

Extracción fraccionada y diferenciación de las proteínas del maíz (*Zea mays* L.)¹

Jorge Fuentes Z.² y Claudio Ciudad B.³

INTRODUCCION

A pesar de que los cálculos provenientes de datos estadísticos demuestran claramente que

¹Parte de la tesis de grado presentada por el autor Jorge Fuentes Z. para optar al título de Químico-Farmacéutico, Universidad de Chile.

Recepción manuscrito: 19 de enero de 1971.

²Químico Farmacéutico, becado por CONICYT, Laboratorio Central de Bromatología, Estación Experimental La

existe un equilibrio entre los requerimientos y la disponibilidad de proteína, indicaciones clínicas de diversos países establecen que existe una enorme deficiencia de alimentos proteicos con los consiguientes resultados de desnutrición.

Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Casilla 5427, Santiago, Chile.

³Bioquímico, Laboratorio Central de Bromatología, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Casilla 5427, Santiago, Chile.

El maíz (*Zea mays*) es un cereal que en Chile está destinado principalmente al consumo animal, especialmente en la avicultura (10). En otros países, como los asiáticos y centroamericanos, los cereales son la principal fuente de consumo humano, razón por la cual comenzaron estudios para establecer el real potencial nutricional del maíz.

El contenido de lisina en el grano de maíz es una característica racial, como lo demuestra Tello *et al* (32) al analizar 182 variedades diferentes, que determina el valor biológico de su proteína y que pasa a adquirir importancia en Latinoamérica como alimento susceptible de ser mejorado (4). Se comprobó que los genes opaco-2 y harinoso-2 producían un aumento en el contenido de lisina, pero que la base bioquímica de este cambio sería diferente en ambos mutantes y por lo tanto en el doble mutante opaco-2 harinoso-2, el contenido de lisina sería mayor que en cualquiera de los dos mutantes simples (26). A los estudios preliminares de efectos nutricionales realizados en ratas (21) (25) (7) siguieron experiencias en pollos (12) (29) (17) y cerdos (28) (11) (5), todos con muy buenos resultados.

En un trabajo reciente (16), se demuestra el mejorado valor nutritivo del maíz opaco-2 cultivado en Chile.

La proteína del maíz es un complejo en el que algunos autores (24) diferencian zeína, glutelina y fracción ácido-soluble. Otros (9) (18) hacen una clasificación más racional de acuerdo a la solubilidad de las proteínas que permite separar: a) albúminas (solubles en agua); b) globulinas (solubles en NaCl al 5%); c) prolaminas (solubles en alcohol etílico al 70% v/v) que corresponde a la zeína, y d) glutelinas (solubles en NaOH al 0,2%). De estas cuatro fracciones la zeína, con bajo valor biológico debido a su constitución aminoacídica que permite la formación de agregados unidos por enlaces bisulfuros, es la que se encuentra en mayor proporción en los maíces no opacos (33). En el opaco-2 se produce una disminución del contenido de zeína y un aumento de glutelina, que es la proteína con alto nivel de lisina; además, se produce un aumento de albúminas que, aunque se encuentran en muy baja proporción, también contienen lisina. Por lo tanto, el aumento de lisina en el opaco-2 puede atribuirse a tres factores, según Mertz *et al* (22).

1. Aumento de lisina en la fracción soluble en agua (albúminas)
2. Aumento de lisina en la zeína
3. Disminución de la razón zeína a glutelina.

La extracción de las proteínas del maíz se

hizo inicialmente con el método propuesto por Mertz y Bressani (23) en que se usó un medio alcalino de pH 12 con iones cobre, sodio, sulfato y sulfito. Hoy se prefiere la extracción fraccionada con solventes usados en el siguiente orden: agua; NaCl 5%; alcohol 70% y NaOH 0,2% (6).

El interés por estudiar las fracciones proteicas aisladamente proviene del hecho de que el gen opaco-2 determina una alteración en la síntesis de proteínas en el grano y que esto se traduce en características fenotípicas bien definidas, como son el aspecto opaco del grano, el menor peso específico, el mayor tamaño del germen de la semilla, etc.

