

Estudio de subproductos agrícolas. IV. Solubilidad de las proteínas de semilla y de hollejo de uva Palomino.

Por G. Martínez Massanet, J. A. Montiel, E. Pando y F. Rodríguez Luis.

Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz. Apartado 40. Puerto Real. Cádiz. España.

RESUMEN

Estudio de subproductos agrícolas. IV. Solubilidad de las proteínas de semilla y de hollejo de uva Palomino.

Se ha realizado el estudio de la solubilidad de las proteínas de semilla y de hollejo de uva Palomino, procedentes de su extracción en distintos disolventes (agua desionizada, disolución tampón fosfato de Sørensen de pH 7,0, NaCl 0,05 M, tampón tris-HCl 0,1 M de pH 8,3 y NaOH 0,1 N).

En general, los valores de pH a los que se produce la mínima solubilidad de cada grupo de proteínas ocupan una estrecha zona, de 4,1 a 4,3 para las de semilla y algo más amplia para las de la piel, de 3,9 a 4,5. Por otro lado, en general la solubilidad mínima de las proteínas del hollejo se produce a pH menor que el correspondiente a la semilla.

PALABRAS-CLAVE: Proteína (solubilidad) - Isoeléctrico (Punto) - Uva (semilla) - Uva (hollejo) - Palomino (variedad).

SUMMARY

Study of agricultural by-products. IV. Solubility of the proteins of the seed and skin of the Palomino grape.

Solubility of proteins from grapeseed and skin of Palomino variety, extracted with different solutions (deionized water, phosphate buffer - pH 7.0 - 0.05 M NaCl, 0.1 M tris-HCl buffer - pH 8.3 - and 0.1 N NaOH) has been studied.

In general, the pH values of minimal solubility in every group of proteins comprised a narrow range, from 4.1 to 4.3 in grapeseed and slightly broader in skin, from 3.9 to 4.5. On the other hand, the minimal solubility of skin proteins occurred in pH values lower than those of grapeseed proteins.

KEYWORDS: Protein (solubility) - Point (isoelectric) - Grape (seed) - Grape (skin) - Palomino (variety).

I.—INTRODUCCION

La solubilidad de la mayor parte de las proteínas depende en gran medida del pH del medio. Si se construye la curva de solubilidad se puede observar un pH específico en el que dicha solubilidad es mínima, denominado punto isoelectrico. A este valor del pH las proteínas se hallan en forma de «ión dipolar» y, en definitiva, no poseen carga neta, lo que facilita su precipitación. Por este motivo, en el punto isoelectrico las proteínas presentan la mínima solubilidad.

La zona de pH en la que los extractos de proteínas vegetales presentan la mínima solubilidad se halla comprendida entre 3,5 y 6,0 aproximadamente, como puede apreciarse en los datos proporcionados por la bibliografía para las diferentes semillas estudiadas. Así, para la semilla de colza aparecen dos puntos isoelectricos, a pH 3,6 y 5,7, esto es, dos puntos de mínima solubilidad, si bien en el primero de ellos es menor que en el segundo (1). Pa-

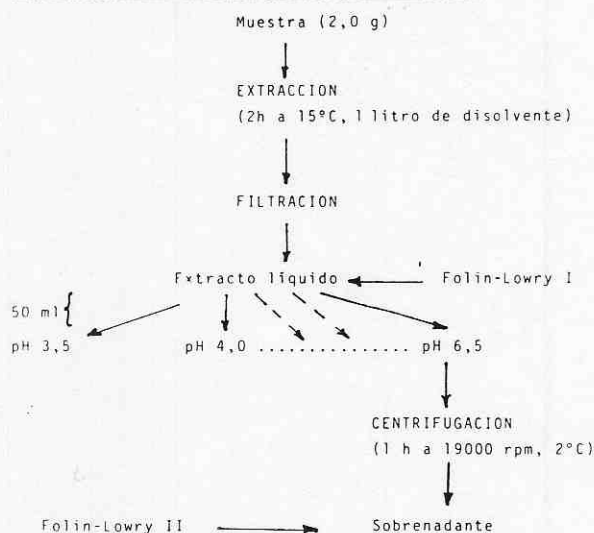
ra las proteínas de cacahuete, el punto isoelectrico se ha determinado a pH 4,4 (2) y para las de semilla de sésamo entre 4,0 y 6,0 (3).

