Métodos de extracción de aminoácidos libres en remolacha *(Beta vulgaris* L.)

por J. Abadía, P. Gracia, L. Cistué, J. M. Lasa y L. Heras

Estación Experimental de Aula Dei, ZARAGOZA

Recibido el 13-III-1979

ABSTRACT

ABADÍA, J., P. GRACIA, L. CISTUÉ, J. M. LASA and L. HERAS, 1979.—Extraction methods for free amino acids in sugar beet (Beta vulgaris L.). *An. Aula Dei,* **14** (3/4): 459-468.

The influence of different methods of sample preparation (fresh, freeze-dried and oven-dried material), extraction (by refluxing and by homogenization)and purification (H^+ resin column and stirring with H^+ resin), over plant extracts and amino acid standards was studied.

The freeze-drying of plant material looks to be the best method to prepare the sample.

Differences in the results are not significant for the two compared extraction methods. However, and irrespective to the loss of amino acids, if is to be considered the shorting of time used with the reflux extraction method as compared with the tedious homogenization method.

The method of purification giving best results is the H^+ resin column method, although readiness of use and possibility of quantifying losses, makes more suitable the H^+ resin batch stirring method.

INTRODUCCION

En los vegetales, numerosos fenómenos fisiológicos van acompañados de una variación en la cantidad de aminoácidos libres. Por

ello, es de sumo interés poseer el máximo de información sobre los procedimientos para evaluar la cantidad de estos compuestos. Se pueden considerar cuatro pasos en esta determinación: preparación de la muestra, extracción, purificación y análisis.

En cuanto a la preparación del material vegetal, se utiliza preferentemente la liofilización (NOWAKOWSKI *et al.*, 1975, 1977) y el material fresco (MELIN, 1975; MELIN *et al.*, 1979), si bien se ha usado, con fines comparativos, el secado en estufa (LABANAUSKAS y HANDY, 1971).

La extracción se suele llevar a cabo a reflujo (LAZARUS, 1973), o bien por homogeneización con distintos solventes (NGUYEN y PAQUIN, 1971; SINGH *et al.*, 1979).

La purificación puede realizarse por tratamiento con disolventes orgánicos (NOWAKOWSKI y BYERS, 1972), o bien por tratamiento con una resina de intercambio iónico, de tipo fuertemente ácido, forma H^+, ya sea en columna (NGUYEN y PAQUIN, 1971; LAZARUS, 1973) o por agitación (CATALINA *et al.*, 1978).

En el caso particular de la remolacha *(Beta vulgaris* L.), sería de interés, para posteriores estudios, identificar cuál es el método más apropiado para conocer esta composición en aminoácidos libres, por lo que en el presente trabajo se ha ensayado esta serie de procedimientos.

MATERIAL Y METODOS

Experiencia A: Preparación de muestra.

Se ha estudiado la influencia que puede tener el método de preparación del material vegetal en los resultados obtenidos ensayándose los siguientes métodos: material fresco, liofilizado y seco en estufa. La extracción se ha llevado a cabo por reflujo y por homogeneización. La purificación, en columna.

Material vegetal

— *Fresco:* Se utilizaron hojas de remolacha *(Beta vulgaris* L.), cultivada en maceta bajo invernadero, aparentemente libre de enfermedades y con una edad fisiológica, de unos 7 pares de hojas reales, troceándolas lo más finamente posible, inmediatamente después de su recogida.

— *Liofilizado:* El material fresco, tras su congelación en un baño de alcohol-hielo seco, se liofilizó en un aparato TELSTAR Criobloc durante 72 h. Posteriormente se conservó en un desecador a vacío en presencia de silicagel y en nevera, moliéndose inmediatamente antes del análisis en un homogeneizador refrigerado.

— *Seco en estufa:* El material fresco se sometió a desecación en estufa de aire forzado durante 48 h. a 60 °C, posteriormente fue pulverizado y conservado como se indica en el apartado anterior.

