

Influencia del ácido tioglicólico en la degradación de aminoácidos patrón sometidos a condiciones hidrolíticas ácidas

POR

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

RESUMEN

Se estudia por cromatografía líquida automática la degradación de aminoácidos patrón sometidos a un proceso hidrolítico ácido a distintas temperaturas, tiempos y concentraciones de ácido tioglicólico.

La utilización de este reactivo al 0'5 %, permite cuantificar un alto porcentaje de triptófano, sin afectar grandemente a los restantes aminoácidos.

INTRODUCCION

Está ampliamente reconocida la gran importancia que tiene para el estudio de las proteínas vegetales el conocimiento de su composición aminoácídica, sobre todo, como una de las formas más apropiadas para lograr su diferenciación.

Este estudio lleva implícito la hidrólisis previa de las mismas, que generalmente se realiza por un proceso de digestión enzimático, básico o ácido. Este último es el más utilizado, ya que requiere una menor manipulación de la muestra y además, porque los aminoácidos que se degradan lo

hacen generalmente en menor proporción (11,12,16). No obstante, estos compuestos se descomponen en proporciones variables al estar sometidos durante cierto tiempo a unas condiciones de acidez y temperaturas elevadas, siempre necesarias en todo proceso hidrolítico ácido. Este hecho ha sido puesto de manifiesto frecuentemente (10,14,21,24).

El triptófano es un constituyente básico de las proteínas, aunque cuantitativamente interviene en menor proporción respecto a otros aminoácidos. Desde el punto de vista nutritivo, es esencial para los animales y en las plantas ejerce un papel importante como regulador de su crecimiento (7,18). Por estos motivos, su determinación ha sido objeto de numerosas investigaciones.

La bibliografía consultada (9,11,21) y los resultados de un trabajo anterior (5), indican que el triptófano se destruye casi totalmente si se le somete, junto a los otros aminoácidos, a unas condiciones de hidrólisis ácida. Por ello y para este caso concreto, es necesario aplicar otros procedimientos: hidrólisis alcalina (22,26,27); enzimática (3,13); espectrofotometría directa (6,8,19) o bien utilizar determinados compuestos en el proceso hidrolítico ácido, que limiten al máximo su destrucción.

En esta última línea de investigación, se ha experimentado recientemente un notable desarrollo. Así, se puede destacar, el empleo de un flujo continuo de nitrógeno en el recipiente de hidrólisis, para eliminar todo vestigio de oxígeno (25); o bien, la utilización de ciertas sustancias tales como ácido tioglicólico (9,17).

En este trabajo se aborda el estudio de la recuperación del triptófano utilizando como agente protector el ácido tioglicólico y la posible influencia que este puede ejercer sobre otros aminoácidos sometidos a condiciones hidrolíticas ácidas.

MATERIAL Y METODOS

Como aminoácidos patrón se utilizaron los siguientes: tirosina, fenilalanina, lisina, histidina, triptófano, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, hidroxiprolina, treonina, serina, prolina, alanina, glicina, valina, cistina, metionina, isoleucina y leucina. Todos ellos de calidad R.A.

Para la realización de la experiencia se prepararon mezclas patrón que contenían 0'25 μ M/ml de cada uno de los aminoácidos citados anteriormente.

El procedimiento seguido para el tratamiento hidrolítico es: En matraces Erlenmeyer de 250 ml, se introducen 150 ml de ácido clorhídrico 6 N, la mezcla de aminoácidos patrón —en la concentración anteriormente citada— y ácido tioglicólico. Seguidamente se procede a su desairea-

ción aplicando el vacío durante 8 minutos y se aísla del exterior, mediante un cierre hermético. A continuación se les insufla nitrógeno purísimo, hasta que la presión en su interior alcanza un valor de $1'5 \text{ kg/cm}^2$. Finalmente, se introducen en una estufa y se mantienen a 110 ± 2 ó 145 ± 2 °C, durante tiempos de 8, 16, 24 y 32, ó 4, 8, 12 y 24 horas respectivamente.

