

SEPARACION TERMICA DIFERENCIAL DE LAS PROTEINAS "CLOROPLASTICAS" Y "CITOPLASMATICAS" EXTRAIDAS DEL RESIDUO FOLIAR DEL BONIATO

J. Romero, J. Pino, D. Díaz y C. Valdés

Departamento de Frutas y Vegetales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 28 de diciembre de 1985

ABSTRACT. In this paper the temperature, time and pH conditions of "chloroplastic" and "cytoplasmic" proteins separation in extracts obtained from sweet potato foliar by-products were studied. The best separation is obtained at pH 4,8; temperature 58 °C and time of 16 s. In these conditions an extract practically free of chlorophyll and with the maximum protein nitrogen is obtained.

RESUMEN. En este trabajo se estudian las condiciones de temperatura, tiempo y pH para la separación térmica de las proteínas "cloroplásticas" y "citoplasmáticas" extraídas del residuo foliar verde de la cosecha del boniato. Se determinó que la mejor separación se logra mediante el ajuste del pH del extracto al valor 4,8 y el calentamiento rápido del mismo a 58 °C durante 16 s. De esta forma se obtiene un extracto prácticamente libre de clorofila con el máximo contenido de nitrógeno proteico.

INTRODUCCION

Las proteínas de las hojas se agrupan en dos fracciones llamadas cloroplástica y citoplasmática. La primera consiste en lipoproteínas asociadas a los cloroplastos y se hallan coloidalmente en el líquido celular, y la segunda consiste de proteínas solubles localizadas en el citoplasma celular¹.

Aprovechando la dispersión coloidal de la fracción cloroplástica se ha logrado separarla del extracto obtenido del material foliar mediante ajustes de pH, temperatura y tiempo con ayuda de la centrifugación a velocidad relativamente baja^{2,3}.

Se ha determinado que la coagulación de la fracción cloroplástica mediante un calentamiento brusco es ventajosa⁴, encontrándose que en los extractos obtenidos de la alfalfa llevados a pH de 8,3 a 8,6 y calentados en esta forma de 60 a 62 °C de 10 a 20 s precipitaba solamente del 11 al 13 % de las proteínas citoplasmáticas junto con las cloroplásticas.

Para lograr este calentamiento rápido se hace circular el extracto por una tubería y se le inyecta vapor a una presión determinada mediante un aditamento adecuado⁴. Por sus resultados éste es el método que se ha empleado en la producción a escala piloto de concentrados blancos de proteínas de gran aceptabilidad en la dieta humana⁵⁻⁷.

En este trabajo se estudian las condiciones de separación térmica diferencial de las proteínas "cloroplásticas" y "citoplasmáticas" extraídas del residuo foliar total de la cosecha del boniato (*Ipomoea batatas*).

MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se utilizó el residuo foliar total verde de la cosecha del boniato variedad CENSA 74 228. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento antes de las 4 h de cortadas.

El material foliar lavado y cortado en pedazos pequeños (1 a 2 cm) se asperjó con solución acuosa de metabisulfito de sodio al 5 % hasta una concentración⁸ de 240 ppm de SO₂, se molió en molino de carne casero y se prensó en una prensa tornillo también casera.

El residuo de extracción se mezcló con 1,5 volúmenes de agua/peso de material foliar fresco procesado y se prensó de forma similar, tamizándose los extractos combinados por malla de 0,5 mm de diámetro de orificio⁸. El extracto tamizado mantenido con agitación constante se hizo circular, mediante una bomba peristáltica con flujo de 0,93 mL/s, a través de un primer serpentín de vidrio PYREX (diámetro interno de 0,4 mm y recorrido de 94,2 cm) sumergido en un baño de agua termostata a una temperatura tal que el extracto alcanza la temperatura requerida en la proporción en 8,6 s, y un segundo serpentín similar al anterior pero con recorrido variable, sumergido en baño termostata a temperatura adecuada para mantener la temperatura alcanzada por el extracto durante el tiempo de retención deseado recogiendo el extracto tratado en recipiente inmerso en baño de hielo y mantenido en éste hasta temperatura de 40 °C, centrifugándose a continuación a 4 200 g durante 2 min.

