



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Purificación de un inhibidor de proteasas de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.)

César Leobardo Aguirre Mancilla^{*1}, Dulce Zuleima Vázquez Marroquín²,
Glenda Margarita Gutiérrez Benicio¹, Juan Gabriel Ramírez Pimentel¹, Jorge
Covarrubias Prieto¹, Juan Carlos Raya Pérez¹

¹Instituto Tecnológico de Roque, ²Instituto Tecnológico de Tapachula

*Autor para correspondencia

Dr. César L. Aguirre Mancilla

ceaguirre@itroque.edu.mx



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Purificación de un inhibidor de proteasas de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.)

Resumen

Los inhibidores de proteasas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, son proteínas que forman complejos muy estables con enzimas proteolíticas. La mayoría de estos inhibidores son moléculas muy pequeñas con masas relativas de 5 a 25 kDa, su estructura es compacta y en muchos casos presentan gran cantidad de entrecruzamientos por puentes disulfuro, características que se cree determinan su alta estabilidad a la desnaturalización por calor y pH's extremos. El presente trabajo contribuye al aislamiento y purificación parcial de moléculas proteicas con actividad inhibitoria de tripsina provenientes de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.). La actividad inhibitoria de tripsina se localizó principalmente en la fracción proteica soluble en agua. El inhibidor se purificó mediante procedimientos de fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio y posteriormente por cromatografía de exclusión molecular. En el extracto acuoso se cuantificó con 2084 Unidades de Inhibición (UI) y al finalizar el proceso se obtuvo 3971 UI.

Abstract

Protease inhibitors are widely distributed in nature, are proteins that form very stable complexes with proteolytic enzymes. The majority of these inhibitors are



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

small molecules with relative masses of 5 to 25 kDa, the structure is compact and in many cases have a great amount of crosslinking disulfide, features believed to determine their high stability to heat denaturation and extreme pH values. This work contributes to the partial purification of protein molecules with trypsin inhibitory activity from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). Trypsin inhibitory activity was mainly located in the water soluble protein fraction. The inhibitor was purified using fractionation procedures with ammonium sulfate precipitation and subsequently by gel permeation chromatography. The aqueous extract was quantified with 2084 Inhibition Units (IU) and the end of the process was obtained 3971 IU.

Palabras clave: inhibidores de proteasas, chía, purificación de proteínas.

I. Introducción

México es poseedor de una vasta flora que por generaciones la ha utilizado como fuente alimenticia y por tradición, la han utilizado para uso medicinal. Esta tradición se remonta desde la época prehispánica y en la actualidad sigue utilizándose en gran medida como fuentes medicinales.

La chía (*Salvia hispanica* L.), forma parte de un grupo que se conoce genéricamente como chías, entre las que se encuentran: *Salvia columbariae*, *Salvia carduacea*, *Salvia polystachya* (chía, tepechía o chinetlacolo), *Salvia hispanica* de la que se produce la chía comercial, *Salvia tiliaefolia*, *Salvia seemannii* e *Hyptis suaveolens* (chiantzotzol). La chía fue una planta importante en la dieta alimenticia, de uso medicinal y ritual en la época prehispánica en México (Vergara, 1992; Rojas Rabiela, 1985). El Códice Mendocino, encargado por el virrey español de México, Antonio de Mendoza, hacia 1541, revela que en dos tercios de las ciudades dominadas por el imperio Azteca, la chía era parte obligatoria del tributo anual pagado al emperador



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Moctezuma II. El Códice Mendocino y la matrícula de tributos, indican que el amaranto, maíz, chía y frijol, se guardaban en trojes, en este caso representadas como estructuras de madera de forma cuadrangular; otra forma de almacenaje era en ollas de barro que probablemente se guardaban a su vez en trojes, se muestra en el Códice Florentino, cuyo texto náhuatl indica que lo mismo se hacía con chías y frijoles.

Desde el punto de vista nutricional, la chía tiene un alto contenido en Omega-3 (ácidos grasos esenciales), la chía tiene también otros componentes muy interesantes para la nutrición humana: antioxidantes, fibra, proteínas, vitaminas B1, B2, B3, y minerales tales como fósforo, calcio, potasio, magnesio, hierro, zinc y cobre.

La semilla de chía es considerada suplemento dietético por la FDA (Food and Drug Administration), y completa las exigentes regulaciones de contenido de nutrientes alimenticios establecidas por esta organización para ser considerado un alimento saludable. Otros compuestos que se han encontrado en la semilla de chía, son los inhibidores de proteasas, que en general se les ha encontrado también efectos nutraceuticos como es el caso de inhibidores de proteasas encontrados en frijol, a los que se les ha encontrado efectos contra cáncer.

