

Interacción de las lectinas del *Myrtus communis* con los componentes proteicos de la leche de vaca

por

A. ABEGER y M. ORTEGA

Laboratorio Técnicas Instrumentales. Universidad de Alcalá de Henares.
Madrid (Spain)

SUMMARY

The phytohemagglutinins from *Myrtus communis* L. seeds interact with proteic fractions of cow milk. Casein originates soluble compounds, while those formed with whey are insoluble.

Quenching of the fluorescence signal due to tryptophan and changes in the refraction index and quantitative protein measurements by the Biuret method suggest an interaction between lectins and whole casein.

The stoichiometry of the process can be deduced from these results, which also seem to indicate conformational changes in casein. Electrophoresis on cellulose acetate in 7 M urea is demonstrative of structural modifications.

Whey proteins are precipitated by the *Myrtus communis* L. extract; precipitation is followed by the Orange G method and by electrophoresis on cellulose acetate.

RESUMEN

Las fitolectinas de los extractos de semillas de *Myrtus communis* L., interactúan con los componentes proteicos de la leche de vaca con formación de productos solubles, en el caso de la caseína, e insolubles en los del lactosuero.

La interacción de la lectina con la caseína entera es seguida por la amortiguación de la señal de fluorescencia debida al triptofano, por variación del índice de refracción y por medidas cuantitativas de proteínas según el método de Biuret. De estos resultados puede obtenerse la estequiometría del proceso, indicativa, al parecer, de cambios en la conformación de la caseína.

La electroforesis sobre acetato de celulosa es demostrativa de las modificaciones estructurales que se producen.

Las proteínas del lactosuero son precipitadas en su totalidad por el extracto de mirto. Esta precipitación se sigue cuantitativamente por el método del naranja G y por electroforesis sobre acetato de celulosa.

INTRODUCCIÓN

La lectina contenida en los extractos de semillas de *Myrtus communis*, es una aglutinina no específica para los hematies humanos que han sido lavados previamente en solución salina (1).

La composición de esta lectina no se ha podido determinar, debi-

do a la dificultad de purificación de los extractos crudos; sin embargo, de los estudios llevados a cabo hasta ahora en torno a su purificación e identificación, parece que no se trata de una proteína como ocurriría con todas las lectinas identificadas hasta este momento.

Esta lectina interacciona con las proteínas y lipoproteínas del suero humano con formación de compuestos insolubles (2). Dichas interacciones comportan una cierta selectividad para las diferentes proteínas, lo que hace de ellas unos reactivos del máximo interés, no sólo desde el punto de vista analítico, sino también preparativo ya que, inmovilizadas sobre soportes adecuados, constituyen unos medios ideales para las nuevas técnicas de cromatografía de afinidad.

Se ha considerado de interés hacer aplicación de estos procesos al estudio del comportamiento de las proteínas usadas en la alimentación humana, concretamente las integrantes de la leche de vaca, comprobándose que existe una interacción con formación de productos solubles en el caso de la caseína entera y de productos insolubles en el caso de las proteínas del lactosuero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del extracto de mirto

El extracto se obtuvo de las semillas, previamente pulverizadas, que se suspenden en alcohol de 96°, en la proporción de 10 g por cada 100 ml de alcohol, durante 24 horas con agitación continua. El extracto alcohólico obtenido se evapora a sequedad y posteriormente se reconstruye con agua; el líquido obtenido se centrifuga para separar la capa lipídica y la solución acuosa se liofiliza para su conservación en un liofilizador Leybol-Heraus GT-2.

Preparación de las fracciones proteicas

La leche de vaca recién ordeñada se somete a una precipitación ácida siguiendo el método propuesto por Mckencie (3); se obtienen así dos fracciones: la caseína entera y el lactosuero ácido.

Interacción del extracto de mirto con la caseína entera

1 ml de solución de caseína en tampón de Mac Ilvane de pH = 6.5 se mezcla, en cantidades crecientes de 0,01 a 1 ml, con una solución de extracto de mirto al 1,5 por 100 en el mismo buffer, llevando todas las muestras a un volumen final de 2 ml. No se observa formación de precipitado en ningún caso.