Posteriormente y de la disolución, se elimina el ácido clorhídrico por evaporación a vacío a baja temperatura. La operación se repite, adicionando agua bidestilada, hasta que el pH de la misma alcanza un valor de 5 a 6.

La determinación de los aminoácidos se realiza por cromatografía líquida automática, tal y como se describe en un trabajo anterior (5).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I, se exponen los resultados obtenidos en una primera experiencia, en la que se pone de manifiesto la influencia del ácido tioglicólico sobre los aminoácidos de la muestra patrón en unas condiciones concretas de hidrólisis ácida.

Los datos indican que en las citadas condiciones hidrolíticas, el ácido tioglicólico impide notablemente la destrucción del triptófano, en particular, cuando se utiliza en concentraciones comprendidas entre 0'5 y 4 %, intervalo que queda dentro de lo establecido por otros investigadores (9,17). En la Figura 1 se representa este hecho.

También se puede observar que, dentro del error experimental tolerable, el ácido tioglicólico al 0'5 %, no ejerce prácticamente influencia sobre los restantes aminoácidos, salvo para la cistina (por su total reducción a cisteína) y el ácido glutámico. El aumento de la concentración del ácido tioglicólico proporciona una mayor conservación del triptófano, pero en cambio produce notables diferencias en la determinación cromatográfica de otros aminoácidos, especialmente, en la de los ácidos aspártico y glutámico, hidroxiprolina y treonina, que no pueden ser cuantificados perfectamente a causa de la variación que experimenta la línea base del cromatograma obtenido, sobre todo cuando la concentración del ácido tioglicólico alcanza valores del 4 %.

T A B L A I

Acción de distintas concentraciones de ácido tioglicólico sobre muestras de aminoácidos patrón sometidas a condiciones de hidrólisis ácida: temperatura 110 °C. Tiempo 16 h. CIH 6 N. Atmósfera de N₂

Aminoácidos	Concentración del ácido tioglicólico				
	0 %	0,5 %	1 %	2 %	4 %
Tirosina	91,36	91,11	88,65	106,77	108,47
Fenilalanina	92,84	95,09	92,36	98,46	97,13
Lisina	92,56	96,18	96,10	96,00	97,36
Histidina	95,36	95,05	94,77	95,47	95,09
Triptófano	—	87,51	89,59	89,63	90,39
Arginina	95,06	93,66	92,57	92,51	101,28
Acido Aspártico	91,20	97,80	—	—	—
Acido Glutámico	101,80	114,00	—	—	—
Hidroxiprolina	91,10	90,73	76,99	77,72	—
Treonina	92,86	94,73	95,61	95,34	—
Serina	94,85	93,98	96,30	99,99	—
Prolina	95,37	92,68	97,83	96,71	91,18
Alanina	91,02	91,60	94,43	97,34	84,38
Glicina	102,07	104,10	107,55	111,96	117,33
Valina	104,16	103,21	123,61	130,88	130,81
Cistina	90,31	—	—	—	—
Metionina	77,61	79,59	80,34	84,07	83,74
Isoleunina	86,25	88,84	100,37	98,48	101,11
Lencina	96,28	99,73	101,89	101,89	108,26

Los valores vienen expresados en porcentaje con respecto al patrón sin tratar.

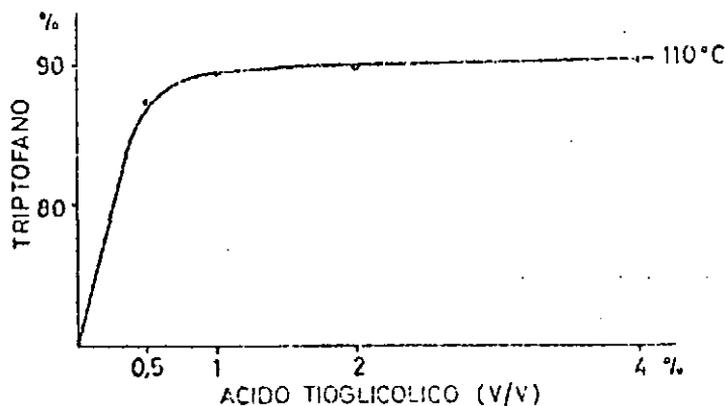


FIGURA 1

Conservación del triptófano en condiciones de hidrólisis ácida, por acción del ácido tioglicólico a diversas concentraciones.