Extracción

— *A reflujo:* Se siguió el método de LAZARUS (1973) con ligeras modificaciones. Así, 0,5 g de material seco (en estufa o liofilizado), o bien 4 g de material fresco se extractaron durante 1 hora con 130 ml de etanol del 80%. Tras la extracción se filtró en una placa G-3.

— *Por homogeneización:* Se siguió el método de NGUYEN y PAQUIN (1971) modificado. 0,5 g de material seco (en estufa o liofilizado) o bien 4 g de material fresco se homogeneizó durante 5 minutos sucesivamente con 30 ml de etanol del 90, 80 y 70%, centrifugando tras cada extracción. Esta centrifugación se realizó durante 10 minutos a 2.000 g. Posteriormente el total de los sobrenadantes se filtró en placa G-3.

Purificación

Se utilizaron columnas de 1 cm de diámetro con 4 g de resina DOWEX X-8 200-400 mesh. Las columnas se prepararon y utilizaron según el procedimiento de LAZARUS (1973), con modificaciones.

Para la preparación de la columna, 4 g de resina húmeda (secada por succión) se colocan en la misma, lavando con 10 ml de ClH 1 N, 40 ml de NaOH 0,2 N y 10 ml de ClH 1 N sucesivamente. Tras cada lavado se pasan 10 ml de H_2O destilada.

Los extractos procedentes del reflujo o de la homogeneización se pasan directamente por la columna. A continuación se lavan con 45 ml de ClH 0,01 N y 5 ml de H_2O destilada sucesivamente y se eluye con 35 ml de NH_4OH 2 N. El flujo durante toda la experiencia se mantiene a 0,8 ml/minuto.

Las muestras ya purificadas en esta forma se evaporaron a vacío a temperaturas inferior a 35 °C y se redisolvieron en 2 ml de tampón pH 2,00.

Experiencia B: Extracción y purificación.

El objetivo de esta experiencia fue comparar el efecto de las diferentes formas de extraer y purificar aminoácidos libres.

Material

Se ha utilizado un estándar obtenido a partir de aminoácidos puros Merck para cromatografía. En el mismo se han omitido cistina, isoleucina y fenil-alanina. La utilización de este estándar permitirá cuantificar las pérdidas en cada método.

Extracción

Una cantidad de aminoácidos equivalente a la existente en 1 g de materia seca (aproximadamente 5 μM de cada A.A.), se mantuvo a reflujo en las mismas condiciones que las citadas anteriormente para la experiencia A. En esta ocasión (previamente a la filtración), se diluyó a un volumen total de 300 ml.

Purificación

— *En columna:* Se utilizaron columnas de 1 y 2,3 cm de diámetro con 4 g de la resina anteriormente citada en ambos casos y procediendo para su preparación y elución como en la experiencia A, si bien aquí el volumen de eluyente utilizado fue de 60 ml.

— Por agitación: Según el método de CATALINA *et al.* (1978), modificado. La muestra se agitó con 8 g de resina durante tiempos variables de 15 a 60 minutos. Posteriormente se decantó y se lavó la resina con 45 ml de ClH 0,01 N, volviendo a decantar a continuación. Para la elución, la resina se agitó durante 5 minutos con 60 ml de NH_4OH 2 N y se recogió el sobrenadante para su análisis. Tras evaporación a vacío a temperatura inferior a 35 °C, la muestra se redisolvió en 2 ml de tampón pH 2,00.

Análisis de aminoácidos

Se ha utilizado un TSM II marca Technicon, con un gradiente que permite un análisis rápido de los aminoácidos considerados. Para la evaluación de todos los cromatogramas se utilizó un estándar suministrado por Technicon.

En todos los casos, los datos se dan como media de dos análisis realizados sobre cada muestra purificada.

CUADRO 1.—*Experiencia A. Influencia del método de preparación de muestra* (en μM AA/g materia seca).

