

# Aspectos del proceso hidrolítico ácido de proteínas

POR

S. NAVARRO, A. L. GARCIA  
y J. SANCHEZ-ROJAS

## RESUMEN

Se aplican a albúmina de buey condiciones de hidrólisis ácida concretadas a dos temperaturas y distintos tiempos.

Las condiciones que parecen más adecuadas cuando se pretende determinar los contenidos aminoacídicos aparentes son: 110°C y 16 horas. Para los reales, se obtienen resultados análogos a 110°C, 32 horas y a 145°C, 12 horas.

## INTRODUCCION

Establecidas en un trabajo anterior (7), las degradaciones que sufren los aminoácidos libres al ser sometidos a diversas condiciones hidrolíticas ácidas, se ha considerado también necesario estudiar el proceso sobre proteínas patrón. Con ello pretendemos, por una parte, conocer las relaciones que existen entre la hidrólisis propiamente dicha y la degradación aminoacídica; y por otra, la concentración verdadera de sus aminoácidos constituyentes.

Se puede denominar contenido "aparente" de un aminoácido en toda proteína, el que corresponde a los valores obtenidos directamente del análisis realizado después de la hidrólisis. Sin embargo, estos valores no refle-



jan verdaderamente el contenido aminoacídico de la proteína, ya que hay que considerar las modificaciones y degradaciones de los aminoácidos, simultáneamente al proceso de ruptura de los enlaces que los unen durante el proceso hidrolítico.

Por esta razón el conocimiento de estos valores "aparentes", es necesario para determinar, hechas las oportunas correcciones, el contenido "real" de los aminoácidos constituyentes de las proteínas. Y, también desde el punto de vista aplicado, puede servir para conocer las concentraciones efectivas de los aminoácidos presentes en el hidrolizado cuando éstos se utilizan como posible suplemento en dietas alimenticias pobres (1, 2, 4, 9).

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo abordamos el estudio de la hidrólisis ácida proteica en diversas condiciones de temperatura y tiempo.

## MATERIAL Y METODOS

La proteína patrón utilizada ha sido albúmina de buey cristalizada BDH. Los ácidos clorhídrico y tioglicólico calidad análisis.

Para la realización de las experiencias se partió de alícuotos de una disolución patrón conteniendo cada uno de ellos 5 mg de proteína. Para su hidrólisis se emplearon 50 ml de ácido clorhídrico 6N y ácido tioglicólico al 0'5 % (V/V).

La metodología seguida para la realización del proceso hidrolítico se describe en un trabajo anterior (7).

La determinación de los aminoácidos en el proceso hidrolítico se efectuó por cromatografía líquida automática (3).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Alícuotos ácidos de la disolución de albúmina patrón se sometieron a 110°C durante intervalos de tiempo de 8, 16, 24 y 32 horas. Los valores obtenidos en  $\mu\text{g/ml}$  para cada uno de los aminoácidos constituyentes se exponen en la Tabla I.

En la suma obtenida para cada uno de los tiempos empleados, no se incluyen los correspondientes a los ácidos aspártico y glutámico; ya que estos sólo son aproximados a causa de las dificultades planteadas en su cuantificación.

TABLA I

Hidrólisis ácida de albúmina patrón a 110°C. Contenido aparente de sus aminoácidos constituyentes expresados en  $\mu\text{g/ml}$ . Media de muestras por triplicado.

Aminoácidos	Horas			
	8	16	24	32
Tirosina	20	21	20	20
Fenilalanina	25	27	27	26
Lisina	60	67	65	65
Histidina	19	21	21	20
Arginina	26	27	27	27
Acido Aspártico	61	62	62	61
Acido Glutámico	88	87	88	90
Treonina	25	27	26	26
Serina	21	21	20	19
Prolina	15	16	17	17
Alanina	27	26	26	26
Glicina	10	11	10	10
Valina	20	26	26	27
Metionina	4	4	4	4
Isoleucina	10	12	12	12
Leucina	50	55	54	54
SUMA	332	361	355	353

Los datos expuestos muestran que en general, hasta las 16 horas de hidrólisis, el proceso predominante es el de ruptura de enlaces, aunque esto no excluye la posibilidad de una cierta degradación. Pero en el intervalo de tiempo comprendido entre 16 y 32 horas, la degradación aminoacídica es más acusada y enmascara notablemente el proceso hidrolítico, que se da en menor proporción. No obstante, ciertos aminoácidos difieren de este comportamiento general; citemos como ejemplo la prolina, cuyo contenido aparente máximo se obtiene a las 24 horas y la alanina que lo presenta a las 8 horas.