El contenido proteico de estas mezclas fue determinado por los métodos de Biuret y naranja G (4), refractométrico y espectrofluorimétrico. Se efectuaron igualmente electroforesis sobre acetato de celulosa en tampón veronal-veronal sódico de pH = 8,6 en urea 7 M.

Interacción del extracto de mirto con las proteínas del lactosuero.

El lactosuero procedente de la precipitación ácida se redisuelve a 1/4 de su solución inicial, y se hace interaccionar de forma idéntica a la señalada para la caseína, a pH = 4,7, produciéndose en este caso precipitados, que son fácilmente separables por centrifugación. En los respectivos sobrenadantes se determina la cantidad de proteína residual, obteniéndose por diferencia el tanto por ciento de proteínas precipitadas.

Para obtener dicha concentración se empleó el método de naranja G, ya que el de Biuret no es utilizable para este tipo de proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacción del extracto de mirto con la caseína entera

La fracción compleja de caseína interacciona con la fitolectina de las semillas de mirto formándose productos de interacción no precipitables.

Al ser, por ahora, desconocida la naturaleza química de la fitolectina, no se dispone de una explicación cierta para la solubilidad manifiesta de su compuesto de interacción con la caseína.

Hay un hecho que tal vez pudiera estar, de alguna forma, relacionado con esta solubilidad. Las aglutininas del *Myrtus communis* se comportan como inespecíficas, es decir, que aglutinan a todos los tipos de hematíes de sangre humana, pero para que esta actividad aglutinante se ponga de manifiesto, se precisan hematíes lavados con solución salina. En un trabajo anterior (5), sin embargo, se comprobaba que los hematíes perdían en parte su capacidad para ser aglutinados, si los lavados se efectuaban con soluciones isotónicas conteniendo fosfatos.

Aquí también la caseína, al ser una fosfoproteína con un contenido en fósforo del 0,85 por 100, en virtud de los ésteres fosfóricos de la serina que posee, se haría no precipitable por el mismo mecanismo que los hematíes se hacen menos aglutinables. Pudiera estar ocurriendo que la presencia de estos grupos fosfatos estén saturando todos los posibles puntos de enlace de la aglutinina con moléculas diferentes de la proteína, impidiendo así la formación de agregados moleculares de alto peso molecular más insolubles.

La medida del contenido proteico de estas mezclas por los métodos descritos anteriormente nos lleva a resultados aparentemente distintos.

Por la técnica de Biuret, y por refractometría (figs. 1 y 2), observamos un fenómeno similar, consistente en un incremento aparente del contenido proteico, con un retorno posterior a los valores iniciales, a mayores concentraciones del extracto de mirto presente. Sin embargo, con la técnica del naranja G, la concentración calculada para la caseína es congruente con la realidad al no haber precipitación de la misma. Las diferencias ($\pm 5,5$ por 100).

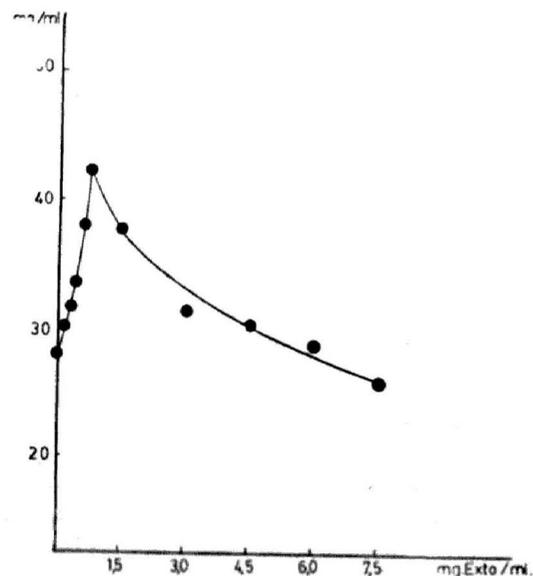


Fig. 1.—Variación del total proteico de la caseína en las mezclas. (Método de Biuret.)