En general los inhibidores de proteasas proteicos de origen vegetal son moléculas que merecen ser estudiadas pues se han acumulado evidencias que les han permitido su uso biotecnológico, tanto como agentes para controlar patógenos de cultivos, haciendo uso de la ingeniería genética. Sin embargo, poco o prácticamente nada se sabe a cerca de los inhibidores de proteasas de la semilla de chía. En otras especies, emparentadas con la chía, como lo es el caso de chan (*Hyptis suaveolens*), planta cuya semilla está considerada dentro del grupo de semillas que se le conocen genéricamente como chías, se ha encontrado un inhibidor de proteasas que hasta el momento ha sido el de mayor actividad contra las enzimas proteolíticas del insecto plaga de maíz



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

(*Prostephanus truncatus*), el cual es considerado una de las más destructivas plagas para este cultivo. De tal manera que resulta importante e interesante realizar estudios sobre los contenidos de inhibidores de proteasas en especies no estudiadas pues se tendría la posibilidad de encontrar inhibidores aún más interesantes para más usos biotecnológicos, o en su defecto ampliar la base de conocimientos sobre lo que ya se conoce de estas proteínas (Aguirre et al.,

II. Metodología

Las semillas de chía se trituraron en un molino Kika® M20S3, y la harina obtenida se desgrasó por adición de una mezcla de dos partes de cloroformo y una de metanol (2:1 v/v) en proporción con la harina de la semilla de 1:4 p/v en agitación magnética constante durante 45 min a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) al finalizar se filtró con papel filtro Whatman No. 1. El proceso se repitió dos veces más, para finalmente dejar secar la harina y eliminar el resto del solvente y almacenarla a 4°C para posterior uso.

El extracto acuoso de proteínas se obtuvo usando 0.1 g de harina desgrasada en 1 ml de agua destilada en tubos Eppendorf de 2 ml, para homogenizar la suspensión se agitó en el Vortex – Genie® 2 durante 10 minutos ininterrumpidos a temperatura ambiente (Aprox. 25°C), posteriormente se recuperó el sobrenadante mediante centrifugación a 13200 rpm durante 5 min y se almacenó a -20°C en un congelador de la Marca Goranje Pacific para su uso posterior.

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). La albúmina de suero bovino (BSA) fue usada como estándar.

La actividad inhibitoria de proteasas se determinó con la técnica de Enlanger y Cohen, (1961) se midió la absorbencia a 405 nm en un lector de



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

microplacas Perkin Elmer® Precisely. Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37°C midiendo la absorbencia en intervalos de 5 min.

Purificación del inhibidor

Precipitación secuencial con sulfato de amonio.

El extracto acuoso (15 ml) fue sometido a precipitación secuencial con sulfato de amonio (0% - 20, 20 – 40%, 40 – 60%, 60-80%) la sal se añadió poco a poco durante media hora en agitación magnética lenta (100 rpm) hasta que se disolvió por completo, se dejó equilibrar durante 30 min y posteriormente se centrifugo a 13500 rpm durante 10 min continuos a 25°C. El sobrenadante que se recuperó fue almacenado a -20 °C mientras que el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua destilada y agitado con el Vortex – Genie® 2 para posteriormente almacenarlo a -20°C y posterior proceso de diálisis.

De la muestras resultantes de la diálisis se tomaron 5 ml y se precipitaron con acetona en una relación (1:3); la pastilla resultante se resuspendió con 100 µl de agua destilada esterilizada (solución concentrada del inhibidor).

La solución concentrada del inhibidor, se adicionó a una columna de exclusión molecular equilibrada con Tris 50 mM, pH 8. Se eluyó usando un flujo de 0.18 ml/min, recogiendo fracciones de 0.5 ml.

III. Resultados

La purificación del inhibidor de semilla de chía, inició con la selección del porcentaje de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la precipitación de la proteína de interés. Se encontró actividad inhibitoria en ambas fracciones; precipitado y sobrenadante. Indicando la probable existencia de dos inhibidores en la semilla de chía debido a la diferencia del punto de solubilidad entre ellas (Figura 1), con base a este resultado se decidió realizar la precipitación con sulfato de



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

amonio al 80% de saturación para concentrar la mayor actividad inhibitoria de proteasas, posterior a esto se dializó contra agua hasta la eliminación de la sal.