La solubilidad y el punto isoelectrico pueden variar apreciablemente en presencia de sales neutras, las cuales influyen sobre el grado de ionización de las proteínas (4). Debido a ello hemos realizado el estudio de la solubilidad de las proteínas de la granilla y del hollejo de uva Palomino, previamente extraídas en distintas disoluciones: agua desionizada, tampón fosfato de Sørensen de pH 7,0, NaCl 0,05 M, tampón tris-HCl 0,1 M de pH 8,3 y NaOH 0,1 N.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el estudio de la solubilidad de las proteínas de semilla y hollejo de uva Palomino se ha llevado a cabo en el rango de pH comprendido entre 3,0 y 6,5, que es lo suficientemente amplio como para abarcar con total seguridad la zona de mínima solubilidad.

Esquema 1

Procedimiento seguido en el estudio de la solubilidad de las proteínas de semilla y hollejo de uva Palomino



Proteínas pídas: Folin-Lowry I - Folin-Lowry II

II.—MATERIALES Y METODOS

El procedimiento operatorio, resumido en el Esquema 1, se desarrolla de la siguiente manera: 2,0 g de muestra (semilla desgrasada o piel seca de uva Palomino) se someten a extracción con 1 l del correspondiente extractante durante 2 h, a temperatu-

ra ambiente y con agitación constante. Una vez filtrado el extracto, se determina la cantidad de proteínas extraídas por el método Folin-Lowry (5), (6). Se toman siete alícuotas de 50 ml cada una de la solución de proteínas y se ajusta su pH con disolución de HCl 0,1 N y NaOH 0,1 N a 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 y 6,5 unidades, respectivamente. Tras dejar reposar algunas horas, se centrifugan las disoluciones a 19000 rpm a 2°C, durante una hora, en una centrifuga Beckman J2-21, provista de un rotor JA-20. Después de separar el líquido sobrenadante, se determina la cantidad de proteínas que no han precipitado; hallando la diferencia entre las proteínas extraídas y las proteínas presentes en el líquido sobrenadante podemos conocer las proteínas precipitadas en cada caso.

Una vez concluido el primer grupo de precipitaciones de cada extracto, procedemos a determinar su punto isoeléctrico con mayor exactitud en un segundo conjunto de alícuotas, igualmente de 50 ml. Con este fin ajustamos el pH de precipitación para cada una de dichas alícuotas en torno al valor aproximado obtenido en el primer estudio, estableciendo intervalos de 0,1 unidades de pH en esta segunda ocasión y, por consiguiente, logramos determinar el valor del punto isoeléctrico con una exactitud de las décimas de pH.

Cuando se emplea disolución de NaOH 0,1 N como agente extractante no es posible utilizar el método Folin-Lowry para la cuantificación de proteínas, que proporcionaría errores bastante considerables por exceso. Por lo tanto, en esas ocasiones se mide la concentración de proteínas según el método Kjeldahl (7), que ofrece mejores resultados en este caso, aunque tenga los inconvenientes de consumir mayor cantidad de muestra y necesitar más tiempo de análisis.

III.—RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos obtenidos en el estudio de la solubilidad de las proteínas de semilla y hollejo de uva Palomino se recogen en las Tablas I a V, que analizaremos a continuación separadamente.

TABLA I.—Solubilidad de las proteínas extraídas con agua desionizada

Semilla		Hollejo	
pH	Proteínas ppdas (%)	pH	Proteínas ppdas (%)
3,0	70,74	3,0	10,71
3,5	70,26	3,5	17,85
3,8	71,47	4,0	3,57
3,9	76,49	4,2	5,28
4,0	70,99	4,3	17,85
4,1	68,34	4,4	14,29
4,2	78,43	4,5	26,72
4,3	80,81	4,6	12,43
4,4	76,24	5,0	17,86
4,5	65,71	5,5	8,85
5,0	64,75	6,0	8,95
5,5	56,35	6,5	3,57
6,0	45,09		
6,5	47,24		

Del examen de la Tabla I se desprende que, para las proteínas extraídas con agua desionizada, existen dos puntos muy claros de mínima solubilidad en el caso de las proteínas de semilla, situados a pH 3,9 y 4,3, con un 76,49 % y un 80,81 % de proteínas precipitadas, respectivamente. En cuanto a las proteínas de semilla extraídas con disolución tampón fosfato de Sørensen de pH 7,0, cuyos resulta-

dos se muestran en la Tabla II, podemos apreciar dos valores máximos de proteínas precipitadas, a pH 4,3 y 4,5, y otro menor situado a pH 5,5. Los porcentajes de protei-

TABLA II.—Solubilidad de las proteínas extraídas con disolución tampón fosfato de Sørensen de pH 7,0