Los datos aportados por esta experiencia nos inducen a sugerir:

1.º) La utilización del ácido tioglicólico al 0'5 % en todo proceso hidrolítico ácido de proteínas, es suficiente para cuantificar el triptófano y los restantes aminoácidos, excepto cistina. Por lo tanto, sólo será aconsejable la incorporación de dicho ácido, cuando se pretenda conocer también la cantidad de triptófano presente en la proteína.

2.º) En el caso de que interese exclusivamente la determinación de este último, se podrían utilizar concentraciones de ácido tioglicólico comprendidas entre 1 y 4 %.

Sin embargo, la degradación de los aminoácidos está asimismo notablemente afectada, por la temperatura y el tiempo a la que quedan sometidos durante el proceso hidrolítico ácido. Por ello y para averiguar la influencia de estos factores se realizaron experiencias a temperaturas de 110 y 145 °C (valores límite corrientemente empleados) (4, 10, 20, 23), y períodos de tiempo comprendidos entre 4 y 32 horas.

En la experiencia a 110 °C, las mezclas de aminoácidos patrón se sometieron a tratamiento con ácido tioglicólico al 0,5 % a 110°C, durante períodos de tiempo de 8, 16, 24 y 32 horas consecutivas. Posteriormente y en cada muestra, se determinaron sus contenidos.

En la Tabla II se exponen los porcentajes de recuperación de cada aminoácido respecto a la muestra cromatográfica directamente, es decir, sin ser sometida al proceso hidrolítico.

TABLA II

Degradación de aminoácidos patrón sometidos a condiciones de hidrólisis ácida, a 110°C y tiempos distintos en presencia de ácido tioglicólico al 0'5 %. Valores expresados en porcentaje con respecto al patrón sin tratar.

Aminoácidos	Tiempo en horas			
	8	16	24	32
Tirosina	96,95	91,40	90,35	85,94
Fenilalanina	97,90	95,07	93,37	89,23
Lisina	99,29	96,18	93,97	91,95
Histidina	99,82	97,72	95,78	93,37
Triptófano	94,72	87,51	84,92	81,18
Arginina	97,44	94,04	93,96	90,91
Acido Aspártico	99,15	97,83	96,18	93,20
Acido Glutámico	120,27	119,10	120,70	118,60
Hidroxiprolina	98,45	90,73	83,24	79,06
Treonina	94,81	94,74	93,57	93,40

Serina	97,21	93,98	87,33	84,67
Prolina	99,39	92,68	92,00	89,86
Alanina	97,52	91,60	90,30	88,78
Glicina	111,53	104,10	101,85	102,17
Valina	107,98	103,21	102,18	101,74
Metionina	83,16	79,59	73,67	69,25
Isoleucina	98,90	88,84	84,58	84,88
Leucina	101,04	99,73	98,23	96,34

En la experiencia a 145°C, las muestras de aminoácidos patrón se sometieron al mismo tratamiento durante períodos de tiempo de 4, 8, 12 y 24 horas. Tabla III.

TABLA III

Degradación de aminoácidos patrón sometidos a condiciones de hidrólisis ácida, a 145°C y tiempos distintos en presencia de ácido tioglicólico al 0'5 %. Valores expresados en porcentaje con respecto al patrón sin tratar.

