

# Estudio sobre la Harina de Pescado

## IV. — APRECIACION CROMATOGRAFICA DE AMINO-ACIDOS \*

NORMA PÉREZ S. y ANA MARÍA GUNDLACH M.

Universidad de Chile. Centro Coordinador de Estudios para la Nutrición.

En nuestro laboratorio se han estudiado diversos métodos cromatográficos de alcances semi-cuantitativos y aplicables a amino-ácidos (1). Como dan una información orientadora útil, se estimó de interés estudiar en esta forma las harinas de pescado mientras se solucionaban limitaciones materiales que nos impedían emplear los químicos o microbiológicos.

### *a) PROCEDIMIENTO*

En una primera etapa se determinaron las mezclas de solventes que aseguraran la mejor separación, las condiciones de temperatura y tiempo, los tipos de reveladores, los valores Rf para los amino-ácidos puros en las diversas condiciones experimentales. Sobre esas bases se eligió cromatografía ascendente en papel Schleicher-Schüll 595, con mezclas de butanol-ácido acético-agua y piridina-agua, a temperatura ambiente y tiempo entre 14-20 horas, revelando con ninhidrina. El método se estudió con mezclas patrones de amino-ácidos antes de aplicarlo a la harina de pescado.

En los cromatogramas así obtenidos se empleó un sistema de apreciación semi-cuantitativa basado en la medición de la densidad óptica de la banda cromatográfica, empleando un densitómetro y leyendo milímetro a milímetro en la dirección del recorrido del solvente. Enseguida se construyeron curvas de distribución y, con planímetro, se midió el área total bajo la curva y las parciales bajo cada una de las "cimas", identificando los amino-ácidos o grupos de ellos por sus valores Rf.

\* Presentado a la Soc. Chilena de Nutrición y Bromatología en la sesión del 20 de septiembre de 1955.

Se considera que la superficie total de la curva corresponde a la cantidad total de proteína, o sea, representa su 100%. Las áreas parciales corresponden así a la proporción en que cada amino-ácido o grupo de ellos participa en el color total de la banda cromatográfica. Si bien dichos valores porcentuales no significan cantidades de contenido absoluto (que podrán determinarse posteriormente por análisis químico o microbiológico), ellos son, sin embargo, suficientes para orientar rápidamente sobre la presencia o ausencia de determinado amino-ácido y para indicar proporciones relativas que permiten comparaciones entre diversas proteínas. De aquí que el método pueda estimarse semi-cuantitativo.

Para su análisis las harinas de pescado se hidrolizaron previamente por la micro-técnica de Zahn (2) y se determinó su N por micro-Kjehdahl sobre materia seca desgrasada, pues los lípidos interfieren con el proceso de la cromatografía. Los hidrolizados se aplicaron en diversas diluciones sobre el papel. Si bien obtuvimos cromatogramas muy aceptables, la técnica deberá afinarse al ser aplicada a estos hidrolizados proteicos, pues en algunas regiones no se obtiene suficiente separación. En estos casos en que hubo la misma migración o superposición se ha preferido expresar un solo valor porcentual conjunto que tentar una discriminación entre los amino-ácidos no suficientemente segura.

Por cuanto el triptófano se destruye en la hidrólisis, se lo determinó microbiológicamente, usando el *Lactobacillus arabinosis*, cepa 17-5 (8014 ATCC) (3). También se apreció cuantitativamente la arginina por mediación de la urea obtenida por la acción de arginasa sobre el hidrolizado (4).

Con estas técnicas se estudiaron dos muestras de harina de pescado extranjeras y cuatro nacionales correspondientes a las fábricas A, C, E y F (5).

### b) RESULTADOS

En la Tabla N° 1 se presentan nuestros resultados en su expresión de porcentaje de "color" (densidad óptica) dentro del área total, junto con los valores para el N total del producto y su equivalente en prótidos. Por la diversidad intrínseca de las muestras no era del caso calcular valores promedios. Den-

tro del alcance de la separación obtenida se aprecia la presencia de los siguientes amino-ácidos o grupos de ellos: cistina, arginina-lisina-histidina, serina, glicina-ác. aspártico, treonina-ác. glutámico, alfa.alanina, tirosina, metionina-fenil.alanina-valina, leucina-isoleucina.

TABLA N° 1

PROPORCION PORCENTUAL REPRESENTADA POR AMINOACIDOS O GRUPOS DE ELLOS EN LA DENSIDAD OPTICA Y AREA TOTAL CROMATOGRAFICA \*

Amino-ácidos	Alemania	Sud-Africa	Fáb. A	Fáb. C	Fáb. E	Fáb. F
Cistina . . . . .	0,3	1,3	2,0	ind.	—	1,0
Arginina . . . . .				1,3		
Lisina . . . . .	10,0	8,4	10,6	1,7	28,7	8,7
Histidina . . . . .				4,4		
Serina . . . . .	9,4	8,6	9,1	8,4	—	8,1
Glicina						
Ac. aspártico . . . . .	8,8	13,6	10,0	10,5	8,3	9,6
Treonina						
Ac. glutámico . . . . .	8,4	13,5	—	13,0	9,4	6,7
Alfa. alanina . . . . .	9,3	6,7	9,2	9,3	6,0	8,7
Tirosina . . . . .	8,0	7,0	4,6	6,8	6,0	9,8
Metionina						
Fenil. alanina . . . . .	23,0	12,0	25,4	23,2	21,0	24,4
Valina						
Leucina						
Isoleucina . . . . .	22,1	16,8	21,0	16,1	17,4	21,3
<hr/>						
g. N/100 g. subs. seca desgrasada . . . . .	11,7	11,9	12,8	8,4	10,9	10,9
g. prót./100 g. subs. seca desgrasada . . . . .	73,0	74,6	76,0	52,4	68,0	68,4

\* Descripción y alcance de las cifras, en el texto.