El análisis espectrofluorimétrico nos muestra dos fenómenos distintos: una amortiguación de la señal de emisión fluorescente a 335 nm, a medida que aumenta el contenido de extracto en la mezcla (fig. 3), y una variación de la señal producida por la luz dispersada (aumento seguido de disminución a medida que se incrementa la concentración de extracto), a la longitud de onda de excitación de fluorescencia (285 nm).

Estimamos que todos estos datos, aparentemente tan dispares, no son más que el reflejo de un mismo fenómeno, el de la interacción

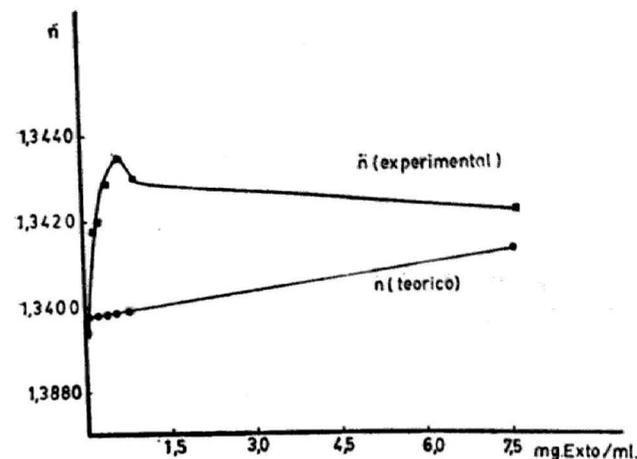


Fig. 2.—Índice de refracción a 30° C de las mezclas.

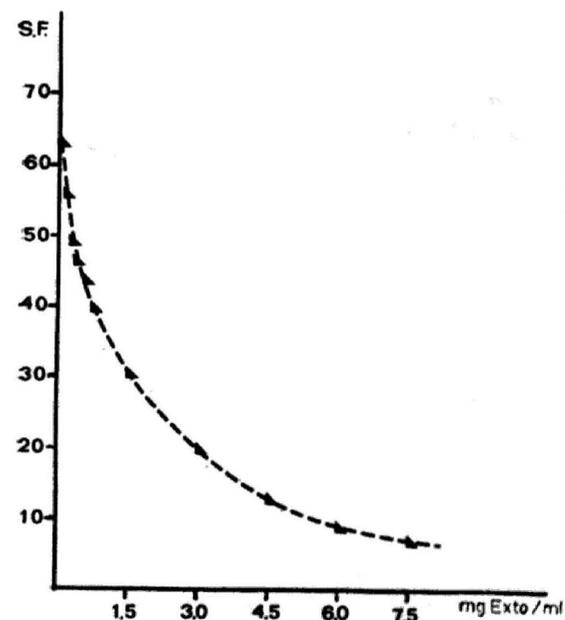


Fig. 3.—Variación de la señal de fluorescencia a 335 nm en las mezclas de caseína extracto de mirto.

fitohemaglutinina-caseína y que incluso nos podrían estar señalando el dato de la estequiometría del proceso. Esto lo vemos representado, aparentemente, en la figura 4 en tres series de medidas simultáneas para el Biuret, refractometría y medida de la luz dispersada, en la que el punto de inversión de los fenómenos corresponde a una relación de caseína/extracto de mirto de 4,2/1. Será necesario esperar a la obtención de la aglutinina purificada para llegar a conocer