Aminoácidos	Tiempo en horas			
	4	8	12	24
Tirosina	80,06	80,06	80,04	78,45
Fenilalanina	87,13	86,28	85,14	83,98
Lisina	92,10	91,69	91,27	89,25
Histidina	92,93	91,96	90,68	88,39
Triptófano	76,77	73,22	69,73	65,17
Arginina	89,14	86,05	84,68	83,03
Acido Aspártico	115,63	114,70	113,20	109,71
Acido Glutámico	126,83	117,89	117,43	110,10
Hidroxiprolina	84,03	83,36	76,23	71,17
Treonina	96,55	92,73	84,21	78,10
Serina	86,07	80,07	69,95	61,81
Prolina	102,43	99,97	92,96	87,67
Alanina	92,19	91,78	91,92	91,38
Glicina	106,00	105,10	106,06	104,62
Valina	110,95	112,32	112,49	111,06
Metionina	79,43	78,95	76,11	71,63
Isoleucina	92,78	92,62	90,83	83,45
Leucina	104,36	104,88	104,02	100,82

Al comparar los datos obtenidos en las experiencias anteriores se deduce, en primer lugar, que la degradación general es considerablemente mayor cuando el proceso se verifica a 145°C. Este hecho queda patente en la Figura 2.

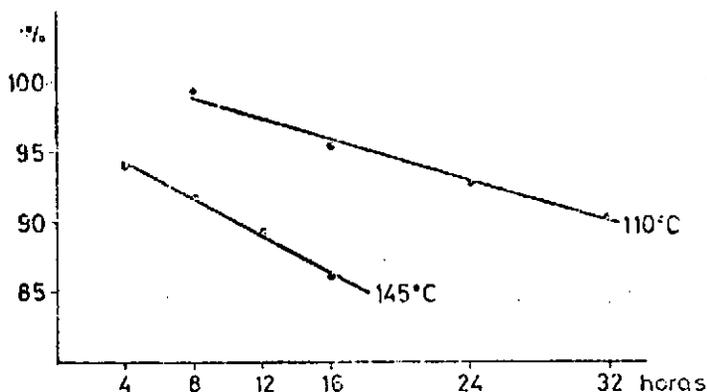


FIGURA 2

Porcentajes de recuperación de la suma de aminoácidos patrón sometidos a condiciones de hidrólisis ácida a 110° y 145° C y tiempos distintos.

En segundo lugar se observa también, que a tiempos iguales (8 y 16 horas), los valores de recuperación correspondientes a 145°C son inferiores a los de 110°C. Esto ocurre con todos aquellos aminoácidos que sólo sufren un proceso de degradación. En cambio, si se comparan los valores obtenidos para el ácido glutámico, ácido aspártico, glicina y valina, especialmente a las 8 horas de tratamiento, se puede señalar, que la recuperación a 145°C es mayor en estos casos.

Tal hecho experimental se podría explicar por la posibilidad de cierta interacción de unos aminoácidos con otros (9, 11, 17), ó por la aparición de compuestos originados en las degradaciones que se producen y que pueden incrementar los valores correspondientes en la determinación cromatográfica de un aminoácido en concreto (21).

Por último cabe destacar las degradaciones de determinados aminoácidos representativos de un grupo o aquellas en particular, que muestran alguna característica especial digna de mención.

En este aspecto histidina, arginina, fenilalanina y leucina constituyen un grupo bastante estable y con una degradación muy análoga (Figura 3).

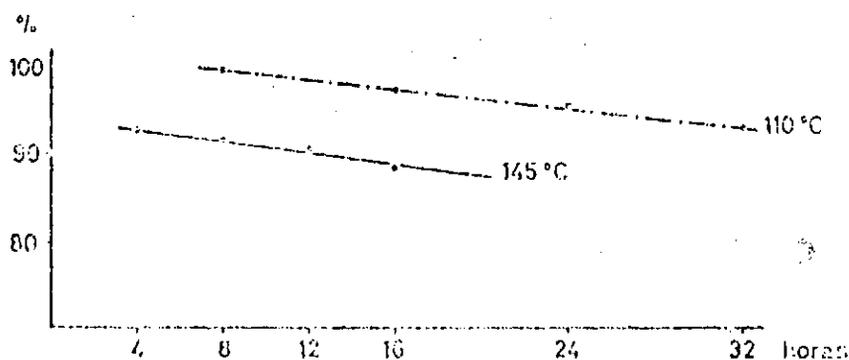


FIGURA 3

Porcentaje de recuperación de histidina en condiciones de hidrólisis ácida a 110° y 145° C y tiempos distintos.

