

Determinación de proteínas en hojas de Citrus. II. Extracción, fraccionamiento y cuantificación

POR

A. L. GARCIA y J. SANCHEZ-ROJAS

ABSTRACT

The extraction conditions for the chloroplastic and cytoplasmic proteins of the Verna lemon tree leaves physiologically normals are studied, choosing disgregation methods and extractants.

For the cytoplasmic proteins, tris-glycine-glucose (TGG) is selected as extractant (eluent), being established the action of each one of their components and the optimum pH. Likewise, it is tested that the addition to the buffer solution of different protective substances relatives to the formation of protein-quinone complex, do not improve the buffer quality.

The sedimentations conditions for chloroplasts are the following: 6000 x g during 45 minutes using as the more appropriate extractant (eluent) for the chloroplastic protein, the sodium dodecil sulphate at a concentration of 0,5 %.

A fractionation of the cytoplasmic proteins, using amonium sulphate and trichloroacetic acid (TCA) is made. The chloroplastic proteins are divided at the same time in soluble and insoluble.



INTRODUCCION

Dentro de la gran importancia que desde cualquier punto de vista tienen las proteínas vegetales, las localizadas en las hojas de las plantas superiores presentan un interés especial, pues en ellas se sintetizan la mayor parte de las sustancias que integran el vegetal.

A pesar del interés que siempre ha suscitado el estudio de estas proteínas, hasta hace relativamente poco tiempo los trabajos desarrollados en este campo han sido relativamente escasos. A ello puede haber contribuido la baja concentración en que se encuentran, factor este que requiere técnicas de extracción exhaustivas y que eviten, en lo posible, las desnaturalizaciones que tan frecuentemente se producen en este tipo de compuestos.

Las proteínas citoplásmicas, según Byers (6), son las precipitables de un extracto después de separar la fracción que contiene clorofilas y su composición depende del método usado para separar el material cloroplástico. Esta definición, aunque aceptable, es poco precisa, ya que en la disgregación del material y fraccionamiento proteico pueden producirse contaminaciones debido a la ruptura de ciertos orgánulos como cloroplastos, mitocondrias, núcleos, etc. (33).

Para la extracción de las proteínas foliares hay que realizar una disgregación del material vegetal en presencia de un extractante cuya misión es, al menos teóricamente, que las proteínas pasen cuantitativamente al medio extractante con el menor deterioro posible. Los procedimientos más utilizados son el de trituración en mortero usando arena de mar como abrasivo (2, 37) y la homogeneización eléctrica (37).

Los extractantes empleados son muy numerosos y dentro de ellos se encuentra el tampón fosfato pH 7 (27), cloruro sódico (10), hidróxido sódico (19), agua (1, 18), ácido clorhídrico (10) y tampón tris-glicina-glucosa pH 8,5 (37).

Las proteínas cloroplásticas se clasifican (36) en dos grupos: las solubles, integradas principalmente en la fracción I (16), y las insolubles o laminares, que están unidas a la clorofila formando la estructura cloroplástica y que al parecer intervienen activamente en el proceso fotosintético.

Para obtener los cloroplastos aislados, el proceso de disgregación del material vegetal no debe ser excesivamente enérgico para evitar la fragmentación mecánica de los mismos. Asimismo, es necesario utilizar simultáneamente determinadas sustancias que proporcionen un medio isotónico al de los cloroplastos (12, 14).

La sedimentación cloroplástica es función del tiempo y de la fuerza centrífuga a que se somete la suspensión y depende de la especie vegetal de que se trate, ya que el número y tamaño de los cloroplastos (12, 14, 20), es específico de ellas.

La división inicial en proteínas citoplásmicas y cloroplásticas, según lo expuesto anteriormente, debe considerarse un tanto relativa, pues la proporción que se obtiene para ambas depende de la especie vegetal de que se trate (6) y del procedimiento seguido para su extracción (24). Por esta razón no es de extrañar que en la bibliografía se den frecuentemente porcentajes distintos según el caso que se considere (9, 33, 34). El fraccionamiento de las proteínas citoplásmicas se puede realizar en función de su diferente solubilidad en disoluciones de electrolitos. Uno de los más empleados es el sulfato amónico, que se utiliza en concentraciones variables, siendo las más frecuentes las del 40 y 60 % (8, 29, 30, 31). La elección de este rango se basa en la posible existencia de fracciones proteicas de naturaleza relativamente homogénea (9). El resto de proteínas que no precipitan con sulfato amónico del 60 % lo hacen con TCA del 10 %. Las proteínas cloroplásticas se suelen fraccionar en solubles, por acción de una disolución hipotónica, e insolubles que se separan por la acción de detergentes (4, 7, 12, 13, 15, 20).

Cuando se utilizó en un trabajo anterior proteína patrón, los métodos que se mostraron más adecuados en cuanto a sensibilidad y reproductibilidad fueron los de Folin-Lowry y absorción en el ultravioleta a 280 nm. Sin embargo, la aplicación de éstos a extractos sin purificar no proporcionan resultados correctos a causa de diversos compuestos que acompañan a las proteínas (15, 26, 28, 32, 35). Las sustancias interferentes pueden proceder de los extractantes o de los compuestos celulares. De entre estos últimos, los de naturaleza fenólica son los que presentan mayores dificultades debido a su fácil oxidación a quinonas y posterior formación de complejos quinonas-proteínas bastante estables (17). Por todo ello, la cuantificación de proteínas vegetales exige una purificación previa del extracto con el fin de eliminar lo más posible las contaminaciones.