Semilla		Hollejo	
pH	Proteínas ppdas (%)	pH	Proteínas ppdas (%)
3,0	48,40	3,0	41,10
3,5	43,40	3,5	38,84
4,0	46,50	4,0	39,59
4,2	52,53	4,2	48,22
4,3	55,70	4,3	45,34
4,4	50,30	4,4	45,34
4,5	51,56	4,5	41,71
4,6	50,63	4,6	43,15
5,0	35,44	5,0	32,39
5,5	44,93	5,5	30,21
6,0	31,31	6,0	33,04
6,5	38,60	6,5	35,96

nas precipitadas son: 55,70, 51,56 y 44,93, por el orden citado. Las proteínas extraídas con disolución de NaCl 0,05 M presentan dos puntos isoeléctricos claramente distinguibles: el primero a pH 4,2 y el segundo a pH 4,4, con el 61,82 y el 53,40% de proteínas precipitadas, respectivamente (Tabla III). La evolución de la solubilidad de las proteínas ex-

TABLA III.—Solubilidad de las proteínas extraídas con NaCl 0,05 M

Semilla		Hollejo	
pH	Proteínas ppdas (%)	pH	Proteínas ppdas (%)
3,0	33,34	3,0	34,78
3,5	32,05	3,5	32,61
4,0	40,12	3,8	44,52
4,2	61,82	3,9	66,26
4,3	44,49	4,0	36,96
4,4	53,40	4,1	56,52
4,5	43,05	4,2	52,17
4,6	46,34	4,3	48,87
5,0	29,76	4,4	43,48
5,5	7,46	4,5	23,91
6,0	7,46	5,0	2,17
6,5	13,93	5,5	7,57
		6,0	3,22
		6,5	4,35

traídas con disolución tampón tris - HCl 0,1 M de pH 8,3 es muy característica, como se observa en la Tabla IV, ya que muestra la máxima precipitación en un intervalo de pH entre 4,1 y 4,4 de forma muy pronunciada, con un cambio muy brusco entre pH 4,0 y 4,1, por un lado, y entre 4,4 y 4,5 por otro, modificándose el porcentaje de proteínas precipitadas desde 54,97 % a 81,09 % en el primer cambio y descendiendo desde 78,53 % a 52,71 % en el segundo. Se debe resaltar la gran variabilidad que presenta la solubilidad de las proteínas de semilla de uva Palomino extraí-

TABLA IV.—Solubilidad de las proteínas extraídas con disolución tampón tris - HCl 0,1 M de pH 8,3

Semilla		Hollejo	
pH	Proteínas pddas (%)	pH	Proteínas pddas (%)
3,0	52,57	3,0	11,91
3,5	51,81	3,5	13,98
3,9	53,61	3,8	27,29
4,0	54,97	3,9	28,64
4,1	81,09	4,0	13,98
4,2	78,69	4,1	30,09
4,3	79,29	4,2	24,50
4,4	78,53	4,5	11,91
4,5	52,71	5,0	10,51
5,0	52,41	5,5	4,92
5,5	48,21	6,0	2,80
6,0	48,97	6,5	1,40
6,5	43,86		

das con NaOH 0,1 N en función del pH (Tabla V). Puede afirmarse la existencia de cuatro puntos isoelectrónicos, situados a los siguientes valores de pH: 3,5, 4,1, 4,3 y 4,5, estando comprendido el porcentaje de proteínas precipitadas entre 45,91 %, correspondiente a pH 3,5 y 56,35 %, relativo a pH 4,1.

TABLA V.—Solubilidad de las proteínas extraídas con NaOH 0,1 N

Semilla		Hollejo	
pH	Proteínas pddas (%)	pH	Proteínas pddas (%)
3,0	39,67	3,0	58,24
3,5	45,91	3,4	64,06
4,0	19,92	3,5	67,84
4,1	56,35	3,6	68,90
4,2	45,91	3,7	68,29
4,3	50,09	3,8	70,94
4,4	47,99	3,9	72,78
4,5	56,04	4,0	63,19
5,0	14,74	4,5	28,82
5,5	14,74	5,0	19,75
6,0	15,77	5,5	20,72
6,5	23,03	6,0	28,12
		6,5	23,19

En lo referente a las proteínas del hollejo, comenzamos por el análisis de los datos contenidos en la Tabla I, pertenecientes a las proteínas extraídas con agua desionizada. Debe destacarse lo difícil que resulta en este caso la precipitación de las proteínas, pues en el punto de mínima solubilidad, pH 4,5, sólo se consigue precipitar el 26,72 % de las proteínas. El estudio de la Tabla I puede sugerir la existencia de cuatro puntos isoelectrónicos en la mezcla de proteínas extraíbles en agua, sin embargo tres de ellos presentan un porcentaje de proteínas precipitadas demasiado bajo en relación con el ya mencionado de 4,5, puesto que no alcanzan el 18%. Por este motivo, consideramos el valor de 4,5 para el punto isoelectrónico de este grupo de proteínas.

