

# ESTUDIO DE LOS AMINOACIDOS LIBRES Y DE LAS PROTEINAS DE ALGUNAS ALGAS MARINAS

WANDA QUILHOT P. \*

## INTRODUCCION

Continuando con los trabajos realizados en 1962 (Silva, Etcheverry y Quilhot), y en 1965 (Quilhot y Etcheverry), sobre los aminoácidos de algunas algas marinas de importancia económica en Chile, se realizó la cuantificación de los aminoácidos libres y de las proteínas de las algas verdes: *Ulva lactuca* L. y *Ulva linza* L., de las algas pardas: *Durvillaea antarctica* (Cham.) Hariot y *Lessonia nigrescens* Bory, y del alga roja *Porphyra columbina* Mont. En todas las especies sólo se utilizó la fronda para los análisis.

Las algas fueron recolectadas en Marzo de 1967, en Caleta Montemar, Provincia de Valparaíso.

## METODOS

Las algas se lavaron con abundante agua de la llave y, luego, con agua destilada. Se secaron a 30°C y se molieron. Antes de comenzar el análisis, fueron maceradas en un mortero Danguomeau hasta la obtención de un polvo fino.

### ANALISIS DE LOS AMINOACIDOS

#### 1) Extracción de los aminoácidos libres

La extracción se realizó sobre 10 mg. de cada muestra, puesta en suspensión en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (Guitton, 1964) y dejadas en agitación durante 12 horas a 2°C. Después de centrifugación y lavado con TCA al 2,5%, el sobrenadante se neutralizó con NH<sub>4</sub> OH. Los aminoácidos se eluyeron con amoníaco al 20%, en columna Dowex 50 W-X4. Después de evaporación total, el residuo se extrajo con agua y se llevó a un volumen dado.

Para la extracción del triptofano se utilizó etanol al 70%, en frío y con agitación durante 12 horas. Luego de la evaporación del sobrenadante, el residuo se disolvió en un volumen dado de agua destilada.

#### 2) Extracción de los aminoácidos de las proteínas

El residuo, después de la extracción con TCA, se hidrolizó en presencia de HCL 6 N, 24 horas, a 100°C. Después de la eliminación del exceso de HCL, los hidrolizados fueron eluidos con NH<sub>4</sub>OH, siguiendo el mismo proceso utilizado para los aminoácidos libres.

\* Departamento de Biología, Universidad de Chile - Valparaíso.

Para el triptofano se hizo hidrólisis con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  al 14%, 24 hrs. a  $100^\circ\text{C}$ . Después de neutralización con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N y centrifugación, se concentró el sobrenadante y el residuo seco se llevó a un volumen dado.

### 3) Dosificación de los aminoácidos

La dosificación se realizó según el método de Spackman et al. (1958) and Moore et al. (1958) con la ayuda de un analizador automático Beckmann, modelo 120 B.

El triptofano fue dosificado por colorimetría, según la reacción de Sullivan y Hess (1944).

## RESULTADOS

Los resultados de los análisis se agrupan en las Tablas I y II. La naturaleza de cada aminoácido fue determinada por su posición en los cromatogramas.

En las algas analizadas están presentes los aminoácidos corrientes en las proteínas, con excepción de:

La cisteína, más o menos destruida en los hidrolizados, aparece sólo al estado de trazas, salvo para *U. lactuca* y *U. linza*.

La citrulina sólo se encontró en *P. columbina*; ya había sido señalada para las algas rojas por Lewis (1962) y Citharel (1966).

La homoserina no había sido encontrada antes en algas. Fue identificada por su posición en los cromatogramas, su presencia fue confirmada por cromatografía en papel (Levy y Chung, 1953). En todos los extractos con TCA aparece en formas de trazas; en los hidrolizados de *L. nigrescens* y *D. antarctica*, fue encontrada en cantidad no despreciable, su presencia aquí podría deberse a una mala extracción con el TCA.

El aminoácido no identificado se presenta en todos los hidrolizados; también está presente en el extracto con TCA de *Lessonia nigrescens*. Sobre la columna de amberlita, reservada al análisis de los aminoácidos básicos, este cuerpo es eluido antes que la lisina, es decir, al comienzo del análisis. En los cromatogramas, su cantidad fue calculada de una manera arbitraria, utilizando para su determinación la constante de la glicina. Se hicieron diferentes análisis para precisar su naturaleza, pero ello no fue posible; además, las pequeñas cantidades obtenidas después de la purificación de los extractos, no permitieron efectuar reacciones colorimétricas específicas.

## CONCLUSIONES

La concentración en nitrógeno es débil en comparación al de la *Chlorella*: 1 a 2% para las algas analizadas, contra 8 a 10% para la *Chlorella*. Lo mismo ocurre con respecto a los alimentos de origen animal citados en la Tabla III: alrededor de un 13% para el huevo, 15% para la carne de harenque, 14,5% para el músculo de buey. Por el contrario, el porcentaje de nitrógeno de estas algas se acerca al de los alimentos de origen vegetal citados: 2,4% para la lechuga, 3,8% para la espinaca, y 1% para la papa. Difícilmente se puede considerar a estas algas como un alimento de base.