Inicialmente se realizó un diseño exploratorio mediante un plan factorial 2³, tomándose como variables independientes la temperatura del extracto (X₁), el tiempo de retención de ésta (X₂) y el pH del extracto (X₃); y como variable dependiente los contenidos de nitrógeno proteico (NP) y clorofila total (CT) retenidos en los extractos centrifugados expresados en mg/100 mL. Para el cálculo de la varianza del error puro (S_{pe}^2) se hizo por triplicado uno de los puntos centrales del diseño, efectuándose las experiencias aleatoriamente. La matriz de experimentos fue la siguiente:

X_1	X_2	X_3
-1 (45 °C)	-1 (16 s)	-1 (5,0)
1 (55 °C)	-1	-1
-1	1 (27 s)	-1
1	1	-1
-1	-1	1 (7,0)
1	-1	1
-1	1	1
1	1	1

Siguiendo la dirección de la retención mínima de clorofila en los extractos centrifugados se efectuó otro diseño factorial 2^3 asignándoles a las variables dependientes los valores siguientes:

$X_1(-1 = 60 \text{ y } +1 = 65 \text{ °C})$, $X_2(-1 = 7 \text{ y } +1 = 11 \text{ s})$,
 $X_3(-1 = 3,5 \text{ y } +1 = 4,5)$

El cálculo de los coeficientes de los polinomios adaptados se realizó empleando las matrices de regresión usuales⁹, tomándose como criterio de aceptabilidad de los mismos el doble de su desviación estándar.

Los resultados de las experiencias duplicadas de optimización del pH y la temperatura se sometieron al análisis de varianza y a la prueba de Duncan para un 95 % de confianza¹⁰.

El contenido de nitrógeno total y no proteico, soluble en ácido tricloroacético al 10 %, se determinó por el método microkjeldahl¹¹ y el de clorofila total espectrofotométricamente¹², evaluándose la coloración de los extractos visualmente en tubos de ensayo de vidrio PYREX.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I se presentan los resultados del diseño exploratorio de las condiciones de separación de las proteínas "cloroplásticas" y "citoplasmáticas". Según los valores de los coeficientes de los polinomios adaptados y del criterio de aceptabilidad de los mismos, los contenidos de CT y NP retenidos en los extractores centrifugados están regidos por los polinomios siguientes:

$$Y_{CT} = 0,36 - 0,08X_1 - 0,01X_2 + 0,13X_3 + 0,03X_1X_2 + 0,04X_1X_3 - 0,03X_2X_3 - 0,03X_1X_2X_3$$

$$Y_{NP} = 15,51 - 0,60X_1 + 0,53X_3 + 0,67X_1X_3$$

Analizando los polinomios se aprecia que la retención de la CT depende de las variables estudiadas y sus interacciones, pero fundamentalmente del efecto del pH (X_3), de manera que para disminuirla conviene emplear temperaturas (X_1) y tiempos (X_2) elevados, pero valores de pH bajos. Sin embargo, en los resultados experimentales mostrados en la Tabla I se observa que la retención menor de CT se obtiene en la experiencia 2, la que se realizó a temperatura elevada, pH bajo y contrariamente a lo indicado por el polinomio, empleando un tiempo bajo. Esta contradicción aparente pudiera explicarse porque, como muestran los coeficientes del polinomio, el peso del efecto del tiempo sobre la retención de CT es muy pequeño y pudiera ser contrarrestado en la práctica por el efecto contrario y mayor de la interacción temperatura tiempo (X_1X_2), resultando en la práctica conveniente el empleo de valores de tiempo bajos.

TABLA I
Resultados del diseño experimental 2^3 exploratorio de las condiciones de separación térmica diferencial de las proteínas

Experiencias	Retenido en extractos (mg/100 mL)		Coeficientes del polinomio ajustado		Coloración visual de los extractos tratados
	CT	NP	CT	NP	
1	0,38	15,68	$b_0 = 0,36$	$b_0 = 15,51$	ámbar claro-verdoso
2	0,05	13,72	$b_1 = -0,08$	$b_1 = -0,60$	ámbar claro-tinte verdoso
3	0,31	16,80	$b_2 = -0,01$	$b_2 = 0,18$	ámbar claro-verdoso
4	0,19	13,72	$b_3 = 0,13$	$b_3 = 0,53$	ámbar claro-verdoso
5	0,55	15,96	$b_{12} = 0,03$	$b_{12} = -0,11$	ámbar oscuro-verdoso
6	0,48	15,96	$b_{13} = 0,04$	$b_{13} = 0,67$	ámbar oscuro-verdoso
7	0,50	15,96	$b_{23} = -0,03$	$b_{23} = -0,11$	ámbar oscuro-verdoso
8	0,40	16,24	$b_{123} = -0,03$	$b_{123} = 0,18$	ámbar oscuro-verdoso
Criterio de aceptabilidad (P < 0,05)			0,004	0,52	

CT Clorofila total
 NP Nitrógeno proteico

Como se aprecia en el polinomio correspondiente, la retención del NP no depende del tiempo y, como es lógico, aumenta a valores de la temperatura bajos y del pH elevados.