El contenido aminoacídico de todas las fracciones se ha determinado ampliamente tanto en maíces opacos como no opacos (4), como asimismo el contenido de proteína, que en el maíz opaco-2 no es necesariamente mayor.

El nitrógeno del suelo parece estar en relación directa con el nivel de proteínas, pero este aumento no siempre es proporcional al contenido de lisina (19) (20). También ocurre que el nitrógeno alcohol soluble (zeína) aumenta más rápidamente con el aumento de nitrógeno del suelo (30).

El endosperma es la parte del grano de maíz que presenta mayor contenido de proteína (80%, aproximadamente). Sus células contienen gránulos de proteína, especialmente zeína que van disminuyendo a medida que se avanza hacia el centro del grano (13). Los gránulos de 20 micrones de diámetro en el maíz normal, disminuyen apreciablemente de tamaño en el opaco-2 (35) y esto representa la diferencia en el contenido de zeína (34).

Tanto la calidad de las plantas como las condiciones del suelo determinan algunas características agronómicas importantes como son, el peso del grano, el tamaño de la mazorca, etc., que inciden directamente en el rendimiento (2). Se ha observado que el mutante harinoso-2 produce un aumento en el contenido de lisina similar al producido por el opaco-2, sin que el peso específico del grano disminuya tanto. Por otra parte el grano opaco-2 presenta un mayor contenido de humedad, lo que provoca una fragilidad de endosperma y un aumento del porcentaje de granos quebrados. Todo esto representa un menor rendimiento por hectárea del maíz opaco-2 (1).

Se sabe del mayor contenido de lisina y triptófano en el opaco-2, del efecto de la maduración sobre estos niveles de aminoácidos y también del aumento de la calidad biológica de su proteína (8) (16), tanto para el consumo animal como

humano. Resulta importante estudiar el efecto que produce el gen opaco-2 en las distintas proteínas que componen cada una de las cuatro fracciones principales del maíz y compararlas con las proteínas de maíces no opacos. Para ello, el estudio electroforético parece muy adecuado y así se ha venido haciendo en los últimos años.

Las proteínas vegetales, a diferencia de las proteínas animales, son más insolubles y por ello, las condiciones de electroforesis son un tanto diferentes y necesitan de medios de soporte que den buena resolución de los componentes de cada fracción.

Todos los estudios electroforéticos de proteínas de maíz han sido llevados a cabo en gel de almidón (starch-gel) como medio de soporte por su porosidad homogénea que permite separar las moléculas proteicas, tanto por su carga como por su tamaño molecular (14) (15).

En este trabajo se pretende demostrar que el estudio electroforético de las proteínas de maíz, puede llevarse a cabo en condiciones de trabajo más simples que las usadas hasta ahora y con buenos resultados. Es importante comparar los electroforegramas de las proteínas de maíz opaco y no opaco y poder determinar aquellas que son afectadas tanto en la cantidad en que se sintetizan como en la propiedad de migrar en un campo electroforético con mayor o menor rapidez, lo que revelaría un cambio de estructura de dichas proteínas.

Cuadro 1.- Contenido de nitrógeno del maíz opaco-2 y no opaco antes y después de extraer, expresado en base de materia seca.

	N ANTES DE EXTRAER %	N DESPUES DE EXTRAER %
Maíz opaco	1,89	0,14
Maíz no opaco	2,05	0,16

Cuadro 2.- Porcentaje de nitrógeno extraído por los solventes agua, cloruro de sodio, etanol e hidróxido de sodio y determinado en los extractos liofilizados.

	ALBUMINAS (H ₂ O) % N	GLÓBULINAS (NaCl 5%) % N	ZEINA (EtOH 70%) % N	GLUTELINA (NaOH 22%) % N
Maíz opaco	9,8	1,8	8,9	30,8
Maíz no opaco	7,5	1,8	17,8	9,8

MATERIAL Y METODO

Se analizaron dos líneas isogénicas de maíz, CH45 - 668 ct O₂ O₂ y CH45 - 668 ct o₂ o₂, proporcionados por el Subproyecto Mejoramiento de Maíz del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental La Platina, y se estudió la diferencia que existe entre ambos por el comportamiento de sus proteínas en el campo electroforético.