En este trabajo se estudian distintas formas de disgregación del material vegetal y extractantes para la determinación cuantitativa de proteínas foliares, así como algunos procedimientos para eliminar interferencias. Asimismo, se efectúa un fraccionamiento de proteínas citoplásmicas y cloroplásticas y se concreta el método más idóneo para su determinación cuantitativa.

MATERIAL Y METODOS

El material utilizado son hojas de Citrus Limón, variedad Verna, de 4 a 7 meses de edad procedentes de árboles fisiológicamente normales.

DISGREGACIÓN DEL MATERIAL

Los procedimientos empleados fueron los siguientes:

a) Para la obtención de las proteínas citoplásmicas se efectúa una trituración en mortero con arena de mar lavada al ácido como abrasivo, en presencia de extractantes.

b) Para las cloroplásticas, trituración en un homogeneizador eléctrico con un extractante adecuado.

EXTRACTANTES

Como extractante para las proteínas citoplásmicas se usó el tampón Tris 0,041 M-glicina 0,32 M-glucosa 0,67 M, pH=8,5 (37). También se ensayaron los siguientes: Tampón fosfato, pH=7; cloruro sódico al 1 %; hidróxido sódico 0,2 %; pirofosfato sódico 0,01 M; agua; ácido clorhídrico 0,1 % y ácido acético 0,01 M.

Para el aislamiento de los cloroplastos se utilizó la disolución isotónica: Sacarosa 0,5 M-tris 0,05 M-cloruro magnésico 1 mM-mercaptoetanol 4 mM, pH=7,8 (12).

FRACCIONAMIENTO

Para las proteínas citoplásmicas se realizó en función de su distinta solubilidad en disoluciones de sulfato amónico al 40 y 60 %. El resto se precipitó con TCA al 10 %. De esta forma se obtienen tres fracciones proteicas.

De las proteínas cloroplásticas, la fracción soluble se separó a partir del botón cloroplástico, el cual se trata posteriormente con disolución hipotónica: Tris 0,01 M-cloruro magnésico 1 mM-mercaptoetanol 4 mM, pH=7,8. Para las insolubles, los cloroplastos y sus fragmentos se tratan con dodecilsulfato sódico al 0,5 %.

Todos los productos utilizados fueron R. A.

La metodología para la determinación de proteínas y sus fracciones se realiza según (24). Para las medidas espectro y colorimétricas se usa un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer mod. 124.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para establecer las condiciones de extracción de las proteínas de hojas de Citrus es necesario considerar distintos procedimientos según consideremos las proteínas soluble (citoplásmicas) o las obtenidas de los cloroplastos.

El primer paso para la extracción de las proteínas citoplásmicas es la disgregación del material. Las experiencias previas realizadas en este sentido nos indican que en la homogeneización eléctrica hay un aumento de la temperatura, que podría desnaturalizar parcialmente las proteínas y también una formación de emulsiones que, al tener que eliminarlas, conducen a un mayor número de manipulaciones. Por ello, elegimos la trituration en mortero con arena de mar como abrasivo, al observar, además, una mejor disgregación del material vegetal.

El conocimiento de la relación óptima peso hoja/volumen de extractante es indispensable para una extracción cuantitativa. Para concretar esta relación, se tritularon tres muestras de 1 g cada una con 50 ml de extractante (tampón fosfato, pH 7). Los homogeneizados se filtraron lavando el residuo con volúmenes iguales de extractante (50 ml). Los resultados se representan en la figura 1.

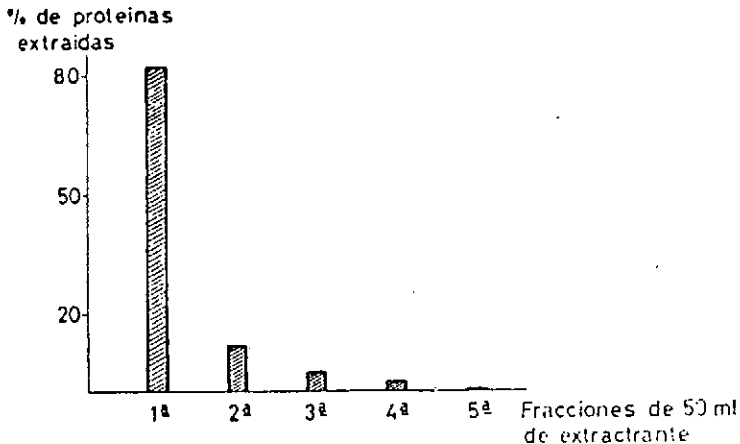


Fig. 1.—Porcentaje de proteínas en función del volumen de extractante utilizado. Media de muestras por triplicado.



La consideración de los datos nos indica que, si bien la primera fracción de 50 ml extrae la mayor parte de las proteínas, sólo se puede considerar prácticamente total cuando se utilizan 200 ml de extractante.

La misión fundamental del extractante es disolver las proteínas puestas en libertad al disgregar el material y preservarlas de las desnaturalizaciones. Todo ello condiciona la naturaleza de los compuestos que forman parte del mismo.

Los extractantes utilizados son muy numerosos, experimentándose los siguientes: Cloruro sódico, Hidróxido sódico, Pirofosfato sódico, Agua, Acido clorhídrico, Acido acético, Tampón fosfato pH 7 y Tris-glicina-glucosa pH 8,5. Las concentraciones proteicas obtenidas para cada uno de ellos frente a muestras idénticas de hojas se muestran en la tabla I.