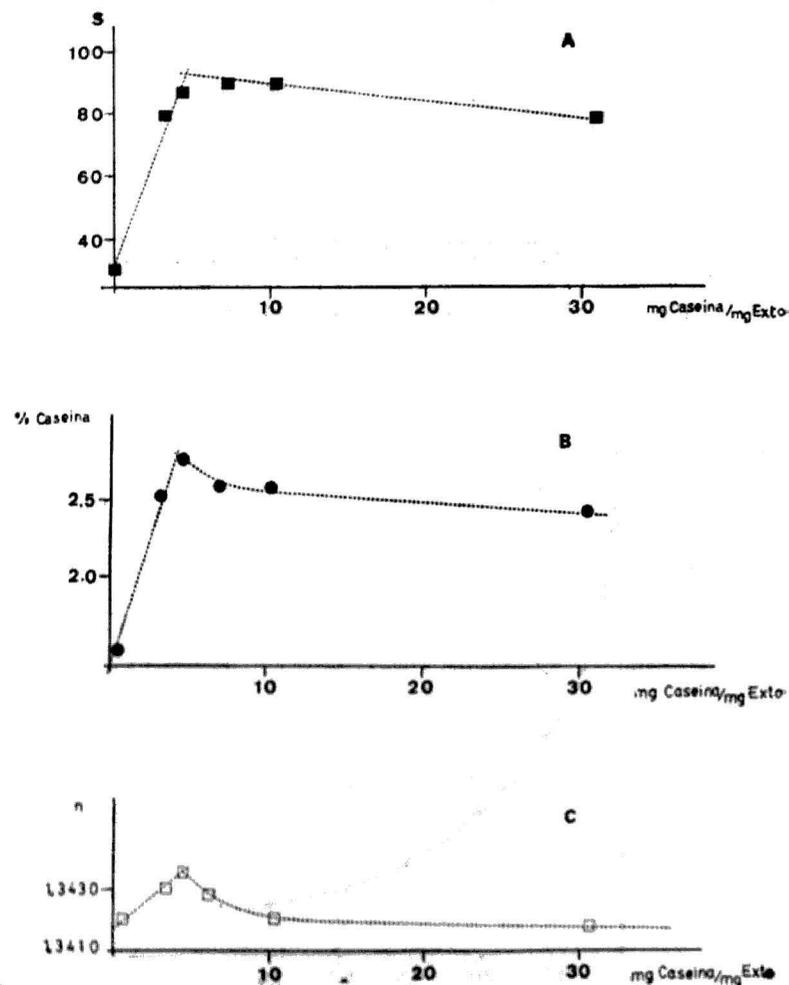


Fig. 4.—A. Representación gráfica de la luz dispersada a 90° en función de la relación caseína extracto de mirto. B. Idem del tanto por ciento proteico (método de Biuret) y C. Idem del índice de refracción.

con exactitud este valor, que en este momento no es más que indicativo, y para el extracto usado.

En la técnica de Biuret, se supone que el complejo coloreado formado, procede de la unión del ion Cu^{2+} con cuatro nitrógenos peptídicos. En nuestro caso, el aumento aparente de la concentración de caseína podría estar motivado por una mayor efectividad en la formación de estos complejos, al verificarse un cambio conformacional en la caseína, consecuencia del enlace de la aglutinina, fenómeno éste previsible para mayores concentraciones de la aglutinina. Este proceso no es exclusivo de la caseína, pues ya fue detectado con anterioridad para la albúmina humana (2).

Los datos de luz dispersada a 285 nm parecen consecuentes con la hipótesis anterior, ya que al no variar durante la experiencia la concentración de las moléculas dispersantes, en nuestro caso la caseína, las variaciones en la intensidad de la radiación dispersada a 90° podrían explicarse por cambios en la forma de dichas partículas.

La señal de fluorescencia de la caseína a 335 nm por excitación a 285 nm, se amortigua por la fitohemaglutinina en valores que llegan a descensos superiores al 90 por 100 de la señal inicial. Es evidente que ello es consecuencia de un efecto directo sobre el triptofano, demostrado por el comportamiento de soluciones de este aminoácido en presencia del extracto.

El comportamiento, sin embargo, de las diferentes proteínas hace que el fenómeno no parezca tan simple, y que en la amortiguación de la fluorescencia juegue también un papel importante el entorno de los residuos de triptofano en el conjunto de la molécula. Este fenómeno será estudiado en profundidad en trabajos posteriores.

Otro dato demostrativo del enlace caseína: fitohemaglutinina, nos lo proporciona la electroforesis sobre soporte de acetato de celulosa. Los resultados muestran claramente las modificaciones estructurales que se están produciendo, que vienen acompañadas de un aumento en la velocidad de emigración, con tendencia a uniformar las de las diferentes formas de caseína, y con formación de una sola banda de movilidad superior a la de la α_2 -caseína. Cabe pensar que este aumento en la carga neta de la molécula, puede proceder de la misma molécula de fitohemaglutinina enlazada, que sea portadora de cargas negativas, o a la posible disminución de las cargas positivas de la molécula.