Las muestras de granos de maíz completos (pericarpio, aleurona, germen y endosperma) se llevaron a un 15% de humedad para ser molidas en un molino Bühler hasta un tamaño de partícula comprendido entre 40 y 60 mesh. Posteriormente se desgrasó las muestras en aparato Soxhlet con éter durante 36 horas.

Se determinó contenido de nitrógeno de la harina antes y después de extraer, según método de la A.O.A.C. (3).

La extracción de la proteína se hizo según el método seguido por Boundy *et al* (6), con las siguientes modificaciones:

Todas las extracciones se hicieron en una licuadora Waring-Blendor a temperatura ambiente y los sobrenadantes se separaron por centrifugación durante 10 min. a 12.100 x g y 5°C de temperatura.

Los extractos fueron liofilizados, previa diálisis durante 48 horas contra agua destilada para eliminar los solventes. El extracto acuoso (albúminas) no se dializó.

En los extractos liofilizados (sólidos) se determinó proteína por el método de Kjeldahl según la A.O.A.C. (3).

TECNICA DE ELECTROFORESIS

A. Material empleado:

1. Cámara de electroforesis horizontal Gelman.
2. Tampones de electroforesis: Veronal-veronal sódico; carbonato-bicarbonato de sodio; fosfato monoácido-fosfato biácido de sodio; lactato de aluminio-ácido láctico.
3. Soporte de electroforesis: Membranas de poliacetato de celulosa (Sepharose III).

B. Condiciones estudiadas:

1. pH del tampón: 2,5; 3,1; 3,3; 6,8; 8,5 y 10,0.
2. Fuerza iónica del tampón: 0,005; 0,0075 y 0,01.
3. Tiempo de electroforesis: entre una y dos horas.
4. Voltaje constante: entre 150 y 250 volts.

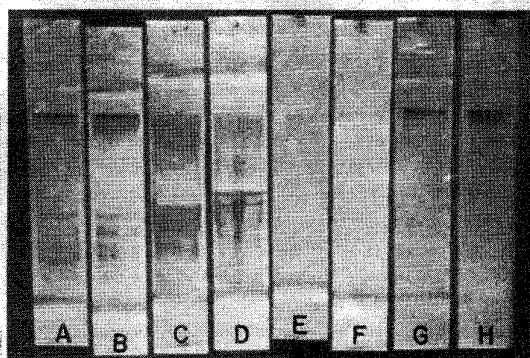


Figura 1.- Electroferogramas de los extractos acuosos, salino, alcohólico y alcalino de maíz no opaco (A, C, E y G, respectivamente) y sus contrapartidas de maíz opaco (B, D, F y H) en iguales condiciones de electroforesis. Tampón lactato de Al-ácido láctico de pH 3.3.

5. Tinción de revelado: Ponceau-S y Nigrosina.
6. Cantidad de proteína en solución aplicada al soporte: entre 10 y 20 microlitros de una solución al 5% en proteína.
7. Cuantificación de la proteína en las bandas: por refracción y por densidad óptica, previa clarificación de las membranas.

RESULTADO Y DISCUSION

Desde el punto de vista bioquímico parece más aceptable la clasificación de las proteínas de maíz de acuerdo a su solubilidad en diferentes solventes y por esta razón la extracción se hizo con este criterio.

En los Cuadros 1 y 2 se detalla el contenido de nitrógeno de las harinas desgrasadas antes y después de extraer y el porcentaje de N extraído. Se demuestra claramente la influencia del gen opaco-2, que se manifiesta en un aumento de la cantidad de glutelina y una disminución de la zeína, mientras las fracciones menores, albúminas y globulinas, no varían significativamente.

Estos resultados corresponden a las muestras de líneas isogénicas de maíz opaco-2 y no opaco provenientes de mazorcas segregantes para este carácter. Es importante destacar el hecho de que el contenido de nitrógeno del maíz no opaco es mayor que el del opaco-2; sin embargo el aumento de la calidad biológica de este último es evidente debido a su mayor contenido de lisina y triptófano, como lo demuestran trabajos recientes (8).

Se ensayaron distintas condiciones de electroforesis para determinar las que producían mejores separaciones.