TABLA I
VALORES DE PROTEINAS EN MG POR 100 G DE MATERIA SECA
PARA OCHO EXTRACTANTES DISTINTOS. METODO DE FOLIN-LOWRY

Muestra	ClNa 1 %	NaOH 0,2 %	P ₂ O ₇ Na ₄ 0,01 M	Tampón fosfato pH 7
1	1718,5	2911,6	1992,1	3240,0
2	1718,5	2911,6	1992,1	3021,1
3	1729,4	2845,9	1937,5	3021,1
4	1663,8	2802,2	2014,0	3064,9
Media	1707,5	2867,8	1983,9	3086,7
Muestra	Tris 0,041 M Glic 0,32 M Gluc 0,67 M	H ₂ O	ClH 0,1 %	Acido acético 0,01 M
1	4312,7	1346,3	131,3	131,3
2	4268,9	1291,6	131,3	180,6
3	4356,5	1236,9	207,9	153,2
4	4203,2	1360,2	153,2	153,2
Media	4285,3	1333,7	155,9	154,5

Los datos anteriores ponen de manifiesto, inicialmente, que el extractante más cuantitativo es el formado por: Tris-0,041 M-Glicina-0,32; M1Glucosa 0,67 M pH 8,5. Sin embargo, antes de aceptar este tampón como el extractante más apropiado para el material vegetal en estudio, es necesario dilucidar las cuestiones siguientes: 1.^a) Comprobar el pH óptimo, 2.^a) Acción de los componentes en la extracción, y 3.^a) Mejorar su composición para que cuali y cuantitativamente la extracción sea máxima y específica.

El rango de pH establecido por numerosos autores (3, 5, 11, 23) varía desde la neutralidad a valores básicos no excesivamente altos. Para comprobar su posible influencia se prepararon tampones Tris-glicina-glucosa a distintos pH: 7, 7,5, 8, 8,5 y 9.

Los resultados, resumidos en la tabla II, muestran que la máxima extracción corresponde a una valor de pH igual a 8,5.

TABLA II

INFLUENCIA DEL pH DEL TAMPON TRIS-GLICINA-GLUCOSA EN LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN HOJAS DE CITRUS. MEDIA DE MUESTRAS POR TRIPLICADO. METODO DE FOLIN-LOWRY

<i>pH</i>	<i>Mg de proteína por 100 g de peso seco</i>	<i>Porcentajes con respecto a la extracción máxima</i>
7	4748,1	89,35
7,5	4899,8	92,20
8	5278,3	99,32
8,5	5314,5	100,00
9	5230,2	98,42

Para esclarecer la acción de los componentes del tampón se realizaron extracciones en las mismas condiciones con disoluciones de Tris, Tris-glicina y Tris-glicina-glucosa, todas a pH 8,5. En todos los casos se determinaron proteínas totales y se realizaron los espectros en el ultravioleta de los extractos dializados.

Los datos de la tabla III muestran que el contenido proteico disminuye algo al utilizar Tris-glicina con respecto a los otros, pero las diferencias no son significativas para sacar conclusiones acerca del papel que desempeñan glicina y glucosa.

TABLA III

INFLUENCIA DE LOS COMPONENTES DEL TAMPON TRIS-GLICINA-GLUCOSA EN LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN HOJAS DE CITRUS. MG DE PROTEÍNAS POR 100 G DE HOJA SECA. METODO DE FOLIN-LOWRY

<i>Muestra</i>	<i>Extractante utilizado</i>		
	<i>Tris</i>	<i>Tris-Glicina</i>	<i>Tris-Glicina-Glucosa</i>
1	4760,8	4633,5	4760,8
2	4760,8	4582,5	4760,8
3	4888,1	4582,5	4964,4
4	4837,1	4606,2	5015,3
Media	4811,7	4601,1	4875,3



Sin embargo, el análisis espectrofotométrico de los extractos (figura 2) muestra notables discrepancias. Según fuentes bibliográficas (14), la formación de complejos imioquinonas-proteínas, modifican el espectro característico de éstas, de tal forma que el máximo a 270-280 nm se convierte en inflexión.

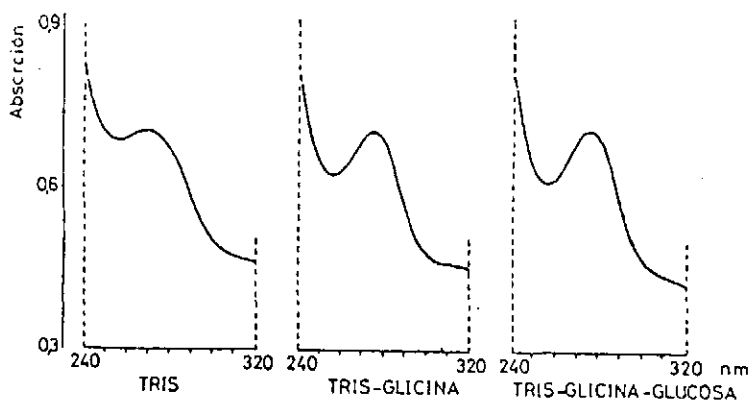


Fig. 2.—Espectros de absorción en el ultravioleta (240 a 320 nm) de extractos vegetales según los componentes del tampón utilizado.

El mínimo en la zona 260-250 nm aparece más definido en orden creciente para Tris, Tris-glicina, Tris-glicina-glucosa. Es presumible, pues, que en el extracto con Tris la formación de estos compuestos sea menor.

