 77:443-457.
- Reeseland, J.E.; Holm, H.; Jacobsen, M.B.; Jenssen, T.G.; Hanssen, L.E. (1996) Proteinase inhibitors induce selective stimulation of human trypsin and chymotrypsin secretion. *J Nutr* 126:634-642.
- Reville, M.; Gosse, F.; Kchelhoffler, J.; Doffoel, M.; Raul, F. (1991) Ileal compensation for age-dependent loss of jejunal function in rats. *J. Nutr.* 121: 498-503.
- Rubio, L.A.; Grant, G.; Dewey, P.; Brown, D.; Annand, M.; Bardocz, S.; Pusztai, A. (1998) Nutritional utilization by rats of chickpea (*Cicer arietinum*) meal and its isolated globulin proteins is poorer than that of defatted soybean or lactalbumin. *J. Nutr.* 128:1042-1047.
- Ruiz-Salazar, R.A. (1996) Obtención de un hidrolizado enzimático de proteínas de soya de baja alergenicidad. Tesis de maestría. CIAD. Hermosillo, Son., Mex.
- Rugo E; Wahl R.; Whan U. (1992) How allergenic are hypoallergenic infant formulae. *Clin Exp Allergy* 22:635.
- Sanderson, I.R.; Walker, W.A. (1995) Uptake and transport of macromolecules by the Intestine, In: de Weck, A.L. and Sampson, H.A. *Intestinal Immunology and Food Allergy*. Nestlé Nutrition Workshops series, v.34; New York: Nestle Ltd. Vevey/Raven Press Ltd.; p. 19-33.
- Sarwar, G. And Peace, R.W. (1994) The protein quality of some enteral products is inferior to that of casein as assessed by rath growth methods and digestibility-corrected amino acid scores. *J. Nutr.* 124:2223-2232.
- Segal, H.L. (1990) Mechanisms of protein degradation, In:Segal, H. Rothstein, M.R., Bergamini, E. ed. *Protein metabolism in aging*. New York:Wiley-Lis, Inc.; pp. 59-69.
- Schmidl, M.K.; Taylos, S.L.; Nordlee, J.A. (1994) Use of hydrolyzate-based products in special medical diets. *Food Technol.*, October, pp. 77-85.
- Silk, D.B.A. (1981) Peptide transport. *Clinical Sci.* 60:607-615.
- Simpson, D.S.B. (1982) The Use of vegetable protein in large-scale catering- A case history. En: Hudson, B.F.J. ed. *Developments in Food Protein-1*, Cap. 7; London:Applied Science Publishers.

- Sleisenger, M.H. and Kim, Y.S. (1979) Protein digestion and absorption. *N. Eng. J. Med.* 300(12): 659-663.
- Taylor, K.B. y Anthony, L.E. (1985) Apoyo nutricional : suplementos, alimentación entérica y parenteral, En: *Nutrición Clínica*. México: Mc. Graw Hill. Pp. 72-80.
- Texter, E.C.; Chou, C-C.; Laureta, H.C.; Vantrappen, G.R. (1968) Intestinal Digestion and Absorption of proteins and aminoacids, In: *Physiology of the gastrointestinal Tract*. 1ed.; Saint Louis: The C.V. Mosby Company; p. 233-236.
- Tiruppathi, C.; Miyamoto, Y.; Ganapathy, V.; Leibach, F.H. (1993) Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides. *Am. J. Physiol.* 265:G81-G89.
- Torres, R.E.; Castañón, G.J.; Miranda, R.R. (1999) Vademécum de fórmulas enterales. *Nutr. Clin.* 2(2):92-100.
- Trier, J.S. and Colony, M.P.(1979) Morphogenesis of the small intestine during fetal development, In: *Development of mammalian absorptive processes*. Ciba Foundation Symposium 70 (new series) Amsterdam: Excerpta Medica; pp. 3-19.