Inicialmente se usó tampón de veronal-veronal sódico de pH 8,6 pero se encontró poca solubilidad de los extractos proteicos y al revelar con colorantes específicos de proteínas, no aparecieron zonas teñidas. Resultados similares se encontraron al usar tampones carbonato-bicarbonato de pH 11 y fosfato monoácido-biácido de sodio de pH 10. También se estudió el efecto de una alta concentración de urea (8 M) en estos tres tampones con iguales resultados.

Posteriormente se ensayó un tampón de bajo pH: lactato de aluminio-ácido láctico en un rango de pH entre 2,3 y 3,3 y con fuerza iónica entre 0,005 y 0,01. Primero hubo un aumento de la solubilidad de los extractos liofilizados en el tampón, especialmente de las fracciones correspondientes a las albúminas y globulinas. Luego se determinó una migración de estas proteínas desde el extremo positivo hacia el negativo del soporte de electroforesis; que la resolución de las globulinas aumentaba cuando el tampón de electroforesis se hacía en urea 8 M; finalmente, que la cantidad de muestra aplicada al soporte debía ser de 10 microlitros de solución al 5% en proteína.

Las muestras se analizaron con respecto al contenido de nitrógeno de sus fracciones y por el comportamiento de estas fracciones en la electroforesis. Cabe destacar que estas muestras se eligieron con el propósito de minimizar las diferencias que pudieran haber entre un maíz opaco y no opaco cultivados en diferentes suelos, provenientes de distintas plantas, cosechados en diferentes épocas, etc. En este caso el maíz opaco-2 y no opaco provienen de una misma mazorca, de modo que se podría decir que la diferencia que existe entre ellos se debe a la expresión del gene en sus formas alternantes.

En la Figura 1 puede apreciarse el comportamiento de las fracciones A, C, E y G correspondientes a albúminas, globulinas, zeínas y glutelina de maíz no opaco respectivamente, y sus contrapartidas B, D, F y H del maíz opaco-2; todas las fracciones en las mismas condiciones del electroforesis.

Es importante notar que las albúminas se solubilizan totalmente y muestran un electroferograma claro y semejante. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Paulis *et al* (27). Las globulinas se disuelven parcialmente y sus zonas de migración, aunque semejantes, muestran manchas desuniformes. Los extractos alcohólicos, prácticamente insolubles en el tampón de

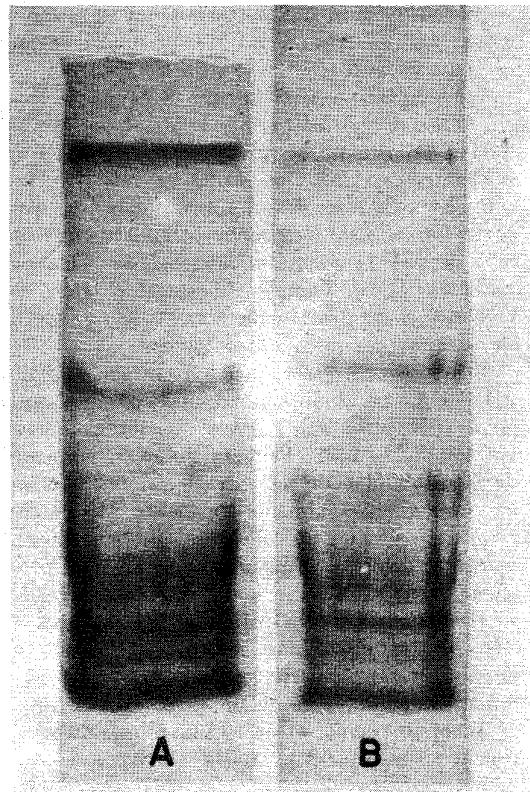


Figura 2.- Electroferograma de globulinas de maíz opaco (A) y no opaco (B) en tampón lactato de Al-ácido láctico y urea 8 M.

electroforesis, no aparecen en el soporte. Finalmente, los extractos alcalinos aparecen en el punto de aplicación y en una heterogénea migración.