La débil concentración en nitrógeno protéico en relación con el peso seco, no hace de estas algas una buena fuente de aminoácidos esenciales. Sin embargo, se puede sugerir la utilización de estas algas como complemento de régimen, en particular en la alimentación de ganado; por ejemplo *L. nigrescens*, relativamente rica en lisina, podría completar eficazmente los alimentos para el ganado a base de torta de maravilla, ricas en aminoácidos azufrados y pobres en lisina.

### RESUMEN

La distribución y cuantificación de los aminoácidos libres y de las proteínas de las algas *Ulva lactuca* L., *Ulva linza* L., *Porphyra columbina* Mont., *Lessonia nigrescens* Bory y *Durvillaea antarctica* (Cham) Hariot, fue determinada por el método de Spackman et al. (1959) y Moore et al. (1958).

Los resultados obtenidos muestran:

a) La composición en aminoácidos libres y de las proteínas no difieren notablemente en las distintas especies.

b) La débil concentración en que estos aminoácidos se presentan (3.8 a 12% peso seco) no permiten que estas algas sean consideradas como alimento de base.

c) Se confirma la existencia de un aminoácido no identificado en los hidrolizados de todas las especies y en el extracto en TCA de *L. nigrescens*.

d) La presencia de la homoserina en los extractos en TCA de todas las especies analizadas y en los hidrolizados de *L. nigrescens* y *D. antarctica*, aminoácido que no había sido encontrado antes en algas.

### SUMMARY

The distribution and quantification of the free aminoacids and the proteins of the algae: *Ulva lactuca* L., *Ulva linza* L., *Durvillaea antarctica* (Cham.) Hariot, was determined by the method of Spackman et al. (1959) and Moore et al. (1958).

The results obtained show that:

a) The composition in free aminoacids and of the proteins do not differ notably in the different species.

b) The weak concentration in which these aminoacids present themselves (3.6 to 12% dry weight) do not permit these algae to be considered as a basic nourishment.

c) The existence of an unidentified aminoacid is confirmed in the hidrolized ones of all the species and in the extract in TCA of *L. nigrescens*.

d) The presence of homoserine in the extracts in TCA of all the species analyzed and the hidrolized ones of *L. nigrescens* and *D. antarctica*, aminoacid that had not been found before in algae.

**AGRADECIMIENTOS:** El autor agradece la ayuda prestada por los señores A. Moyses y B. Lejeune y la señora J. Metivaux, del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de París, Francia, donde se realizó este trabajo. También al Sr. Héctor Etcheverry D., de la Estación de Biología Marina de la Universidad de Chile, Valparaíso.

### REFERENCIAS

- CITHAREL, J., 1966. Recherches sur les constituants azotés des Algues marines. Les acides aminés libres. C. R. Acad. Sc. Paris, 262, Serie D: 1495-1498.
- GUITTON, 1964. Metabolisme de Arginine dans les premiers stades du développement de *Pinus pinea* L. *Physiol. Véget.*, 2: 95-156.
- HARVEY, D., 1958. Tables of the Amino Acids and Feedingstuffs, Technical Communication N. 19. Scotland.
- LEVY, A. L. and D. CHUNG, 1953. Two-dimensional chromatography of Amino Acids on buffered papers. *An. Chem.*, 25: 396-399.
- LEWIS, E. J., 1962. Studies on the proteins, peptides and free amino acid contents in some species of Marine Algae from Southeastern coast of India. *Rev. Alolog.*, 6: 3: 15-25.
- MOORE, S., D. H. SPACKMAN and W. H. STEIN, 1958. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of Amino Acids and related compounds. *An. Chem.*, 30: 1185-1190.
- SILVA, F., H. ETCHEVERRY y W. QUILHOT, 1965. Determinación cromatográfica de aminoácidos en Algas Marina. *Botán. Marina*, 8, fasc. 2-4: 244-251.
- SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN and S. MOORE, 1958. Automatic recording apparatus for use in the Chromatography of Amino Acids. *An. Chem.*, 30: 1190-1210.
- SULLIVAN, M. X. and W. C. HESS, 1944. A study of the various procedures for the estimation of tryptophane. *J. Biol. Chem.* 155: 441-446.

TABLA I. Composición en aminoácidos libres (micro moles | 100 mg. peso seco).