- Ugolev, M.; de Lacy, P.; Iezuitova, N.; Rakhimov, R.; Timofeeva, N.M. (1979) Membrane digestion and nutrient assimilation in early development, In: *Development of mammalian absorptive processes*. Ciba Foundation Symposium 70(new series) Amsterdam: Excerpta Medica; pp. 221-240.
- Ulloa, J.A.; Valencia, M.E. (1993) Desarrollo de una fórmula médica a partir de un concentrado proteínico de garbanzo (*Cicer arietinum*) *Arch. Latinoam. Nutr.* 45(1):63-66.
- US Congress. 100th Congress. Orphan drug amendment of 1988. PL 100-290. Amendment of section 526(a)(1) of the Federal Food, Drug and cosmetic act. 21 U.S. (360bb(ax1)) Library of Congress. Washington, D.C.
- Vaintrub, I.A.; Yatará, H.B. (1995) Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor. Influence on its activity. *J. Agric. Food Chem.* 43:862-866.
- Valdez-Espinoza, V.G. (1997) Obtención y caracterización parcial de enzimas proteolíticas de páncreas porcino. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.

- Vázquez, O.F.A.; Caíre, J.G.; Higuera, C.I.; Hernandez, G. (1995) High performance liquid chromatography determination of free aminoacids in shrimp. *J. Liq. Chromatography*, 18(19):2059-2068.
- Wahn, U. (1995) Role of hydrolysates in prophylactic and therapeutic diets for food allergy, En: de Weck, A.L. y Sampson, H.A. *Intestinal Immunology and Food Allergy*. Nestle nutrition workshop series, v.34. New York: Raven Press, Ltd.; pp. 289-293.
- Whitaker, J.R.; Feeney, R.E. (1983) Chemical and Physical modification of proteins by the hydroxide ion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 19:173-212.
- Yamashita, M.; Arai, S.; Tsai, S.J.; Fujimaki, M. (1971) Plastein reaction as a method for enhancing the sulfur-containing amino acid level of soybean protein. *J. Agric. Food. Chem.*, 19: 1151
- Zhao, X-T.; McCamish, M.A.; Miller, R.H.; Wang, L.; Lin, H.C. (1997) Intestinal transit and absorption of soy protein in dogs depend on load and degree of protein hydrolysis. *J. Nutr.* 127(2): 2350-2356.
- Ziegler, F.; Le Boucher, J.; Coudray-Lucas, C.; Cynober, L. (1992) Plasma amino-acid determinations by reversed-phase HPLC: Improvement of the orthophthalaldehyde method and comparison with ion exchange chromatography. *J. Autom. Chem.*, vol. 14(4):145-149.
- Ziegler, F.; Ollivier, J.M.; Masini, J.P.; Coudray-lucas, C.; Levy, E.; Giboudeau, J. (1990) Efficiency of enteral support in surgical patients: small peptides vs non-degraded proteins. *Gut*, 31:1277-1283.
- Ziegler, F.; Nitemberg, G.; Coudray-Lucas, C.; Lasser, P.; Giboudeau, J.; Cynober, L. (1998) Pharmacokinetic assesment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:124-128.
- Zijlstra, R.T.; Mies, AM.; McCracken, B.A.; Odle, J.; Gaskins, H.R.; Lien, E.L.; Donovan, S.M. (1996) Short-term metabolic responses do not differ between neonatal piglets fed formulas containing hydrolyzed or intact soy proteins.

- Vázquez, O.F.A.; Caire, J.G.; Higuera, C.I.; Hernandez, G. (1995) High performance liquid chromatography determination of free aminoacids in shrimp. *J. Liq. Chromatography*, 18(19):2059-2068.
- Wahn, U. (1995) Role of hydrolysates in prophylactic and therapeutic diets for food allergy, En: de Weck, A.L. y Sampson, H.A. *Intestinal Immunology and Food Allergy*. Nestle nutrition workshop series, v.34. New York: Raven Press, Ltd.; pp. 289-293.
- Whitaker, J.R.; Feeney, R.E. (1983) Chemical and Physical modification of proteins by the hydroxide ion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 19:173-212.