Para estudiar este proceso se añadió a los tres extractos una pequeña cantidad de oxidante (H_2O_2), la misma en cada caso. En estas condiciones se debería favorecer el paso de polifenol a quinona y, por lo tanto, la formación de complejos. Figura 3.

La glicina y en mayor proporción la glicina-glucosa, contrarrestan, dentro de ciertos límites de concentración, la acción de oxidantes externos al sistema (H_2O_2 , O_2 del aire). Por lo tanto, consideramos que la adición de glicina y glucosa al tampón Tris, proporciona una acción estabilizadora así como una protección frente a la formación de complejos.

La formación de complejos proteína-quinina dificultan la determinación de aquéllas, pues interfieren en los procesos de extracción y purificación, resultando una pérdida en la extracción.

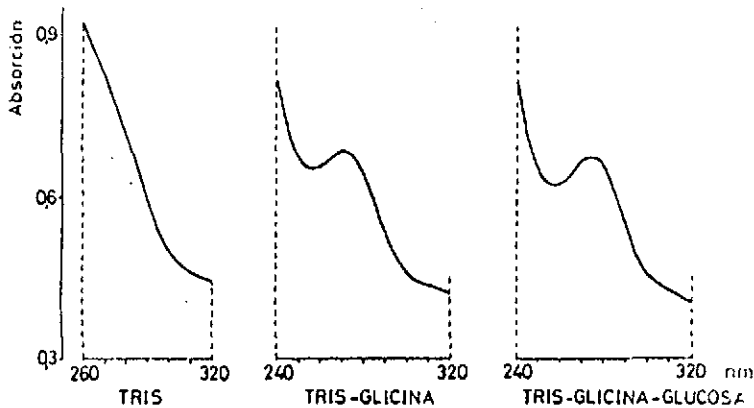


Fig. 3.—Espectros de absorción en el ultravioleta (240 a 320 nm) de extractos vegetales según los componentes del tampón utilizado, previa adición de H_2O_2 .

Son abundantes las sustancias que se emplean para tratar de eliminar o minimizar esta acción complejante (21, 22, 25) pudiéndose clasificar en:

a) Productos con más afinidad por las quinonas que las proteínas, como son las polivinilpirrolidona (PVP), polietilen glicol y resinas de intercambio iónico.

b) Sustancias que dificultan la formación de quinonas o que reaccionen con ellas a medida que se originen. Entre ellas se encuentran reductores como ácido ascórbico, tioglicol y mercaptoetanol.

Para conocer el efecto que producen las sustancias del tipo considerado en el primer grupo, al adicionarlas al tampón TGG, se efectuó una experiencia en la que se determinaron las proteínas extraídas con TGG al que se le añadieron cantidades crecientes de resina Dowex 1×8. Los valores se exponen en la tabla IV.

Los resultados ponen de manifiesto que las resinas retienen las proteínas en cantidad apreciable; si bien hay que hacer notar que los extractos, una vez dializados, presentan en el ultravioleta unos máximos mucho más definidos. En la figura 4 se refleja este hecho, llevando los extractos a concentraciones tales que la absorción a 275 nm fue en todos los casos la misma.

TABLA IV

EXTRACCION DE PROTEINAS FOLIARES DE CITRUS CON TAMPON TRIS-GLICINA-GLUCOSA Y DISTINTAS CONCENTRACIONES DE DOWEX 1×8. MEDIA DE MUESTRAS POR TRIPLICADO

Muestra	Concentración Dowex 1×8 g por 100 ml tampón	Mg proteína por 100 g peso seco	Porcentajes con respecto a la extracción máxima
1	1	3232,0	69,65
2	0,5	4020,5	86,65
3	0,25	4292,5	92,51
4	0,1	4480,5	96,56
5	0	4639,9	100,00

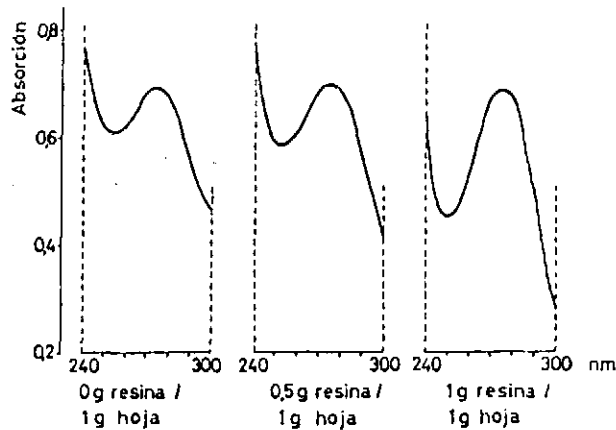


Fig. 4.—Espectros de absorción de extractos proteicos de igual concentración obtenidos con tampón Tris-glicina-glucosa y distintas concentraciones de Dowex 1×8.

Se deduce que, si bien la resina ejerce una función purificadora por su capacidad de retener quinonas, este efecto se manifiesta también para las proteínas. Por tanto, su empleo queda circunscrito exclusivamente a experiencias cualitativas.

En cuanto a sustancias de naturaleza reductora se ensayaron ácido ascórbico, tioglicol y mercaptoetanol. Dichos productos se adicionaron a alícuotos del tampón original, hasta alcanzar en éste las concentraciones 0,1 %, 0,01 % y 0,01 M, respectivamente.

La adición de estos compuestos reductores no producen diferencias muy significativas, por lo que es de suponer que la acción protectora

de la glicina y glucosa sea, en nuestro caso, similar a la de las sustancias ensayadas.