A 110°C y a las 8 horas de tratamiento, puede observarse que la degradación es mínima, incrementándose lentamente entre 8 y 32 horas, aunque no de forma excesiva.

Metionina, hidroxiprolina, triptófano y serina constituyen un segundo grupo mucho más sensible a la degradación. Figura 4.

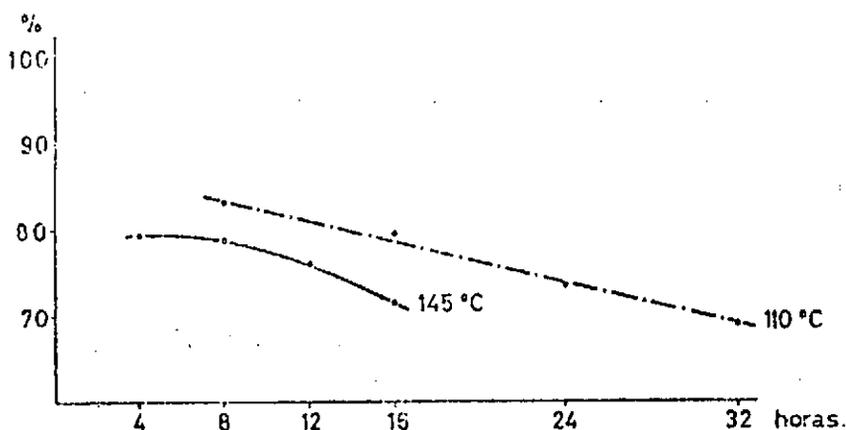


FIGURA 4

Porcentaje de recuperación de metionina en condiciones de hidrólisis ácida a 110° y 145° C y tiempos distintos.

Tanto a 110°C como a 145°C, la metionina sufre una notable alteración ya sea a las 8 ó 4 horas de tratamiento respectivamente, acentuándose considerablemente al ir aumentando el tiempo.

Como casos especiales de degradación deben mencionarse los de tirosina y treonina.

La tirosina (Figura 5) presenta a 110°C una destrucción bastante acentuada y gradual, si bien a las 8 horas es pequeña. En cambio, a las 4 horas a 145°C, el porcentaje de recuperación es bajo (80 %), pero este valor permanece ya prácticamente constante a las 8, 12 y 16 horas; esto indica que toda la pérdida se produce antes de las 4 horas.

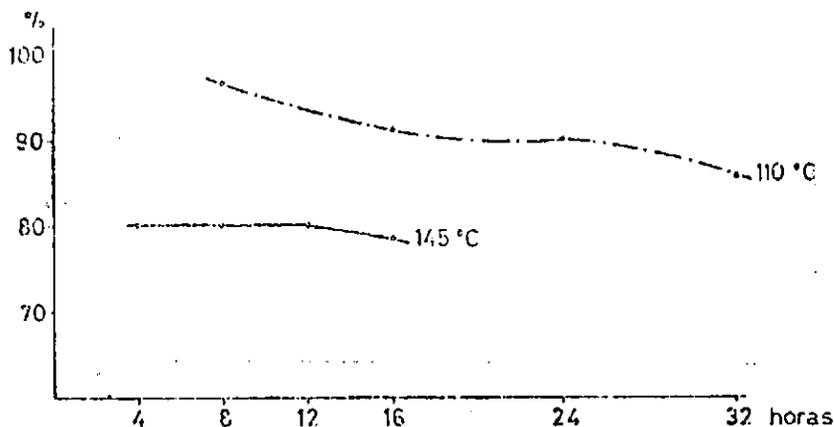


FIGURA 5

Porcentaje de recuperación de tirosina en condiciones de hidrólisis ácida a 110° y 145°C y tiempos distintos.