- Yamashita, M.; Arai, S.; Tsai, S.J.; Fujimaki, M. (1971) Plastein reaction as a method for enhancing the sulfur-containing amino acid level of soybean protein. *J. Agric. Food. Chem.*, 19: 1151
- Zhao, X-T.; McCamish, M.A.; Miller, R.H.; Wang, L.; Lin, H.C. (1997) Intestinal transit and absorption of soy protein in dogs depend on load and degree of protein hydrolysis. *J. Nutr.* 127(2): 2350-2356.
- Ziegler, F.; Le Boucher, J.; Coudray-Lucas, C.; Cynober, L. (1992) Plasma amino-acid determinations by reversed-phase HPLC: Improvement of the orthoptalaldehyde method and comparison with ion exchange chromatography. *J. Autom. Chem.*, vol. 14(4):145-149.
- Ziegler, F.; Ollivier, J.M.; Masini, J.P.; Coudray-lucas, C.; Levy, E.; Giboudeau, J. (1990) Efficiency of enteral support in surgical patients: small peptides vs non-degraded proteins. *Gut*, 31:1277-1283.
- Ziegler, F.; Nitemberg, G.; Coudray-Lucas, C.; Lasser, P.; Giboudeau, J.; Cynober, L. (1998) Pharmacokinetic assesment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:124-128.
- Zijlstra, R.T.; Mies, A.M.; McCracken, B.A.; Odle, J.; Gaskins, H.R.; Lien, E.L.; Donovan, S.M. (1996) Short-term metabolic responses do not differ between neonatal piglets fed formulas containing hydrolyzed or intact soy proteins.

- Vázquez, O.F.A.; Caire, J.G.; Higuera, C.I.; Hernandez, G. (1995) High performance liquid chromatography determination of free aminoacids in shrimp. *J. Liq. Chromatography*, 18(19):2059-2068.
- Wahn, U. (1995) Role of hydrolysates in prophylactic and therapeutic diets for food allergy. En: de Weck, A.L. y Sampson, H.A. *Intestinal Immunology and Food Allergy*. Nestle nutrition workshop series, v.34. New York: Raven Press, Ltd.; pp. 289-293.
- Whitaker, J.R.; Feeney, R.E. (1983) Chemical and Physical modification of proteins by the hydroxide ion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 19:173-212.
- Yamashita, M.; Arai, S.; Tsai, S.J.; Fujimaki, M. (1971) Plastein reaction as a method for enhancing the sulfur-containing amino acid level of soybean protein. *J. Agric. Food. Chem.*, 19: 1151
- Zhao, X-T.; McCamish, M.A.; Miller, R.H.; Wang, L.; Lin, H.C. (1997) Intestinal transit and absorption of soy protein in dogs depend on load and degree of protein hydrolysis. *J. Nutr.* 127(2): 2350-2356.
- Ziegler, F.; Le Boucher, J.; Coudray-Lucas, C.; Cynober, L. (1992) Plasma amino-acid determinations by reversed-phase HPLC: Improvement of the orthophthalaldehyde method and comparison with ion exchange chromatography. *J. Autom. Chem.*, vol. 14(4):145-149.
- Ziegler, F.; Ollivier, J.M.; Masini, J.P.; Coudray-lucas, C.; Levy, E.; Giboudeau, J. (1990) Efficiency of enteral support in surgical patients: small peptides vs non-degraded proteins. *Gut*, 31:1277-1283.
- Ziegler, F.; Nitemberg, G.; Coudray-Lucas, C.; Lasser, P.; Giboudeau, J.; Cynober, L. (1998) Pharmacokinetic assesment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:124-128.
- Zijlstra, R.T.; Mies, AM.; McCracken, B.A.; Odle, J.; Gaskins, H.R.; Lien, E.L.; Donovan, S.M. (1996) Short-term metabolic responses do not differ between neonatal piglets fed formulas containing hydrolyzed or intact soy proteins.