Dado que en los vegetales se encuentran sustancias que absorben a longitudes de onda similares a las proteínas (fenoles, ácidos nucleicos, etc.), y que pueden acompañarlas en los extractos, el espectro de éste en el ultravioleta no sólo confirma la existencia de proteínas, sino que puede dar una idea del grado de pureza en que éstas se encuentran.

En la figura 5 se resume la experiencia destinada a la caracterización espectrofotométrica de las proteínas.

El máximo correspondiente a las proteínas (275 nm) aumenta su definición en el orden: extracto bruto (2A), extracto dializado (2B), extracto precipitado, redissuelto y dializado (3), el cual es muy semejante al de la albúmina patrón (1) aunque con una ligera absorción a 330 nm; finalmente (4), el extracto vegetal bruto, al que se había restado como «blanco» uno previamente desproteinizado y que corresponde exclusivamente a las proteínas presentes.

Por último, para corroborar el método de extracción de proteínas citoplásmicas, se realizó una experiencia de reproductibilidad. Se utilizaron diez muestras de pesos idénticos y los datos se obtuvieron por triplicado, tabla V.

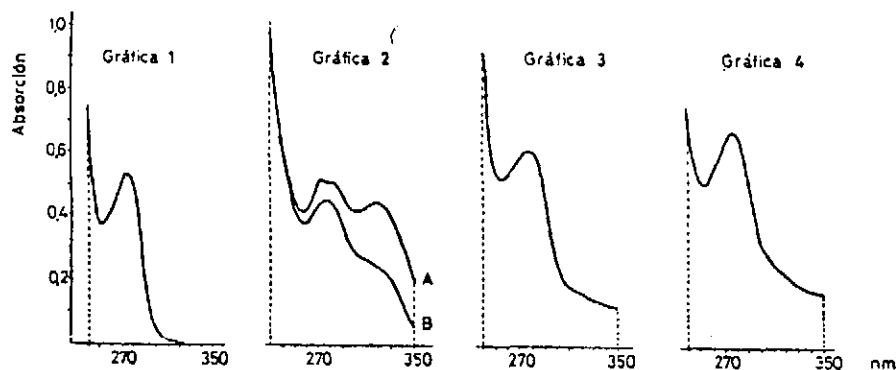


Fig. 5.—Espectros de absorción en el ultravioleta de albúmina patrón y de extractos citoplásmicos de hojas de Citrus.

Gráfica 1: Albúmina de buey (patrón).

Gráfica 2: A) Extracto bruto. B) Extracto dializado.

Gráfica 3: Proteína precipitada con ácido tricloroacético al 10 %, redissuelta en NaOH 0,2 y dializada.

Gráfica 4: Extracto bruto frente a «blanco» previamente desproteinizado.

TABLA V

REPRODUCTIBILIDAD DE LA EXTRACCION DE PROTEINAS CITOPLASMICAS
EN HOJAS DE CITRUS. ABS. A 500 nm

Media	0,353
E_M	0,002
Des. St.	0,009
Límites 5 %	0,333-0,373
C. V. %	2,63

Los datos confirman que el método de extracción es reproducible dentro de unos límites de error válido.

La disgregación del material vegetal con objeto de aislar los cloroplastos, requiere que el proceso de ruptura celular no sea excesivamente energético para evitar, en lo posible, la fragmentación mecánica de los mismos y además el empleo de determinados compuestos que proporcionen un medio isotónico al de los cloroplastos.

La sedimentación cloroplástica en función del tiempo y fuerza centrífuga depende de la especie vegetal de que se trate. Para concretar estos extremos se tomaron cinco grupos de dos alícuotos cada uno de una suspensión purificada de cloroplastos y se centrifugó a distintos tiempos a 2.000 y 6.000 x g. Los botones cloroplásticos se trataron con DSS y DCS al 0,5 % y en las disoluciones se determina la concentración proteica por el método de Folin-Lowry. Los resultados se representan en la figura 6.

Los datos permiten aseverar que a 2.000 x g no se llega a conseguir la máxima sedimentación, sin embargo, a 6.000 x g es suficiente un tiempo de 45 minutos. El extractante más apropiado es el DSS.

De forma análoga a las proteínas citoplásmicas, las cloroplásticas deben presentar un espectro característico a 270-280 nm. En la figura 7 se resume la experiencia desarrollada para la caracterización de las proteínas cloroplásticas.

El extracto bruto (2), en el que se encuentra solubilizado el complejo proteína-clorofila-detergente, muestra grandes interferencias y en la zona 270-280 nm una inflexión. La purificación del extracto con butanol y éter de petróleo proporciona un máximo bien definido a 275 nm (3), aunque existen sustancias no proteicas entre 288 y 700 nm. El espectro que se obtiene al precipitar, lavar, redissolver y dializar las proteínas (4), presenta mayor semejanza con el de la albúmina patrón (1), con un máximo claramente definido a 275 nm.