Aminoácidos	U. lactuca	U. linza	P. columbina	L. nigrescens	D. antartica
Ac. aspártico	1,65	1,44	0,32	2,42	0,01
Ac. cistéico	0,05	0,06	0,11	0,09	0,23
Ac. glutámico	0,69	1,06	0,47	1,53	0,04
Alanina	0,54	0,73	0,50	2,82	6,15
Beta-alanina	0,04	0,03	0,04	0,04	0,02
Arginina	0,02	tr	—	tr	tr
Cisteína	—	—	—	—	—
Citrulina	tr	—	0,30	—	—
Fenilalanina	0,06	0,07	0,01	0,02	—
Glicina	0,54	0,61	0,25	0,17	0,02
Histidina	0,06	0,03	—	0,03	tr
Homoserina	—	—	—	—	—
Isoleucina	0,12	0,10	0,03	0,03	0,01
Leucina	0,12	0,17	—	0,03	0,01
Lisina	0,48	0,49	tr	0,10	0,05
Metionina					
Met. SO <sub>2</sub> Met.	tr	0,03	0,07	0,09	0,01
Prolina	0,35	0,86	—	0,12	—
Serina	0,26	0,28	0,10	0,40	0,08
Tirosina	0,03	0,04	0,01	0,04	—
Treonina	0,13	0,12	0,16	0,30	0,12
Triptofano	tr	tr	tr	tr	tr
Valina	0,15	0,17	0,04	0,07	0,09
Amidas	5,32	3,27	0,09	0,84	0,11
AA no identificados	—	—	—	—	—
Total Micro Moles aminoácidos libres	10,61	9,56	2,50	9,14	6,95

TABLA II. Composición en aminoácidos de las proteínas (micro moles | 100 mg. peso sec)

Aminoácidos	U. lactuca	U. linza	P. columbina	L. nigrescens	D. antarctica
Ac. aspártico	10,40	9,14	1,14	4,60	3,40
Ac. cistéico	0,08	tr	0,02	0,11	tr
Ac. glutámico	10,40	6,56	2,92	6,65	3,21
Alanina	12,12	11,30	6,43	6,53	2,67
Arginina	2,05	2,39	1,93	0,62	0,74
Cisteína	0,08	0,05	tr	tr	tr
Glicina	10,10	10,30	5,83	6,72	2,90
Fenilalanina	4,49	3,64	1,52	2,74	1,00
Histidina	1,46	0,94	0,57	0,92	0,46
Homoserina	—	—	—	0,10	0,18
Isoleucina	4,49	4,64	1,71	3,22	1,23
Leucina	8,50	7,20	3,62	4,82	2,02
Lisina	4,98	3,55	3,68	5,52	1,51
Metionina					
Met. SO <sub>2</sub>	0,20	1,17	0,40	1,06	0,02
Met. SO <sub>2</sub>					
Prolina	4,88	4,64	2,85	3,29	1,31
Serina	6,35	5,71	2,46	3,47	2,00
Tirosina	2,54	2,20	0,70	1,43	0,48
Treonina	5,56	5,71	2,98	4,17	1,72
Triptofano	0,04	0,22	0,57	tr	tr
Valina	7,13	7,10	3,93	5,35	1,86
AA no identificad	tr	tr	tr	0,01	0,02
<b>Total micro moles aminoácidos de las proteínas</b>	<b>95,85</b>	<b>86,46</b>	<b>43,26</b>	<b>61,33</b>	<b>26,73</b>

TABLA III. Composición en aminoácidos esenciales de las proteínas de las algas comparadas con la de otros productos alimenticios (m. de aminoácidos/100 mg. de proteína. (D. Harvey, 1958)

Amino-ácidos	Huevo	Pescado carne de arenque	Buey músculo	Lechuga	Espinaca	Papa	U. lactuca	U. linza	P. columbina	D. antarctica	L. nigrescens
Isoleucina	6,61	5,10	6,22	6,30	6,70	5,45	4,62	5,34	4,13	4,23	5,39
Leucina	9,01	9,59	7,82	6,21	7,01	5,78	8,64	8,30	8,61	6,92	8,58
Lisina	6,70	10,30	8,67	6,50	6,30	5,86	5,56	4,46	9,75	2,82	10,42
Metionina	3,30	2,02	2,58	0,60	1,20	1,71	0,23	1,61	1,27	0,10	2,17
Cistina	2,61	1,42	1,22	—	0,90	0,91	—	—	—	—	—
Fenilalanina	6,21	4,74	3,90	3,70	4,70	4,16	5,74	5,26	4,58	4,31	5,77
Tirosina	3,81	4,10	3,36	—	—	3,52	3,55	3,49	2,34	2,24	3,36
Treonina	5,60	3,34	4,37	4,61	4,61	3,81	5,17	5,96	6,78	5,70	6,75
Triptófano	1,20	1,41	1,49	0,61	1,04	1,63	0,06	0,39	2,10	—	—
Valina	6,61	6,00	5,12	4,80	5,20	4,40	6,52	7,32	8,43	5,93	8,06
Proteína mg./100 mg. de materia seca	80,00	90,00	84,00	15,00	24,00	6,96	12,08	11,63	5,51	3,82	7,87