En la Figura 2 puede verse las fracciones correspondientes a globulinas provenientes de endosperma opaco (A) y no opaco (B). En este caso el tampón contiene urea 8 M. El efecto de la alta concentración de urea es desdoblar las proteínas de alto peso molecular que tienen una estructura terciaria mantenida por enlaces de cierta fuerza como son los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, etc. Este efecto no tiene los resultados esperados en la zeína y glutelina debido a los enlaces disulfuros que son más poderosos y que probablemente mantienen la estructura terciaria de estas prolaminas y glutelinas.

Algunos autores recomiendan reducir estas proteínas mediante agentes reductores como mercaptoetanol y luego alquilar los grupos

— SH libres en presencia de urea 8 M, con el fin de prevenir la formación de agregados disulfuros (33) (6).

Estas reducciones no se llevaron a cabo en las condiciones señaladas pero se intentó reducir las proteínas con ácido tioglicólico 50 mM, también en presencia de urea 8 M. Se obtuvo resultados positivos solamente en la fracción glutelina, como lo muestra la Figura 3, en que aparecen algunas bandas bien claras (A: no opaco; B: opaco) y además se observa una diferencia entre opaco y no opaco bastante apreciable en cuanto al número de zonas teñidas y a la distancia de migración de estas bandas. No se obtuvo el mismo efecto con la zeína (C y D).

Respecto al análisis densitométrico realizado en un aparato Analytrol Beckman, se puede decir que representa un medio rápido y preciso para cuantificar proteínas en base a intensidad de coloración comparadas con zonas de la membrana sin coloración.

Los resultados de este trabajo pueden resumirse en algunos puntos básicos:

1. La extracción diferencial con solventes proporciona proteína, correspondiente a las cuatro fracciones del maíz, con un grado de

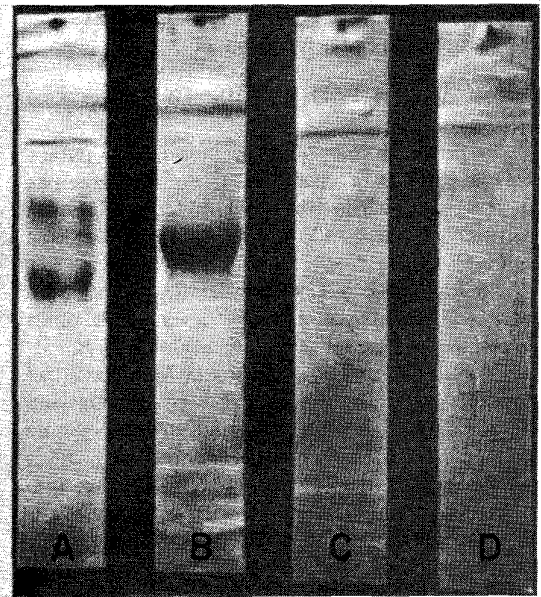


Figura 3.- Electroferograma de glutelinas y zeína de maíz no opaco (A y C respectivamente) y sus contrapartidas de maíz opaco B y D. Tampón lactato de Al-ácido láctico pH 3.3; 8 M en urea y 50 mM en ácido tioglicólico.

- pureza relativamente alto. La fracción glutelina es la más voluminosa luego de liofilizar.
- La electroforesis de proteínas de maíz correspondiente a la fracción acuoso-soluble (albúminas) puede llevarse a cabo con buenos resultados en las siguientes condiciones:
 - Soporte de electroforesis: poliacetato de celulosa.
 - Tampón de electroforesis: lactato de aluminio-ácido láctico de pH 3,1 y fuerza iónica de 0,0075.
 - Solución de proteína al 5% en el tampón de electroforesis y aplicada en cantidad de 10 microlitros.
 - Tiempo de electroforesis: 1,5 hora a 350 volts y 4°C de temperatura.
 - Tinción: Ponceau-S al 0,2% en ácido tricloroacético al 5% durante 10 minutos y lavados de 5 minutos en solución al 5% de ácido acético. Cuantificación por refracción según aconseja Smith (31).
 - Las proteínas sal-solubles (globulinas) pueden ser comparadas claramente al correr su electroforesis en las mismas condiciones anteriores, excepto, en que el tampón de electroforesis debe llevar además urea en concentración 8 M.
 - Las proteínas alcohol-solubles (zeína) son muy difíciles de solubilizar en el tampón de electroforesis, por lo que no se demuestra su electroferograma.
 - Las proteínas alcali-solubles (glutelinas) se solubilizan parcialmente en el tampón de lactato 8 M en urea y 50 mM en ácido tioglicólico y dan electroferogramas intensamente teñidos pero con gran cantidad de proteína en