Para establecer la reproductibilidad se determinaron por el método de Folin-Lowry las proteínas sobre dos alícuotos de diez muestras. Los

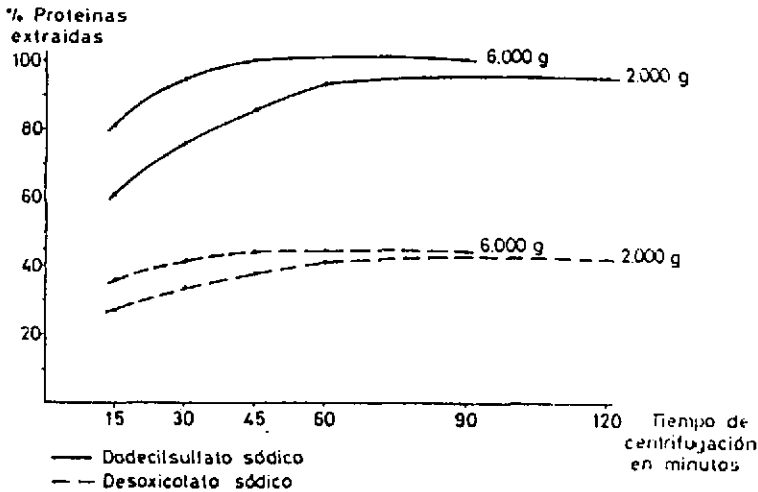


Fig. 6.—Porcentajes de proteínas cloroplásticas extraídas en función de las condiciones de sedimentación y del extractante utilizado.

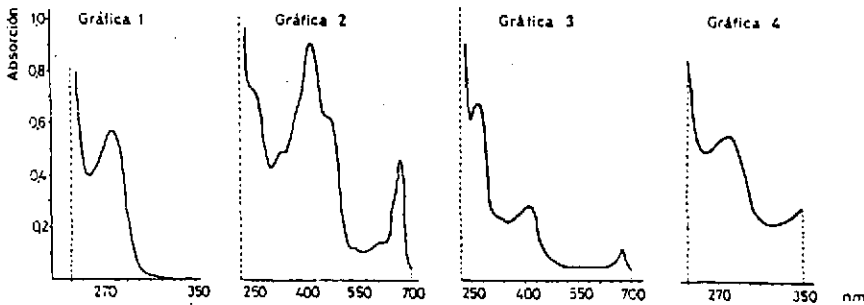


Fig. 7.—Espectros de absorción en el ultravioleta de albúmina patrón y de extractos cloroplásticos de hojas de Citrus.

Gráfica 1: Albúmina de buey (patrón).

Gráfica 2: Botón cloroplástico + detergente.

Gráfica 3: Botón cloroplástico + detergente tratado con butanol y posteriormente con éter de petróleo.

Gráfica 4: Proteína precipitada con ácido tricloroacético al 10 %, redisuelta en NaOH 0,2 N y dializada.



datos de media, E_m , desviación estándar, límites al 5 % y coeficiente de variabilidad se muestran en la tabla VI.

TABLA VI

Media	0,185
E_m	0,002
Des. St.	0,008
Límites 5 %	0,169-0,202
C. V. %	4,11

El coeficiente de variabilidad calculado es algo superior al de las proteínas citoplásmicas, no obstante, el valor se encuentra dentro de límites tolerables.

Los dos métodos (Folin-Lowry y absorción en el ultravioleta) considerados son válidos para proteína patrón; sin embargo, la gran cantidad de sustancias que acompañan a las proteínas de extractos foliares hace que éstos no proporcionen resultados correctos en la mayoría de los casos. Para establecer cuál de los dos métodos es el más apropiado para la cuantificación, se realizan las siguientes experiencias:

a) *Citoplásmicas*. Las proteínas extraídas se precipitan con TCA al 10 % y después se lava con éter etílico y redisuelve en hidróxido sódico 0,2 N. En la disolución las proteínas se determinan por ámbos métodos. Los resultados se exponen en las tablas VII y VIII.

Los resultados permiten señalar que los valores obtenidos en la determinación por ultravioleta son más elevados y presentan más variaciones que los obtenidos por Folin-Lowry. Posiblemente, la causa que motiva este hecho sea que las proteínas conservan, aún unidas a ellas, compuestos que presentan una marcada absorción a 280 nm.

TABLA VII

PROTEINAS CITOPLASMICAS. METODO DE FOLIN-LOWRY.
VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO

Media	159
E_m	1,00
Des. St.	2,00
Límites 5 %	155-163
C. V. %	1,26

TABLA VIII

PROTEINAS CITOPLASMICAS. METODO ESPECTROROTOMETRICO A 280 nm.
VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO

Media	586
E_m	8,63
Des. St.	38,60
Límites 5 %	505-666
C. V. %	6,58

Para comprobar si esta interferencia se presenta exclusivamente en la determinación espectrofotométrica, se tomaron cuatro alícuotos del mismo extracto y a dos de ellos se les aplicó la metodología de purificación por precipitación. La concentración proteica obtenida por ambos métodos demuestran que una mayor purificación no afecta a los valores dados por Folin-Lowry, mientras que los del ultravioleta sufren notables descensos (tabla IX).

TABLA IX

PROTEINAS CITOPLASMICAS CON DIFERENTES GRADOS DE PURIFICACION, CUANTIFICADAS POR FOLIN-LOWRY Y ABSORCION EN EL ULTRAVIOLETA. VALORES EXPRESADOS EN ppm

Muestra	Folin-Lowry		Ultravioleta
1	160	162	595
1'	160	158	610
2	159	160	269
2'	161	158	264

b) *Cloroplásticas*. Las experiencias efectuadas con las proteínas extraídas del botón cloroplástico por acción del DSS, fueron similares a las expuestas para las citoplásmicas. Los resultados se exponen en las tablas X, XI y XII.