Para la experiencia a 145°C se utilizaron alícuotos idénticos a los anteriores, pero los intervalos de tiempo en esta fueron: 4, 8, 12 y 16 horas.

En la Tabla II se presentan los valores obtenidos. Al igual que en el caso anterior no se incluyen los correspondientes a los ácidos aspártico y glutámico.

TABLA II

Hidrólisis ácida de albúmina patrón a 145°C. Contenido aparente de sus aminoácidos constituyentes expresados en  $\mu\text{g/ml}$ . Media de muestras por triplicado.

Aminoácidos	H o r a s			
	4	8	12	16
Tirosina	18	19	19	18
Fenilalanina	24	25	26	25
Lisina	60	62	64	63
Histidina	19	20	20	19
Arginina	27	27	27	26
Acido Aspártico	64	64	63	62
Acido Glutámico	89	91	91	89
Treonina	25	25	23	22
Serina	20	19	16	14
Prolina	15	16	15	14
Alanina	26	26	27	27
Glicina	10	10	11	11
Valina	22	29	29	29
Metionina	3	3	4	4
Isoleucina	8	12	12	11
Leucina	51	58	58	56
SUMA	328	351	351	339

Puede apreciarse en esta experiencia, que entre los períodos de tiempo de 8 y 12 horas, no hay prácticamente cambio en la concentración total de aminoácidos. Esto podría interpretarse admitiendo que en el intervalo de 4 a 8 horas, la hidrólisis supera a la posible degradación; y que en el comprendido entre 8 y 16 horas, el proceso fundamental es el de degradación, con lo que el contenido total de aminoácidos disminuye.

Lo apuntado anteriormente puede ser considerado como un comportamiento general. Pero también aquí, aminoácidos como serina y arginina presentan a las 4 horas un contenido aparente máximo. Este hecho ha sido puesto de manifiesto por otros autores que utilizan otras condiciones hidrolíticas y métodos diferentes para su determinación (5, 6, 8).

La información obtenida sobre el efecto de la hidrólisis ácida a 110 y 145°C sobre albúmina de buey, puede resumirse en la Figura 1, en donde se representan los valores obtenidos en cada caso.

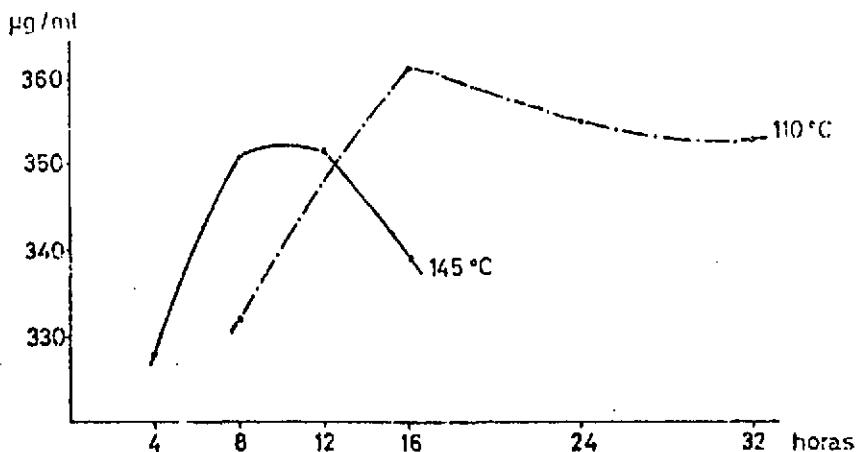


FIGURA 1

Hidrólisis ácida de albúmina patrón. Contenido aparente de la suma de aminoácidos constituyentes.

Varios aspectos importantes son dignos de ser señalados: 1.º) A 110°C durante 16 horas, se alcanza el contenido global máximo en aminoácidos; contenido éste que no llega nunca a igualarse a lo obtenido en la experiencia a 145°C en cualquier tiempo.

2.º) La hidrólisis a 110°C a las 32 horas, da resultados análogos a los obtenidos a 145°C entre 8 y 12 horas.

3.º) A las 8 horas de hidrólisis, la realizada a 145°C muestra un mayor contenido en aminoácidos que la de 110°C, mientras que a las 16 horas presenta un contenido menor.

4.º) El aumento de temperatura en el proceso hidrolítico ácido provoca, en igualdad de tiempo, más pérdidas por degradación, aunque inicialmente ocasione una mayor hidrólisis.