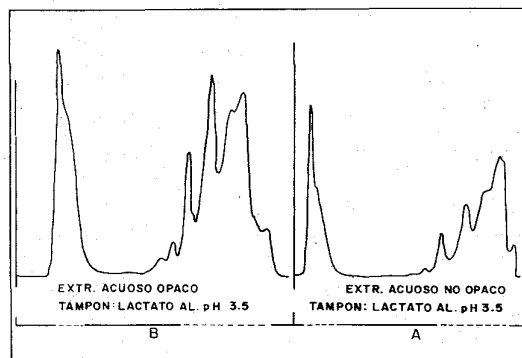


Figura 4.- Esquema densitométrico de un electroferograma de albúminas de maíz no opaco (A) y opaco (B) en aparato ANALYTROL - Beckman en base a intensidad de coloración en las bandas.

el punto de aplicación de la muestra. Las condiciones de electroforesis fueron las mismas que en las albúminas.

- Las diferencias que existen en el comportamiento de las proteínas de maíz opaco y no opaco son sutiles a nivel de las albúminas y globulinas, pero en las glutelinas son más evidentes. Estas diferencias son más marcadas cuando se hace el análisis densitométrico en base a intensidad del colorante fijado a las proteínas. En la Figura 4, A y B corresponden a los electroferogramas A y B de la Figura 1 (albúminas). Estos resultados indican que existe una estrecha relación entre las características fenotípicas y genotípicas que determina el gen opaco-2 en los maíces no opacos, es decir, existe una diferencia entre las proteínas que se sintetizan en ambos tipos de maíz.

CONCLUSIONES

De este trabajo en proteínas de maíz opaco-2 y no opaco puede concluirse:

- La extracción fraccionada de las proteínas de maíz de acuerdo a su solubilidad diferencial, permite demostrar un efecto muy estudiado del gen opaco-2: aumento de la glutelina y disminución de la zeína. Esto, de acuerdo al contenido de N de las fracciones.
- Las membranas de poliacetato de celulosa representan un excelente medio de soporte en la electroforesis de proteínas de maíz y ofrecen una gran ventaja sobre el gel de almidón empleado en la mayoría de los estudios de proteínas vegetales. Presentan un tiempo corto de electroforesis (0,5 a 2 horas) y un manejo sin dificultades; además, puede evaluarse su electroferograma por elución, refracción o densidad óptica.
- Las albúminas y globulinas del maíz pueden ser estudiadas comparativamente por su comportamiento en un campo electroforético en las condiciones ya descritas. Ambas fracciones presentan un electroferograma semejante en el maíz opaco-2 y no opaco.
- La fracción alcohol-soluble (zeína) es altamente insoluble en los tampones de electroforesis ensayados y deberá disponerse de reactivos adecuados que permitan su desdoblamiento para que sus proteínas se manifiesten en la electroforesis.
- La fracción soluble en solución alcalina (glutelina), sufre un desdoblamiento parcial en presencia de urea y ácido tioglicólico, lo que

le permite mostrar un electroferograma incompleto ya que aparece una cantidad de proteína en el punto de aplicación, pero se aprecia una significativa diferencia entre las glutelinas del maíz opaco-2 y no opaco.

— Estos resultados serán de utilidad para los genetistas que necesitan visualizar los efectos de genes mutantes en híbridos de cultivo común con el fin de determinar los aspectos que regulen el mejoramiento de la calidad proteica de los maíces.

— La electroforesis de proteínas es una herramienta de gran valor para el estudio de la influencia que tienen los genes mutantes sobre la cantidad y calidad de las distintas proteínas que se sintetizan en el grano. Esto ayuda a orientar el mejoramiento genético de los maíces considerando la influencia del suelo, la planta y la dotación genética de los gametos que originan la semilla, para la obtención de granos con alto rendimiento y con mejor calidad proteica.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió un método de extracción de las proteínas de maíz opaco-2 y no opaco, en base a solubilidad diferencial.