TABLA X

PROTEINAS CLOROPLASTICAS. METODO DE FOLIN-LOWRY. VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO

Media	211
E_m	1,00
Des. St.	3,00
Límites 5 %	204-217
C. V. %	1,56

TABLA XI

PROTEINAS CLOROPLASTICAS. METODO ESPECTROFOTOMETRICO A 280 nm. VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO

Media	980
E_m	12,18
Des. St.	53,11
Límites 5 %	869-1091
C. V. %	5,41

TABLA XII

PROTEINAS CLOROPLASTICAS CON DISTINTOS GRADOS DE PURIFICACION. METODOS DE FOLIN-LOWRY Y ABSORCION A 280 nm. VALORES EXPRESADOS EN ppm

Muestra	Folin-Lowry		Ultravioleta
1	217	217	971
1'	217	214	968
2	214	217	725
2'	210	206	720

Los datos anteriormente expuestos permiten deducir las mismas consecuencias ya expresadas en el apartado anterior. Todo ello nos ha inducido a adoptar como método de cuantificación de proteínas en hojas de Citrus el de Folin-Lowry.

A partir del fraccionamiento inicial en proteínas citoplásticas y cloroplásticas, se han intentado nuevos fraccionamientos en ambos grupos. El de las proteínas citoplásticas se ha realizado en función de su diferente solubilidad en disoluciones de sulfato amónico cuyas concentraciones son del 40 y 60 % y TCA del 10 %.

Para estudiar la reproductibilidad se precipitaron diez volúmenes iguales de extracto citoplásmico con sulfato amónico al 40 %, determinándose el contenido proteico. Los resultados se muestran en la tabla XIII.

TABLA XIII

REPRODUCTIBILIDAD DE LA FRACCION PRECIPITADA CON SULFATO AMONICO DEL 40 %. VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO. ABSORCION 500 nm

Media	0,391
E_m	0,002
Des. St.	0,007
Límites 5 %	0,377-0,405
C. V. %	1,69

A los líquidos separados de la precipitación anterior se les añadió sulfato amónico hasta que la concentración del mismo es de 60 %. Las proteínas precipitadas se determinaron por Folin. Los resultados se dan en la tabla XIV.

TABLA XIV

REPRODUCTIBILIDAD DE LA FRACCION PRECIPITADA CON SULFATO AMONICO DEL 60 %. VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO. ABSORCION 500 nm

Media	0,412
E_m	0,002
Des. St.	0,007
Límites 5 %	0,398-0,426
C. V. %	1,59

El extracto obtenido después de separar las dos fracciones anteriores, se trata con TCA al 10 %. Los datos se muestran en la tabla XV.

Las tres fracciones obtenidas muestran una reproductibilidad buena, pues los coeficientes de variabilidad se encuentran dentro de límites muy estrechos (1,50-1,70).

TABLA XV

REPRODUCTIBILIDAD DE LA FRACCION PRECIPITADA CON ACIDO TRICLORO-
ACEPTICO AL 10 %. VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO.
ABSORCION 500 nm

Media	0,331
E_M	0,001
Des. St.	0,005
Límites 5 %	0,319-0,342
C. V. %	1,64

Las proteínas cloroplásticas se subdividen en solubles e insolubles. Para concretar la reproductibilidad de esta fracción se tomaron diez volúmenes iguales de una suspensión de cloroplastos y obtenidos los botones correspondientes, se trataron con disolución hipotónica, desarrollándose la reacción de Folin. La tabla XVI recoge los resultados obtenidos.

TABLA XVI

REPRODUCTIBILIDAD DE LA FRACCION CLOROPLASTICA SOLUBLE.
VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO. ABSORCION 500 nm

Media	0,270
E_M	0,002
Des. St.	0,006
Límites 5 %	0,257-0,283
C. V. %	2,24

Los fragmentos cloroplásticos separados en la experiencia anterior, se trataron con DSS al 0,5 % para solubilizar las proteínas laminares. Los datos se detallan en la tabla XVII.

TABLA XVII

REPRODUCTIBILIDAD DE LA FRACCION CLOROPLASTICA INSOLUBLE.
VALORES DE DIEZ MUESTRAS POR TRIPLICADO. ABSORCION 500 nm

Media	0,219
E_M	0,002
Des. St.	0,006
Límites 5 %	0,206-0,232
C. V. %	2,83

Aunque en este caso los coeficientes de variabilidad son superiores (2,24 y 2,83) a los obtenidos en el fraccionamiento de las proteínas citoplásmicas, se mantienen dentro de valores correctos.