TABLA N° 2  
 CONTENIDO DE TRIPTOFANO Y ARGININA EN HARINAS  
 DE PESCADO \*

(Cant. en g./100 g. proteínas)

	Alemania	Sud-Africa	Fáb. A	Fáb. C	Fáb. E	Fáb. F
dl-triptófano . . . . .	4,57	0,44	0,17	0,40	0,20	0,70
Arginina . . . . .	0,83	3,76	2,76	0,45	4,84	1,80

\* dl. Triptófano por método microbiológico; arginina, por químico.

Proporcionalmente no se observaron diferencias de significación entre los productos extranjeros y nacionales. La cistina contribuye poco mientras los dos últimos grupos dan, en conjunto, del orden del 40% de la densidad óptica total; los otros muestran magnitudes relativamente semejantes, con participación del 5% al 10%.

El contenido de triptófano y arginina, cuantitativamente determinados (Tabla N° 2), se mostraron muy fluctuantes; llama la atención los altos valores para el primero en la muestra alemana y para la segunda en la sud-africana. No podemos, en este momento, explicarnos estas diferencias ni las observadas en los productos nacionales.

### c) CONCLUSIONES

1.—Se informa sobre un método de interpretar resultados de cromatografía de amino-ácidos que permite apreciación semi-cuantitativa, dejando constancia de sus limitaciones, pero, al mismo tiempo, de su utilidad orientadora.

2.—Las muestras de harina de pescado nacionales dan cromatogramas muy semejantes a las extranjeras. En ellos se aprecian los siguientes grupos de amino-ácidos: cistina, arginina-lisina-histidina, serina, glicina-ác. aspártico, treonina-ác. glutámico, alfa.alanina, tirosina, metionina-fenil.alanina-valina, leucina-isoleucina.

3.—Los dos últimos grupos de amino-ácidos representan del orden del 40% de la banda cromatográfica total; la cistina

contribuye muy poco y el resto participa en proporciones del 5% al 10% cada uno.

4.—Se observan marcadas fluctuaciones en el contenido de triptófano y arginina, determinados cuantitativamente por métodos microbiológico y químico, respectivamente.

### SUMMARY

A semiquantitative method for the appreciation of several groups of amino acids has been used for the analysis of 6 samples of fish meals. In all samples the following groups were detected: cystine; arginine-lysine-histidine; serine; glycine-aspartic acid; threonine-glutamic acid; alanine; tyrosine; methionine-phenylalanine-valine; leucine-isoleucine.

The last two groups make up about 40% of the chromatographic bands, cystine very little, and the rest between 5% and 10% each.

There were marked differences in the content of the samples in tryptophane and arginine, which were analysed quantitatively by a microbiological and chemical method, respectively.

### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden mit einer papierchromatographischen Methode Gruppen von Aminosäuren in 6 Mustern von Fischmehl bestimmt und zwar die folgenden: Cystin; Arginin-Lysin-Histidin; Serin; Glycin-Asparginsäure; Threonin-Glutaminsäure; Alanin; Thyrosin; Methionin-Phenylalanin-Valin; Leucin-Isoleucin.

Die beiden letzten Gruppen machten etwa 40% der gesamten chromatographischen Streifenbreite aus, Cystin war sehr wenig nachweisbar und die Restgruppen zwischen 5 und 10% jede.

Wesentliche Unterschiede zwischen den Mustern wurden im Gehalt an Tryptophan und Arginin ermittelt, die mit einer mikrobiologischen bzw. chemischen Methode quantitativ bestimmt wurden.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Pérez S., Norma. — "Determinación semi-cuantitativa de aminoácidos por cromatografía en papel; su aplicación a muestras patrones e hidrolizados de harina de pescado". Tesis de Grado. Fac. de Quím. y Farm., Univ. de Chile; 1955.
- (2) Zanh, cit. en: Cramer, F.: "Papierchromatographie"; Vilag Chemie, G.M.B.H., Bigot, Alemania; 2te. Auflage, 1953.
- (3) Cabello, J., y Prajoux, V. — "Determinación enzimática de la arginasa". Soc. Chilena de Biología, sesión del 12 de julio de 1955.
- (4) sg. Difco Manual, Difco Labs.; Detroit, Mich., U.S.A.; 9ª Ed. p. 235, 1953.
- (5) García M., H., y cols. — "Estudios sobre harina de pescado: II. Análisis bromatológico". Esta misma Rev., pág. 17.