	Material fresco				*Material seco en estufa*			*Material liofilizado*		
AA	*Homogeneizado*		*Reflujo*		*Homogeneizado*		*Reflujo*	*Homogeneizado*		*Reflujo*
ASP	5,39	4,72	5,02	5,65	2,75	2,88	2,71	5,19	5,24	4,75
TRE	2,98	2,70	2,26	2,56	2,64	2,92	2,72	3,37	3,22	3,55
SER	2,10	1,80	2,40	2,10	2,36	2,44	2,49	2,38	2,23	2,40
GLU	3,58	3,45	3,83	3,60	3,12	3,13	2,96	3,62	3,68	3,82
GLI	0,29	0,32	0,32	0,41	0,74	0,90	1,03	0,63	0,70	0,39
ALA	1,08	0,95	1,54	1,54	8,86	9,02	8,94	1,39	1,52	1,34
CIS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VAL	0,36	0,33	0,33	0,39	2,24	2,03	2,33	0,42	0,40	0,35
MET	TR	TR	TR	TR	0,10	0,10	0,10	TR	TR	TR
LEU	0,19	0,25	0,28	0,28	1,49	1,63	1,85	0,21	0,26	0,21
ILE	0,18	0,23	0,28	0,26	2,21	2,49	2,46	0,15	0,20	0,22
TIR	TR	0,14	0,22	0,25	0,66	0,72	0,76	0,15	0,22	0,19
PHE	TR	TR	0,16	TR	1,20	1,26	1,36	0,13	0,15	0,19

TR = Trazas.
ND = No detectado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Experiencia A

Se presentan los resultados obtenidos en el cuadro 1.

En el mismo es visible la diferencia que existe entre los datos obtenidos utilizando la desecación en estufa con los obtenidos por cualquiera de los otros dos métodos. Esta diferencia parece ser el resultado de dos procesos diferentes. Por un lado parece existir, dado el gran aumento de aminoácidos neutros, una descomposición de proteína en la estufa, que se podría explicar por el alto contenido en ácidos (principalmente oxálico) de la remolacha.

Por otro lado el hecho de que la cantidad de ciertos aminoácidos sea más baja que en los otros dos análisis, indica una descomposición de éstos posterior a la hidrólisis de proteína, que ya había sido citada en un caso similar (LABANAUSKAS and HANDY, 1971).

No se aprecian diferencias importantes, excepto por treonina y glicina, entre los datos obtenidos a partir de material fresco y liofilizado, especialmente teniendo en cuenta la menor homogeneidad del material fresco.

Experiencia B

Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 2.

Los porcentajes de aminoácidos recuperados tras la purificación en columna son en todos los casos algo más bajos que los obtenidos por LAZARUS (1973) y NGUYEN y PAQUIN (1971), que usando resina AG 50 W×4 200-400 mesh, los cifran en 95-100%. En el presente trabajo oscilan del 91-100% en casi todos los casos, valores que coinciden con los hallados para un estándar interno por CHAPMAN y LEECH (1979).

Son, sin embargo, más bajas las recogidas de glutámico, metionina y arginina. En el primero, la pérdida parece ser debida a metilación, circunstancia ya observada por LAZARUS (1973) y otros autores, que resolvían el problema diluyendo con agua previamente a la purificación, con lo que al parecer obtenían resultados satisfactorios. También aquí se ha utilizado esta dilución en las muestras extractadas por reflujo, si bien el aumento conseguido en la recogida ha sido pequeño.