BIBLIOGRAFIA

1. BAUDET, J., y MOSSE, J., «The extraction of proteins from flower with water», *Compt. Rend.*, 525, 2843 (1962).
2. BAULT, A., «Evolution des proteins solubles acides de la radicules du pois pendant les premiers jours de su croissance», *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 276, 741 (1973).
3. BETSCHART, A., y KINSELLA, J. E., «Extractability and solubility of leaf proteins», *J. Agr. Food Chem.*, 21, 60 (1973).
4. BORDIER, CL., «Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution», *J. Biol. Chem.*, 256, 1604 (1981).
5. BRAY, W. J., y HUMPHRIES, C., «Solvent fractionation of leaf juice to prepare green and wihe protein products», *J. Sci. Food Agric.*, 29, 839 (1978).
6. BYERS, M., *The aminoacid composition of some leaf protein preparation. Leaf Protein*, pág. 95. Pirie, N. W., ed. Blacwell scientific publications Oxford and Edinburgh (1971).
7. DAS, G. A., y HALES, B. J., «Action of detergents and electrophoresis on spinach chloroplasts under high alkaline conditions», *Photochem. Photobiol.*, 26, 421 (1977).
8. DAWSON, R., «Comparison of fractionation of groundnut proteins by two different methods», *Biochem.*, 41, 305 (1971).
9. DOBY, G., «Nitrogenous compounds of plants», *Plant biochem.*, 10, 393. Inters. Publish (1965).
10. EVANS, R. J., y KERR, M. H., «Extraction and precipitation of nitrogenous constituents of dry navy beans (*Phaseolus vulgaris*)», *J. Agr. Food. Chem.*, 11, 26 (1963).
11. FESTENSTEIN, G. N., «Extraction of proteins from green leaves», *J. Sci. Food. Agr.*, 12, 305 (1961).
12. GRIFFITHG, D. E., y LOZANO, J. A., «Síntesis de proteínas por cloroplastos in vitro. Factores relacionados con el estado de los cloroplastos», *Revista española de Fisiología*, 26, 71 (1970).
13. HARRIS, E. H.; PRESTON, J. F., y EISENSTAOT, J. M., «Aminoacid incorporation and products of protein synthesis in isolated chloroplasts of *Euglena gracilis*», *Biochemistry*, 12, 1227 (1973).
14. HARRMANN, F., y MEISTER, A., «Separation and spectroscopical properties of pigment-protein complexes inautirrhinum chloroplasts», *Photosynthetica*, 6, 177 (1972).



15. HESS, H. H.; LEES, M. B., y DEW, J. E., «A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and dodecyl sulfate solubilized proteins», *Anal. Biochem.*, 85, 295 (1978).
16. KAWASHIMA, N., y WILDMAN, S. G., «Fraction I protein», *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 325 (1970).
17. KING, C. M., y KRIEK, E., «The differential reactivity of the oxidations products of o-Aminophenols towards protein and nucleic acid», *Biochim. Biophys. Acta*, 111, 147 (1975).
18. KLECAKOWSKA, D., «Physicochemical characteristic of leaf proteins», *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, 17, 143 (1969).
19. KRISHNA, C. R., «Comparative study of alkali and Swan's reagent in the extraction of proteins from plant materials», *Prox. Symp. Proteins*, 50 (1960).
20. LAGOUTTE, B., y DURANTON, J., «Physicochemical study of structural proteins of chloroplasts from Zea mays», *Biochim. Biophys. Acta*, 253, 232 (1971).
21. LOOMIS, W. D., y BATAILLE, J., «Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes», *Phytochemistry*, 5, 423 (1965).
22. LOTTI, G., «Lo zinco nel metabolismo vegetale», *Agrochimica*, XVII, 141 (1973).
23. NAUDA, CH.; KONDOS, A., y TERNOUTH, J., «Improved technique for plant proteins extraction», *J. Sci. Food. Agric.*, 26, 1917 (1975).
24. PIRIE, N. W., *Drying, preservatin, solvent extraction and separation into «chloroplast» and «cytoplasmic» fractions. Leaf protein*, pág. 86. Pirie, N. W., ed., Blackwell Sci. Publications. Oxford and Edinburgh (1971).
25. PLICH, H., y MILLIKAN, D., «Soluble protein content and oxidative enzyme activity of the apple as influence by extraction media tissue preservation procedures», *Fruit. Sci. Rep.*, 2, 1 (1975).
26. POTTY, V. H., «Determination of proteins in the presence of phenols and pectins», *Anal. Biochem.*, 29, 535 (1969).
27. PUSTAI, A., «Extraction of nitrogenous and phosphorus containing materials from the seeds of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*)», *Biochem. J.*, 94, 611 (1965).
28. REJ, R., y RICHARDS, A., «Interference by tris buffer in the estimation of protein by the Lowry procedure», *Anal. Biochem.*, 62, 240 (1974).
29. SARKAR, S. K., y HOWARTH, R. E., «Soluble proteins of alfalfa (*Medicago Sativa*) herbage. Fractionation by ammonium sulfate y gel», *J. Agric. Food. Chem.*, 23, 626 (1975).
30. SAYANOVA, V. V., «Comparative study of salt soluble proteins in the seeds of some species of bean by gradient extraction in column», *Rast. Belki*, 9, 5 (1970).
31. SIMARD, C., y BOOLET, M., «Fractionation of proteins from soybean, fababeam, and rapresed and alfalfa leaf using "fractionated dissolution"», *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.*, 11, 16 (1978).
32. SOLECKA, M.; ROSS, J. A., y MILLIKAN, D. F., «Evidence of substances interfering with the Lowry test for protein in plant leaf tissue», *Phytochemistry*, 7, 1293 (1968).
33. STAHMNN, M. A., «Plant proteins», *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 14, 137 (1963).
34. SUBBA RAU, B. H.; MAHADEVIAH, S., y SINGH, N., «Nutritional studies on whole extract coagulated leaf protein and fractionated from Lucerne (*Medicago Sativa*)», *J. Sci. Food. Agr.*, 20, 355 (1969).
35. TAN, K. K., «Assay of proteins by Lowry's method in samples containing 2 mercaptoethanol», *Anal. Biochem.*, 86, 327 (1978).
36. WILDMAN, S. G., *The organization of grana containing chloroplasts in relation to location of some enzymatic systems concerned with photosynthesis, protein synthesis and ribonucleic acid synthesis. Biochemistry of chloroplasts*, vol. 11, pág. 295. Goodwin, T. W., ed., Academic Press, London and New York (1967).
37. WRIGLEY, C. S., y WEBSTER, H. L., «The effects of stem rust infection on the soluble proteins of wheat leaves», *Aust. J. Biol. Sci.*, 19, 895 (1966).