Los aspectos señalados indican que las condiciones hidrolíticas más apropiadas aparecen a las 16 horas a 110°C, aunque en nuestro caso, no emitimos aún juicio definitivo sobre las mismas, hasta introducir en los valores obtenidos, las correcciones correspondientes a la degradación de los distintos aminoácidos (7).

Los valores corregidos teniendo en cuenta la degradación que los aminoácidos experimentan durante el proceso hidrolítico ácido, pueden considerarse como contenido real de aminoácidos en la proteína.

Algunos investigadores, para realizar estas correcciones, hidrolizan las muestras de proteínas durante distintos intervalos de tiempo y temperaturas y obtienen el contenido real de cada aminoácido referido a un tiempo cero por extrapolación en las gráficas correspondientes (8, 10, 11).

En nuestro criterio, el procedimiento no nos parece correcto, ya que en él se considera la degradación aminoacídica como proceso totalmente posterior e independiente del hidrolítico, cuando en realidad, ambos procesos se dan conjuntamente; si bien, como ya se ha demostrado anteriormente, en una primera fase predomina la hidrólisis y en la segunda, la degradación.

Por este motivo consideramos más adecuado efectuar las citadas correcciones en función de la variación que experimenta cada aminoácido patrón en idénticas condiciones de temperatura y tiempo de hidrólisis (7).

Los contenidos reales de los aminoácidos constituyentes de albúmina de buey, cuando ésta se somete a condiciones de hidrólisis ácida a 110°C y distintos tiempos se recogen en la Tabla III.

TABLA III

Hidrólisis ácida de albúmina patrón a 110°C. Contenido real de sus aminoácidos constituyentes expresados en  $\mu\text{g/ml}$ . Media de muestras por triplicado.

Aminoácidos	H o r a s			
	8	16	24	32
Tirosina	20	23	23	23
Fenilalanina	25	28	28	29
Lisina	61	70	70	71
Histidina	20	22	22	22
Arginina	27	29	29	30
Acido Aspártico	62	64	64	66
Acido Glutámico	72	72	72	75
Teonina	26	28	28	28
Serina	21	23	22	22
Prolina	15	16	19	19
Alanina	28	29	28	29
Glicina	9	10	10	10
Valina	19	25	26	26
Metionina	5	5	5	5
Isoleucina	10	14	14	14
Leucina	50	56	55	56
* SUMA	336	378	379	384

\* En la suma no se incluyen los valores correspondientes a los ácidos Aspártico y Glutámico.

El examen de los datos expuestos muestra que a las 16 horas de tratamiento, la hidrólisis se ha realizado casi completamente para todos los aminoácidos, con la excepción de prolina. A las 32 horas ya es total.

Para la experiencia a 145°C, los contenidos se exponen en la Tabla IV.

TABLA IV

Hidrólisis ácida de albúmina patrón a 145°C. Contenido real de sus aminoácidos constituyentes expresados en  $\mu\text{g/ml}$ . Media de muestras por triplicado.

Aminoácidos	H o r a s			
	4	8	12	16
Tirosina	23	23	24	23
Fenilalanina	27	29	30	30
Lisina	65	67	71	71
Histidina	21	22	22	22
Arginina	30	31	32	32
Acido Aspártico	55	56	55	56
Acido Glutámico	70	77	77	79
Treonina	26	27	27	28
Serina	23	23	23	22
Prolina	14	16	16	17
Alanina	28	28	29	29
Glicina	10	10	10	10
Valina	19	26	26	26
Metionina	4	4	5	5
Isoleucina	9	13	13	13
Leucina	49	56	55	55
* SUMA	348	375	383	383

\* En la suma no se incluyen los valores correspondientes a los ácidos Aspártico y Glutámico.

En este caso, los resultados indican que la mayor parte de la hidrólisis se verifica ya a las 8 horas y es total a las 12. A las 16 horas los resultados son similares.

En la figura 2, y para una comparación de los resultados de ambas experiencias, se pone de manifiesto la evolución de los contenidos reales de aminoácidos de albúmina de buey a 110°C y 145°C.