Debido a que los extractos presentaban cuando menos una coloración con tinte verdoso, como el extracto de la experiencia 2, así como que sus contenidos

de CT son bastante mayores que los establecidos en la literatura como permisibles para la obtención de un concentrado de proteínas blanco ($\leq 0,1 \text{ mg de CT/100 mg de NP}$)¹³, se realizó un diseño experimental similar variando las condiciones en la dirección de la retención mínima de la CT, presentándose sus resultados en la Tabla II.

TABLA II
Resultados del diseño experimental 2³ en la dirección de la retención mínima de clorofila total

Experiencias	Retenido en extractos (mg/100 mL)		Coloración de los extractos
	CT	NP	
1	0	2,24	amarillenta
2	0	1,68	amarillenta
3	0	3,08	amarillenta
4	0	3,08	amarillenta
5	0	0	ámbar claro
6	0	0	ámbar claro
7	0	0	ámbar claro
8	0	0	ámbar claro

CT Clorofila total
NP Nitrógeno proteico

Como se aprecia en esta tabla, en todas las experiencias la retención de la CT y prácticamente la del NP fue nula, presentando los extractos una coloración amarillenta o ámbar clara, indicando que las condiciones de temperatura empleadas (60 a 65 °C), tiempo de calentamiento (7 a 11 s) y pH del extracto (3,5 a 4,5) fueron muy drásticas. Considerando estos resultados y los del diseño anterior se concluye que la zona experimental en que se localiza la retención mínima de CT con la máxima retención posible de NP se encuentra entre los valores siguientes:

55 °C < temperatura < 60 °C

11 s < tiempo < 16 s

4,5 < pH < 5,0

Se decidió continuar las experiencias empleando el tiempo de 16 s, considerando que el papel fundamental en la retención de la CT lo desempeña el pH y que la diferencia entre 11 y 16 s es tan pequeña que difícilmente puedan lograrse en la práctica tiempos de calentamiento intermedios entre éstos.

Los resultados de optimización del pH a la temperatura de 55 °C se reflejan en la Tabla III, apreciándose que la retención mínima de la CT se obtiene a los pH 4,6 y 4,8, pero la relación CT/NP se mantiene aproximadamente en 0,2 y los extractos presentan una coloración con tinte verdoso. Dado que la retención de NP es mayor a pH 4,8 se tomó este valor para efectuar la optimización de la temperatura obteniéndose los resultados presentados en la Tabla IV. Como se observa la retención mínima de la CT se logra a las temperaturas de 58 y 60 °C, pero se retiene significativamente más NP en el primer caso, por lo que su relación CT/NP en el extracto es prácticamente 0,1. La falta de coloración verde en el extracto obtenido a la temperatura de 58 °C indica que la separación de la CT es satisfactoria en estas condiciones.

CONCLUSIONES

Se determinó que es posible separar las proteínas "cloroplásticas" y "citoplasmáticas" extraídas del residuo foliar verde de la cosecha del boniato mediante el ajuste del pH del extracto al valor 4,8 y el calentamiento

rápido del mismo a 58 °C durante 16 s. En estas condiciones se obtiene un extracto prácticamente libre de clorofila total con la retención máxima posible de nitrógeno proteico.

TABLA III
Resultados de la optimización del pH en la separación de las proteínas

pH	Retenido en extractos (mg/100 mL)		Coloración visual de los extractos
	CT	NP	
4,6	0,04 (a)	15,25 (a)	ámbar claro-tinte verdoso
4,8	0,03 (a)	17,25 (b)	ámbar claro-tinte verdoso
5,0	0,06 (b)	17,35 (b)	ámbar claro-tinte verdoso

Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0,05)

CT Clorofila total
NP Nitrógeno proteico

TABLA IV
Resultados de la optimización de la temperatura en la separación de las proteínas

Temperatura (°C)	Retenido en extractos (mg/100 mL)		Coloración visual de los extractos
	CT	NP	
55	0,04 (a)	15,44 (a)	ámbar claro-tinte verdoso
58	0,02 (b)	16,02 (a)	ámbar claro-tinte verdoso
60	0,02 (b)	14,00 (b)	ámbar claro-tinte verdoso

Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0,05)