El fenómeno inverso se da para la treonina (Figura 6).

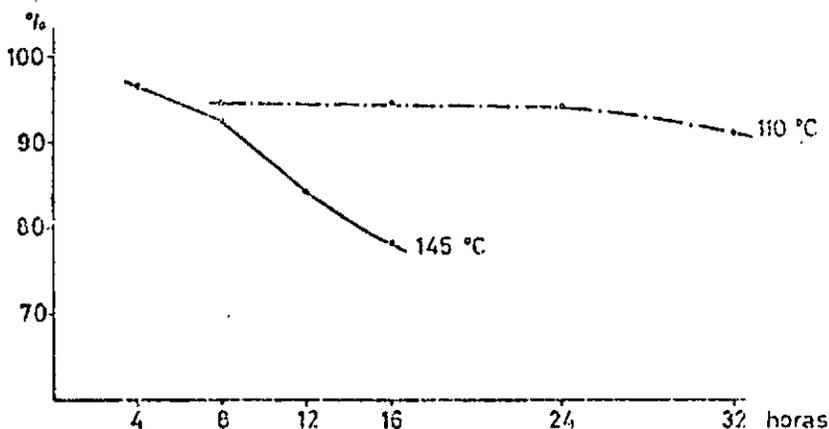


FIGURA 6

Porcentaje de recuperación de treonina en condiciones de hidrólisis ácida a 110° y 145°C y tiempos distintos.

Este aminoácido a 110°C se degrada en un 5 % antes de las 8 horas pero prácticamente no sufre más alteración al aumentar el tiempo. Contrariamente, a 145°C y 4 horas de tratamiento, la degradación es sólo del 3'5 %, pero el proceso aumenta considerablemente hasta que a las 16 horas alcanza un 21'9 %.

Por último, citamos aquellos aminoácidos tales como leucina y ácido aspártico, que no parecen sufrir ninguna destrucción al mantener sus valores prácticamente uniformes en los rangos de tiempo establecidos, particularmente a 145°C. (Figura 7).

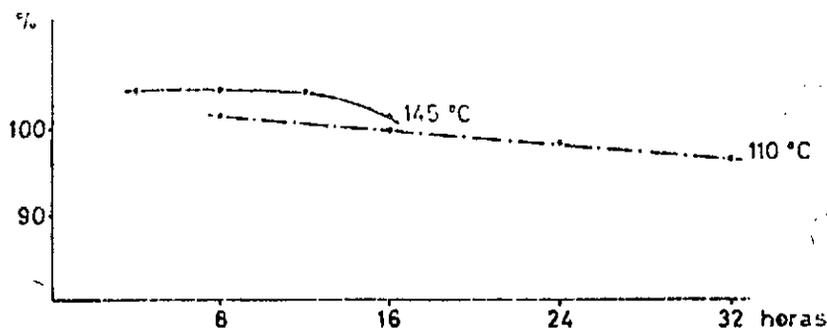


FIGURA 7

Porcentaje de recuperación de la leucina en condiciones de hidrólisis ácida a 110° y 145°C y tiempos distintos.