Las fracciones extraídas fueron sometidas a electroforesis.

Se comprobó un aumento de glutelina y una disminución de zeína en el maíz opaco-2 respecto al maíz no opaco, en el proceso de extracción.

El poliacetato de celulosa como soporte de electroforesis es un medio rápido, de fácil manejo y alta resolución.

Se obtuvo buenas separaciones de las proteínas acuoso-solubles (albúminas) y sal-solubles (globulinas). Ambas proteínas muestran un electroferograma semejante en el maíz opaco-2 y no opaco.

La fracción alcohol-soluble (zeína) es altamente insoluble en los tampones de electroforesis y no se distingue presencia de proteína al revelar el soporte de electroforesis.

La fracción alcali-soluble (glutelina) es desdoblada en parte por acción de urea 8 M y ácido tioglicólico 50 mM y presenta un electroferograma parcial en que se aprecia diferencia entre maíz opaco-2 y no opaco.

La ventaja de una rápida y racional extracción de las proteínas, junto con la facilidad de trabajar con un soporte de electroforesis más ventajoso, permite estudiar el efecto de los genes mutantes en la obtención de maíces de mejor calidad proteica, preocupación permanente en el desarrollo de nuevas fuentes de proteínas para el consumo animal y humano.

SUMMARY

A method for the extraction of proteins from maize opaque-2 and non opaque on the basis of differential solubility was studied.

The fractions extracted were subjected to electrophoresis.

Maize opaque-2 showed an increase in glutelin, and a decrease in zein with respect to maize non-opaque, in the extraction process.

Cellulose polyacetate as a support of electrophoresis is rapid, easy to handle and of a high resolution.

Good separation of the water-soluble proteins (albumins) and salt-soluble proteins (globulins) was obtained. Both proteins show a similar electropherogram in maize opaque-2 and non-opaque.

The alcohol-soluble fraction (zein) is highly insoluble in electrophoresis buffers and there is no sign of the presence of protein when the electrophoresis support is revealed.

The alkali-soluble fraction (glutelin) breakdowns, due to the action of urea 8 M and thioglicolic acid 50 mM, and presents a partial electropherogram where the difference between maize opaque-2 and non-opaque can be appreciated.

The advantage of a rapid and rational extraction of the proteins, together with the convenience of working with a more advantageous electrophoresis support, permits the study of the effect of the mutant genes for the obtention of maize with an improved protein quality, which is a constant problem for the development of new sources of protein for animal and human consumption.

LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, D. E. Problems Associated with Breeding Opaque-2 Corns and some proposed solutions. Proceedings of High Lysine Corn Conference, p. 143. 1966.
2. LAMBERT, R. J., DUDLEY, J. W. Breedings Problems and Potential of Modified Protein Maize, New Approaches to Breeding for Improved Plant Protein. Int. Atomic Energy Agency, Vienna, p. 55. 1969.
3. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 9th ed. Washington D. C. p. 283. 1960.
4. BATES, L. S. Aminoacid Analysis. Proceedings of High Lysine Corn Conference, p. 61. 1966.
5. BEESON, W. M. Feed and food value of opaque-2 corn. Seed World, 100:4. 1967.
6. BOUNDY, J. A., WOYCHIK, J. H., SIMLER, R. J. and WALL, J. S. Protein composition of dent, waxy and high amylose corns. Cereal Chemistry 44: 160. 1967.
7. BRESSANI, R., ELÍAS, L. G. and GÓMEZ-BRENES, R. A. Protein quality of opaque-2 corn evaluation in rats. The journal of nutrition, 97: 173. 1969.
8. CIUDAD, C., PENNACCIOTTI, Í. y ENRIONE, P. Efecto de la maduración en el contenido de lisina y triptofano en diferentes variedades de maíz opaco-2 (*Zea mays*). Agricultura Técnica (Chile) 30(3): 156-161. 1970.
9. CONCON, J. M. The proteins of opaque-2 maize. Proceedings of High Lysine Conference, p. 67. 1966.
10. COSTABAL, R. Hacia un plan racional avícola. Agricultura Técnica (Chile) 26 (2):45-69. 1967.
11. CROMWELL, G. L., PICKETT, R. A. and BEESON, W. M. Nutritional value of opaque-2 corn for Swine. Journal of Animal Science, 26:1325. 1967.
12. ROGLER, J. C., FEATHERSTON, W. R. and PICKETT, R. A. Nutritional value of opaque-2 corn for the chick. Poultry Science, 46:705. 1967.
13. DUVICK, D. N. Protein granules of maize endosperm cells. Cereal Chemistry, 38:372. 1961.
14. ELTON, G. A. H. and EWART, J. A. D. Starch-gel electrophoresis of wheat proteins. Nature, 187:600. 1960.
15. —and—. Starch-gel electrophoresis of cereals proteins. The Journal of Science Food and Agriculture, 13: 62-72. 1962.
16. GUIJUELOS, S. Composición química, calidad biológica y análisis aminoacídico de maíz opaco-2. Tesis Químico-Farmacéutico, Universidad de Chile. 1970. 20 p. (Mimeografiada).
17. JARQUIN, R., ALBERTAZZI, C. and BRESSANI, R. Value of opaque-2 corn protein for chicks. J. Agric. Ed. Chem., 18:268. 1970.
18. JIMÉNEZ, J. R. Protein fractionation studies of high lysine Corn. Proceedings of High Lysine Corn Conference, pp. 74-79. 1966.
19. KEENEY, D. R. Protein and aminoacid composition of Maize grain as influenced by variety and fertility. J. Sci. Agric., 21:182. 1970.
20. MAC GREGOR, J. M., TASKOVITGH, L. T. and MARTIN, W. P. Agronomy Journal, 53:211. 1961.
21. MERTZ, E. T. Growth of rats on Opaque-2 maize. Proceedings of High Lysine Corn Conference, p. 12. 1966.
22. ———, BATES, L. S. and NELSON, O. E. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. Science. 145:270. 1964.
23. ———, and BRESSANI, R. Studies on corn proteins: I. A new method of extraction. Cereal Chemistry, 34:63. 1957.
24. ——— LLOYD, N. E. and BRESSANI, R. Studies of Corn proteins: II. Electrophoretic analysis of germ and endosperms extracts. Cereal Chemistry, 35:146. 1958.
25. ——— VERON, O. A. and BATES, L. S. Growth of rats fed on opaque-2 maize. Science, 148:1741. 1965.
26. NELSON, O. E., MERTZ, E. T. and BATES, L. S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. Science, 150:1469, 1965.
27. PAULIS, J. W. and WALL, J. S. Albumins and globulins in extracts of corn grain parts. Cereal Chemistry, 46:263. 1969.
28. PICKETT, R. A. Opaque-2 corn in swine nutrition. Proceedings of High Lysine Corn Conference, p. 19. 1966.
29. ROGLER, J. C. A comparison of opaque-2 and normal corn for the chick. Proceeding of High Lysine Corn Conference, p. 23. 1966.
30. SCHNEIDER, E. O., EARLY, E. B. and DE-TURK, E. E. Nitrogen fractions of the components parts of the corn Kernel as affected by selection and soil nitrogen. Agronomy Journal, 44:161. 1952.
31. SMITH I. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. II Sed. Ed. Interscience Publishers, London, p. 84. 1968.
32. TELLO, F., ALVAREZ-TOSTADO, M. A. and ALVARADO, G. A study on the improvement of the essential amino acid balance of corn protein: I. Correlation between racial and varietal characteristics and lysine levels of corn. Cereal Chemistry, 42:368. 1965.
33. TURNER, J. E., BOUNDY, J. A. and DIMLER, R. J. Zein: a heterogeneous protein containing disulfide linked aggregates. Cereal Chemistry, 42:452-461. 1965.
34. WOLF, M. J., KHOO, U. and SECKINGER, H. L. Subcellular structure of endosperm protein in high lysine and normal corns. Science, 157:556. 1967.
35. ———, ——— and ———. Distribution and Subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary; and high lysine maize. Cereal Chemistry. 46:253. 1969.