CT Clorofila total
NP Nitrógeno proteico

BIBLIOGRAFIA

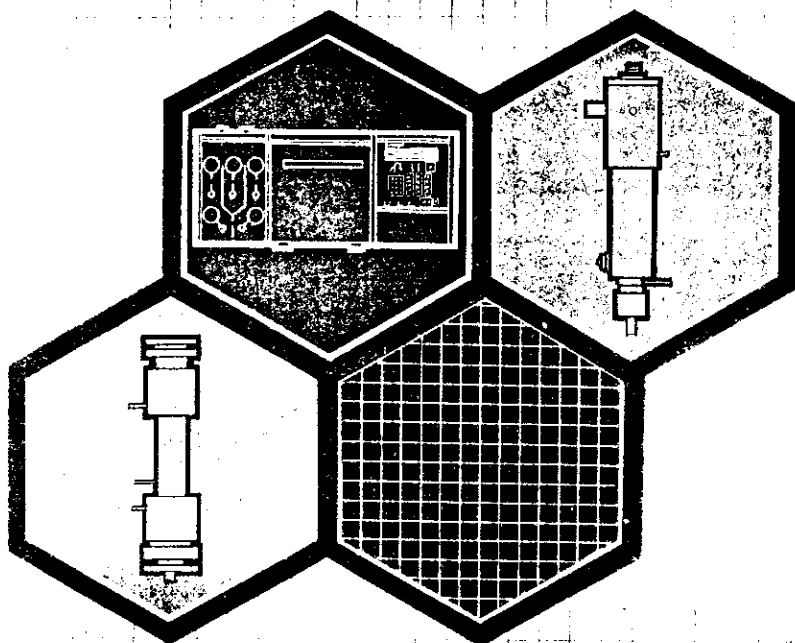
1. Wildman S. G. and Bonner J. *Arch. Biochem.* 14, 381, 1947.
2. Fremery D. de, Miller R. E., Edwards R. H., Knuckles B. E., Bickoff E. M. and Kohler G. O. *J. Agr. Food Chem.* 21, 886, 1973.
3. Lexander K., Carlsson R., Sehalen V., Simonsson A. and Lundborg T. G. *Ann. Appl. Biol.* 66, 193, 1970.
4. Spencer R. R., Mottola A. C., Bickoff E. M., Clark J. P. and Kohler G. O. *J. Agr. Food Chem.* 19, 504, 1971.
5. Edwards R. H., Miller R. E., Fremery D. de., Knuckles B. E., Bickoff E. M. and Kohler G. O. *J. Agr. Food Chem.* 26, 738, 1975.
6. Hollo J. and Koch L. Commercial production in Hungary in "Leaf protein: Its agronomy, preparation, quality and use, I.B.P. handbook No. 20, 63-68, Pirie N. W. Ed., Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1971.
7. Fiorentini R. and Galoppini C. *J. Food Sci.* 46, 1514, 1981.
8. Romero J., Díaz D. y Valdés C. *Revista de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1986. En preparación.

9. López Planes R. Notas de estadística y diseño estadístico. Folleto CENIC, 2da parte, 1977.
10. Lerch G. La Experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. 210, Ed. Científico-Técnica, La Habana, 1977.

11. Bailey J. L. Techniques in Protein Chemistry. 301 Elsevier Publishing Co., London, 1962.
12. A. O. A. C. Official Methods of Analysis, 13th Ed., Washington, 49 (3. 127), 1980.
13. Merodio C., Martin M. and Sabater B. J. *Agri. Food Chem.* 31, 957, 1983.

CROMATOGRAFO CG 500

Controlado mediante microprocesadores



CARACTERÍSTICAS OPERACIONALES

Sensibilidad del amplificador Electrométrico: 1×10^{-12} A/mV
 Sensibilidad del detector: 0,012 C/g
 Cantidad mínima detectable: $5,2 \times 10^{-12}$ g/s (n-octano)
 Nivel de ruido: 3×10^{-14} A
 Rango dinámico: $4,12 \times 10^6$

Para su manipulación, la cual se realiza de forma muy fácil se brindan al usuario:

Teclas de introducción de datos
 Teclas de funciones (veloc., tiempo, temp.)
 Teclas de lugar (horno, detec., inyec.)
 Teclas de control del proceso cromatográfico
 Teclas de encendido y apagado

Centro Nacional de Investigaciones Científicas



Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa
 Apartado Postal 6980 y 6990
 Teléf. 21-8066. Ciudad de La Habana, Cuba Telex: 51-1582 CNICA CU