En estos casos es posible que las interferencias que se presentan en su determinación cromatográfica, sean más intensas cuando se producen a 145°C que a 110°C. Por ello, la curva representativa del proceso a 145°C queda por encima de la correspondiente a 110°C; hecho que como hemos podido observar, no se da en los restantes aminoácidos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BLAKE, J., LI, C.H. Adrenocorticotropins. XXXIX The solid phase synthesis of methionylglutamylhistidylfennylalanylarginyltryptophylglycina. *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 5882 (1968).
- (2) BORDERS, C. L. Jr., JORKASKY, D. K. y PEARSON, S. E. Quantitative analysis of tryptophan modified by 2-hydroxy-5 nitrobenzyl reagents after hydrolysis with p-toluenesulfonic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 246 (1972).
- (3) BYERS, M. The in vitro hydrolysis of leaf proteins. I the action of papain on protein extracted from leaves of *Zea mays*. *J. Sci. Food Agr.* 18, 28 (1967).
- (4) BYERS, M. The aminoacid composition of some leaf protein preparation. Leaf protein. p. 95. Pirie, N. W. ed., Blackwell scientific publications. Oxford and Edinburgh (1971).
- (5) 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).
- (6) EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948 (1967).
- (7) FRIEDMAN, M. y FINLEY, J. W. Methods of tryptophan analysis. *J. Agr. Food Chem.* 19, 626 (1971).
- (8) GAITONDE, M. K. y DOVEY, T. Determination of tryptophan in the intact protein. *Biochem. J.* 117, 907 (1970).
- (9) GEHRKE, C. W. y TAKEDA, H. Gas-liquid chromatographic analysis of tryptophan in proteins. *J. Chromatog.* 76, 77 (1973).
- (10) GEHRKE, C. W., ZUMWALT, R. W. y KUO, K. Quantitative aminoacid analysis by gas-liquid chromatography *J. Agr. Food Chem.* 19, 605 (1971).
- (11) GRUEN, L. C. Effect of other aminoacids on recovery of tryptophan following acid hydrolysis. *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 287 (1973).
- (12) HAUROWITZ, F. The chemistry and function of proteins. p. 25. Academic Press. New York and London (1963).
- (13) HOLZ, A. Automatic determination of tryptophan in proteins and protein-containing plant products with dimethylaminocinnamaldehyde *Landwirt. Forsch. Sonderh* 27, 96 (1972).
- (14) KEUTMANN, H. T. y POTTS, J. T. Improved recovery of methionina after acid hydrolysis using mercaptoethanol. *Anal. Biochem.* 29, 175 (1969).



- (15) LIU, T Y. y CHANG, Y. H. Hidrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan. *J. Biol. Chem.* 246, 2842 (1971).
- (16) MAHLER, H. R. y CORDES, E. H. *Química Biológica*. p. 33, Ediciones Omega. Barcelona (1971).
- (17) MATSUBARA, H. y SASAKI, R. M. High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 175 (1969).
- (18) MEISTER, A. *Biochemistry of the aminoacids*. Vol. II, p. 849. Academic Press. New York and London (1965).
- (19) MESSINEO, L. y MUSARRA, E. A sensitive spectrophotometric method for the determination of free or bound tryptophan. *Int. J. Biochem.* 3, 700 (1972).
- (20) MILNER, M. Need for improved plant proteins in world nutrition. *J. Agr. Food Chem.* 22, 548 (1974).
- (21) MONDINO, A. y BONGIOVANNI, G. An experimental study of aminoacids degradation under open flask hydrolytic conditions. *J. Chromatog.* 52, 405 (1970).
- (22) OELSHLEGEL, F. J. Jr., SCHROEDER, J. R. y STAHMANN, M. A. A simple procedure for basic hydrolysis of proteins and rapid determination of tryptophan using a starch column. *Anal. Biochem.* 34, 331 (1970).
- (23) RIEDER, H. P. An improvement of the method of determination of proteins by means of cupric ion and phenol reagent of Folin Ciocalteu. *Clin. Chim. Acta* 4, 733 (1959).
- (24) ROACH, D. y GEHRKE, C. W. The hydrolysis of proteins. *J. Chromatog.* 52, 393 (1970).
- (25) SLUMP, P. y SCHREUDER, H. A. Determination of tryptophan in foods. *Anal. Biochem.* 27, 182 (1969).
- (26) SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. *Anal. Chem.* 39, 1412 (1967).
- (27) STANCHER, B. y BRUNI, G. Determination of tryptophan in protein hydrolysates of seaweed. *Rass. Chim.* 24, 8 (1972).