Por otro lado parece ser que la intensidad de coloración de las bandas disminuye a medida que aumenta la cantidad de extracto de mirto añadido, lo cual dado que no existe pérdida del contenido proteico, estaría indicando que la cantidad de colorante fijado por las proteínas se va haciendo menor, ya que en todos los ensayos la cantidad de muestra aplicada fue aproximadamente la misma.

Interacción del extracto de mirto con el lactosuero

Con las proteínas del lactosuero el comportamiento es bien diferente, los productos de la interacción son insolubles con precipitaciones que pueden alcanzar al 100 por 100 de dichas proteínas, a una concentración adecuada de extracto.

Cuantitativamente puede seguirse el proceso por la determinación de las proteínas totales por el método del naranja G (fig. 5).

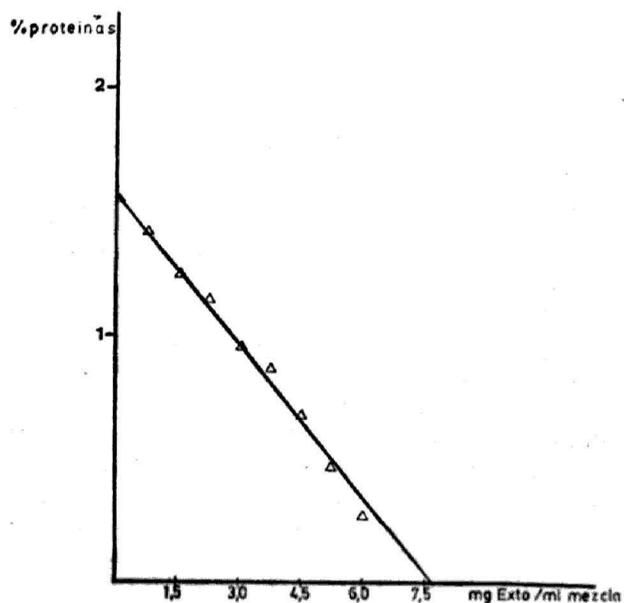


Fig. 5.—Variación del total proteico del lactosuero en los sobrenadantes de las mezclas lactosuero extracto de mirto. (Método del naranja G.)

La electroforesis sobre acetato de celulosa en tampón veronal-veronal sódico pH 8,6, es demostrativa de la progresiva precipitación de las proteínas del lactosuero.

El tanto por ciento calculado para cada una de las fracciones, partiendo de las densitometrías de los proteinogramas de los sobrenadantes (tabla 1), muestra esta precipitación, y si tuviésemos que hacer alguna distinción, podría indicarse que las que muestran mayor resistencia a la precipitación, al menos en las condiciones de pH aquí apuntadas 4,6, son la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina.

TABLA I

Evaluación cuantitativa por densitometría de la electroforesis de los sobrenadantes de las mezclas lactosuero extracto de mirto

mg exto. en ml mezcla	Proteínas totales %	Seroalbúmina %	β -lactoglobulina %	α -lactoalbúmina %	Inmunoglobulinas %
—	2,10	0,13	1,07	0,29	0,61
0,75	1,50	0,04	1,03	0,14	0,18
1,50	1,25	0,08	0,71	0,18	0,28
2,25	1,10	—	0,58	0,23	0,30
3,00	0,70	—	0,46	0,07	0,17
3,75	0,50	—	0,34	0,09	0,06
4,50	0,40	—	0,27	0,08	0,05
5,25	0,35	—	0,25	0,06	0,04
6,00	0,20	—	0,11	0,08	—
6,75	0,00	—	—	—	—

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ORTEGA, M. y DOLARA, A.: «Anales del Inst. Bot. A. J. Cavanilles», 237, 1966.
- (2) ORTEGA, M. y ABEGER, A.: «Ciencia & Industria Farmacéutica», 8, 103, 1976.
- (3) MCKENCIE, H. A.: «Milk Proteins», vol. II. Academic Press. New York, 1971.
- (4) VELILLA, P. y col.: «Anales de Bromatología», vol. XVI, 433, 1964.
- (5) ORTEGA, M. y MARTÍNEZ, J.: «Sangre», vol. XIV, 453, 1969.