La pérdida de metionina, sin duda debida a oxidación y que es particularmente alta en una de las muestras de agitación, podría

CUADRO 2.—*Influencia de los métodos de extracción y purificación sobre un estándar de aminoácidos. Porcentajes de recuperación.*

AA %	*Sin extracción*							*Extracción por reflujo*			
	Purificación en columna (d en cm)				*Purificación por agitación (t en minutos)*			*Purificación en columna (d = 2,3 cm)*		*Purificación por agitación (t = 60 minutos)*	
	1		2,3		15	30	60				
LIS	91,67	93,22	94,79	92,19	99,48	100,00	98,44	94,10	100,00	98,21	96,43
HIS	91,64	99,83	91,64	88,92	100,00	96,00	90,55	92,60	92,20	93,14	93,15
ARG	82,13	80,84	83,86	73,49	76,09	59,66	58,79	81,82	83,18	79,55	83,64
ASP	90,85	94,02	96,66	96,66	88,21	91,38	94,02	97,52	91,66	93,26	92,19
TRE	93,90	89,67	91,08	95,30	92,96	92,01	91,55	93,24	91,38	93,46	91,38
SER	90,65	92,99	94,39	97,19	92,52	96,72	91,12	98,58	92,45	98,58	94,34
GLU	72,46	71,54	72,00	71,54	64,16	54,92	47,08	82,04	75,94	55,78	48,28
PRO	95,30	93,26	93,26	97,32	89,21	95,30	97,32	96,66	96,66	96,66	96,66
GLI	90,16	89,34	91,39	91,80	88,93	95,08	94,67	91,70	88,80	95,44	92.12
ALA	91,53	86,95	97,63	94,07	89,49	92,55	93,56	96,61	86,44	94,07	94,58
VAL	94,25	94,83	98,85	96,53	96,55	96,55	95,40	96,61	97,18	98,87	97,18
MET	83,44	88,76	87,88	86,10	78,55	83,44	78,99	84,22	89,54	64,80	18,64
LEU	87,58	93,17	90,84	93,64	88,51	95,50	96,90	94,36	95,27	98,48	94,36
TIR	97,94	87,11	97,42	99,48	95,87	98,97	97,94	97,50	85,50	100,00	99,00

evitarse solamente en atmósfera de N_2, o bien utilizando un gradiente en el TSM que permita cuantificar sus productos de oxidación (LAZARUS, 1976).

También existe una pérdida de arginina, ya que la recogida no pasa del 80-85%, que podría atribuirse a insuficiente cantidad de eluyente, pero que, por otra parte, parece aumentar con el tiempo de agitación.

En el caso de la purificación en columna, no se encuentran diferencias apreciables entre las de 1 y 2,3 cm de diámetro.

En la agitación se observa en el tiempo más corto una retención insuficiente de algunos aminoácidos que se hace, al llegar a tiempos mayores, igual a la obtenida con las columnas. Sin embargo, la pérdida de glutámico, metionina y arginina parece hacerse mayor con el tiempo de agitación.

Introduciendo además la extracción a reflujo no se observan pérdidas adicionales de ningún aminoácido.

CONCLUSIONES

En cuanto al método de *preparación de muestra,* no parece aconsejable la utilización de la desecación en estufa por las aparentes modificaciones que se han observado en la composición. Por otro lado, el uso de material fresco implica una falta de homogeneidad en el mismo, por lo que sólo parece estar indicado en el caso de tener pequeñas cantidades de muestra que sean además inmediatamente analizables. La liofilización del material parece ser, pues, la mejor solución, ya que además de evitar cambios de composición y falta de homogeneidad permite su conservación durante largo tiempo.

Ambos métodos de *extracción* utilizados parecen ser igualmente válidos, aunque el mayor tiempo de permanencia en la solución alcohólica, en el caso de la homogeneización, podría llevar a una mayor pérdida de algunos aminoácidos. A pesar de las condiciones más extremas de la extracción a reflujo no se presenta una pérdida adicional de éstos. Parece deducirse, por tanto, una mayor utilidad de la técnica de reflujo por su menor tiempo de análisis y mayor facilidad de manejo.

La *purificación* en columna de 2,3 cm de diámetro proporciona los mismos resultados que la de 1 cm, lo que unido a la mayor como-

didad en su uso hace que sea el método mejor de los utilizados. Sin embargo, la agitación con resina durante tiempos del orden de 30 minutos proporciona, para la mayoría de los aminoácidos, recuperaciones suficientes sin que haya excesiva pérdida de glutámico, metionina y arginina. Al existir la posibilidad de evaluar estas pérdidas se hace factible la corrección de los datos obtenidos.