Las proteínas del hollejo de uva Palomino, extraídas con disolución tampón fosfato de Sørensen de pH 7,0, poseen la mínima solubilidad en el intervalo comprendido entre 4,2 y 4,6 unidades de pH (Tabla II). El punto isoelectrónico cabe situarlo a pH 4,2, en el que existe un 48,22 % de proteínas precipitadas, si bien es posible apreciar otro punto de baja solubilidad a pH 4,6. En el caso de las proteínas extraídas con NaCl 0,05 M, quedan perfectamente definidos dos puntos isoelectrónicos para la mezcla, situados a pH 3,9 y 4,2 (Tabla III), en los que precipitan un 66,26% y un 56,52 %, respectivamente.

Resultados similares a los anteriores se obtienen en la precipitación de las proteínas extraídas con disolución tampón tris-HCl 0,1 M de pH 8,3, como muestra la Tabla IV. La diferencia radica en la menor cantidad de proteínas que se logra precipitar en este caso, un 30,09 % a pH 4,1. El otro mínimo de solubilidad para este grupo de proteínas se sitúa en 3,9, con un 28,69 % de proteínas precipitadas. La zona de baja solubilidad de las proteínas extraídas con NaOH 0,1 N está por debajo de pH 4,0 (Tabla V), encontrándose el punto isoelectrónico a pH 3,9, con el 72,78 % de proteínas precipitadas.

Con el propósito de comparar los resultados obtenidos para las proteínas de la granilla y las del hollejo resumimos en la Tabla VI los valores de pH en los que se produce la mínima solubilidad (punto isoelectrónico) de cada grupo.

En general, ocupan una estrecha zona de pH que, para la semilla, se limita entre 4,1 y 4,3, siendo algo mayor para las proteínas del hollejo, entre 3,9 y 4,5. También se pone de manifiesto en la Tabla VI que la solubilidad mínima de las proteínas del hollejo se produce a un pH ligeramente inferior que el correspondiente a las de semilla, excepto para las proteínas extraídas con agua desionizada.

TABLA VI.—Valores de pH de mínima solubilidad (puntos isoelectrónicos) de las proteínas de semilla y hollejo de uva Palomino.

Extractante	Semilla	Hollejo
Agua desionizada	4,3	4,5
Tampón fosfato de Sørensen (pH 7,0)	4,3	4,2
NaCl 0,05 M	4,2	3,9
Tampón tris-HCl (pH 8,3)	4,1	4,1
NaOH 0,1 N	4,1	3,9

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al M.E.C. la concesión de una beca de F.P.I. a uno de nosotros (J. A. M.) y a la Excm. Diputación Provincial de Cádiz la financiación parcial de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. El Nockrashy, A. S.—«Proteins isolates from new varieties of rapeseed».—Fette, Seifen, Anstrichmittel 78 (1976) 311-315.
2. Abasy, M., Taha, F. y Hamouda, A.—«A proteins isolate by counter-current extraction and isoelectric precipitation of peanuts».—Grasas y Aceites 32 (1981) 171-175.

3. Guerra, M. y Park, Y.—«Extraction of sesame seed protein and determination of its molecular weight by sodium polyacrylamide gel electrophoresis».—*J. Am. Oil Chemists' Soc.* **52** (1975) 73-75.
4. Hermansson, A. M.—«Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins».—*J. Am. Oil Chemists' Soc.* **56** (1979) 272-279.
5. Cowgill, R. Pardee, A.—«Técnicas de Investigación Bioquímica».—Ed. Alhambra, (1964), Madrid, España.
6. Pons, G., Guiraud, J. y Galzy, P.—«Remarques sur le dosage des protéines dans des cellules de levure par le reactif de Folin».—*Rev. Ferment. Ind. Aliment.* **30** (1975) 91-93.
7. A.O.A.C. (Association of Official and Analytical Chemists).—«Standard methods of Analysis».—13th Ed. Washington D. C. (1980).

(Recibido: Noviembre 1986)