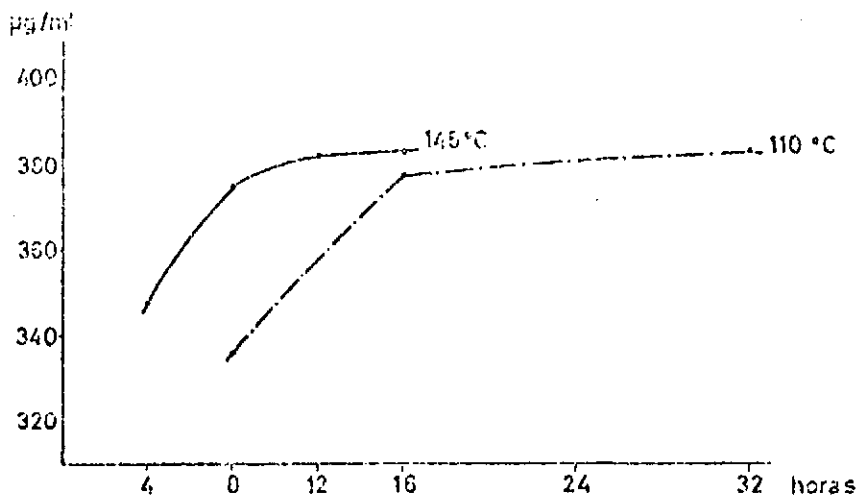


FIGURA 2

Hidrólisis ácida de albúmina patrón. Contenido real de la suma de aminoácidos constituyentes.

Del examen de la misma se deduce:

1.º) A 110°C durante 32 horas, los contenidos reales de aminoácidos son prácticamente los mismos que los que se obtienen cuando se emplea 145°C durante 12 horas.

2.º) Para un mismo período de tiempo, 8 ó 16 horas, el grado de hidrólisis aumenta con la temperatura.

3.º) Las condiciones hidrolíticas: 110°C durante 16 horas que en principio (Figura 1) parecían ser las más apropiadas, deben ser sustituidas por una de las indicadas en el apartado primero.

4.º) Para un determinado aminoácido, el tiempo apropiado de hidrólisis de la proteína en cualquiera de las dos temperaturas consideradas, será el que corresponda a la aparición de su contenido real máximo (7).

Del conjunto de estas experiencias y entre las citadas condiciones hidrolíticas: 110°C-32 horas y 145°C-12 horas, creemos que las primeras son las más adecuadas por presentar menos inconvenientes operatorios. Las segundas, parecen más indicadas sólo para experiencias que requieran una economía de tiempo.



## BIBLIOGRAFIA

- (1) BETSCHART, A. y KINSELLA, J. E. Extractability and solubility of leaf protein. *J. Agr. Food. Chem.* 21, 60 (1973).
- (2) BYERS, M. Amino acid composition and in vitro digestibility of some proteins fractions from three species of leaves of various ages. *J. Sci. Food Agr.* 22, 242 (1971).
- (3) CARPENA, O., COSTA, F., NAVARRO, S. y GARCIA, A. L. Extracción, aislamiento y determinación mediante cromatografía líquida-líquida, de aminoácidos en órganos de Citrus. *Agroq. Tecnol. Alim.* 10, vol. 4, 518 (1970).
- (4) FETUGA, B. L., BABATUNDE G. M. y OYENUGA, V. A. Protein quality of Nigerian feeds. I Chemical assay of nutrients and aminoacid composition. *J. Sci. Food Agr.* 24, 1505 (1973).
- (5) GEHRKE, C. W., ZUMWALT, R. W. y KUO, K. Quantitative aminoacid analysis by gas-liquid chromatography. *J. Agr. Food. Chem.* 19, 605 (1971).
- (6) MONDINO, A. y BONGIOVANNI, G. An experimental study of amino acids degradation under open flask hydrolytic conditions. *J. Chromatog.* 52, 405 (1970).
- (7) NAVARRO, S., GARCIA, A. L. y SANCHEZ-ROJAS, J. *Anales de la Universidad de Murcia.* (En prensa).
- (8) ROACH, D. y GEHRKE, C. W. The hydrolysis of proteins. *J. Chromatog.* 52, 393 (1970).
- (9) SENTHESHANMUGANATHAN, S. y DURAND, S. Isolation and composition of proteins from leaves of plants grown in Ceylan, *J. Sci. Food Agr.* 20, 603 (1969).
- (10) TRISTRAM, G. R. Preparation of hydrolysates. *Techniques in aminoacid analysis.* p. 61, Technicon Instruments Co. Ltd. Chertsey Surrey (1966).
- (11) TRISTRAM, G. R. y SMITH, R. H. The amino acid composition of some purified proteins. *Advances in Protein Chemistry.* Ed. Anfinsen, Anson y Edsall, vol 18, p. 227. Academic Press. New York (1968).