Sería, a pesar de estos inconvenientes, interesante utilizar este último método, ya que es mucho más rápido y cómodo que el de las columnas (3 horas/muestra frente a 10 h/m).

RESUMEN

Se estudia la influencia de los diferentes métodos de preparación de muestra (material vegetal fresco, liofilizado y secado en estufa), extracción (a reflujo y homogeneizado) y purificación (en columna de resina H^+ y agitación con resina H^+) sobre extractos vegetales y estándar de aminoácidos. La liofilización del material vegetal parece ser el mejor método de preparación de muestra, ya que hay importantes modificaciones en el secado en estufa.

En la extracción no se encuentran diferencias importantes entre uno y otro método, si bien el tiempo de permanencia en la solución alcohólica es determinante a favor de la extracción a reflujo.

El método de purificación que lleva a las menores pérdidas es la columna H^+, si bien razones de comodidad de uso y la posible cuantificación de pérdidas pueden hacer preferible la agitación con resina H^+

REFERENCIAS

CATALINA, L., R. SARMIENTO, F. GONZÁLEZ GARCÍA y U. VALPUESTA

1978 El metabolismo nitrogenado en árboles de *Olea Europea* var. Manzanillo en relación con la floración. Estudio de los aminoácidos libres. *Anal. Edaf. Agrobiol.*, 37 (3,4): 249-259.

CHAPMAN, D. J. and R. M. LEECH

1979 Changes in pool sizes of free amino acids and amides in leaves and plastids of *Zea mays* during leaf development. *Plant. Physiol.*, 63: 567-573.

LABANAUSKAS, K. and M. F. HANDY

1971 Protein and nonprotein amino acids in citrus leaves as affected by sample preparation and species differences. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **96** (4): 514–518.

LAZARUS, W.

1973 Purification of plant extracts for ion-exchange chromatography of free amino acids. *J. Chrom.*, **87**: 169-178.

1976 Buffer system for ion-exchange chromatography of amino acid mixtures containing methionine sulphone. *J. Chrom.*, **116** (1): 237-239.

MELIN, D.

1975 Acides aminés libres, port et activité revolutive des rameaux du *Periploca Graeca* L. *Planta*, **125** (2): 105-115.

MELIN, D., J. C. VALLEE, G. VANSUYT and J. PREVOST

1979 Acides aminés libres et proteiques des divers types de rameaux du *Periploca Graeca:* rôle dans l'accumulation des tiges volubiles et compartimentation intracellulaire. *Physiol. Plant.*, **46** (1): 68-73.

NGUYEN, S. T. and R. PAQUIN

1971 Extraction and purification methods for free amino acid and proteins in plant materials. *J. Chrom.*, **61**: 349-351.

NOWAKOWSKY, T. Z. and M. BYERS

1972 Effects of N and K fertilizers in of carbohidrates and free amino-acids in *Italian Ryegras:* changes in the composition of the non-protein N fraction and the distribution of individual amino-acids. *J. Sci. Fd. Agric.*, **23**: 1313-1323.

NOWAKOWSKY, T. Z., J. BOLTON and W. LAZARUS

1975 Effects of form and amounts of N and Mg fertilizers on the yield and on the inorganic and organic composition of *Italian Ryegras* grown on Mg deficient soil. *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**: 1.483-1.492.

NOWAKOWSKY, T. Z., G. E. G. MATTINGLY and W. LAZARUS

1977 Effects of N and P fertilizers on yield and on inorganic and organic composition of *Italian Ryegras* grown on P deficient soil. *J. Sci. Fd. Agric.*, **28**: 491-500.

SINGH, I. S.; J. C. VALLEE and H. L. DULIEU

1979 Fertilité pollinique et contenu des antheres en acides aminés libres chez *Petunia hibrida Hort. Z. Pflanzenzuchtg*, **82**: 116-132.