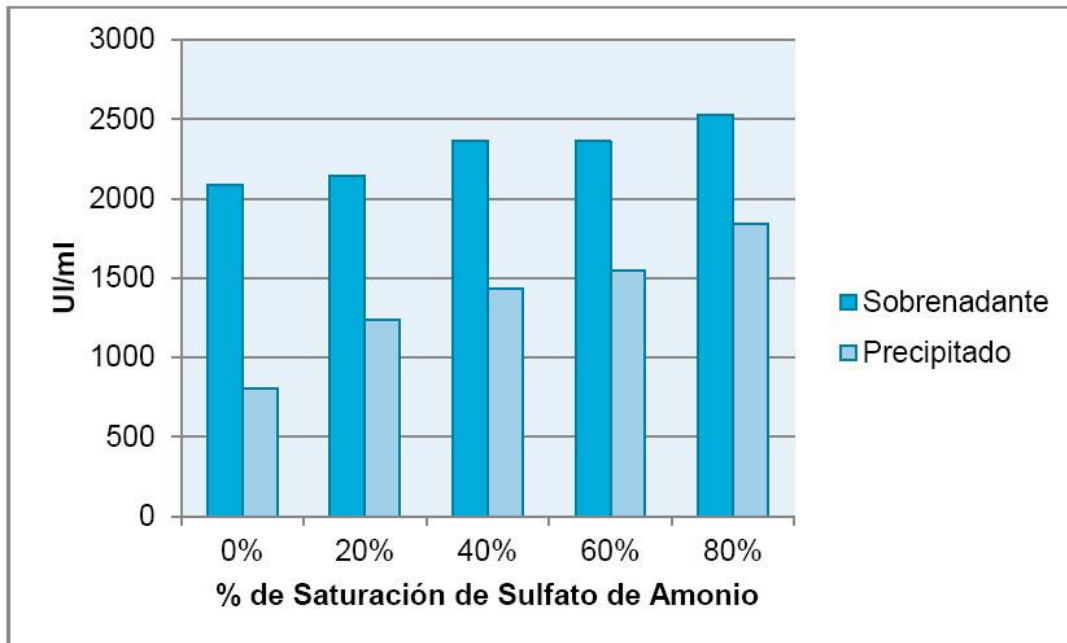


Figura 1. Precipitación secuencial y actividad inhibitoria de proteasas en sobrenadante y precipitado.

Las proteínas obtenidas del precipitado al 80% de saturación con sulfato de amonio la cual fue la que concentró la mayor cantidad de actividad inhibitoria, y posterior a la diálisis se sometieron a cromatografía de exclusión molecular, de la cual se obtuvieron 30 fracciones de 0.5 ml. En las fracciones 13 a 18 se obtuvo mayor actividad inhibitoria de proteasas (Figura 2). Las fracciones se colectaron y se concentraron.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

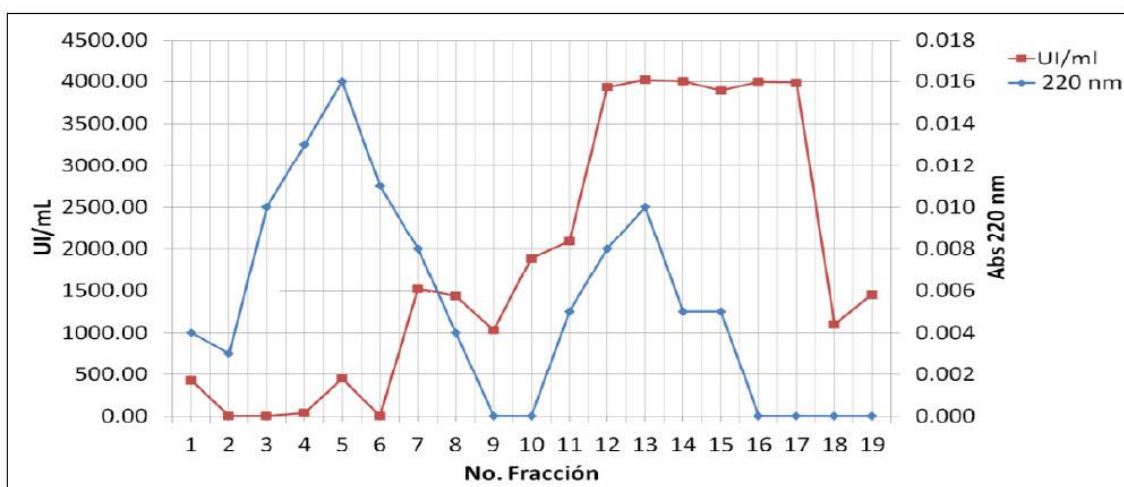


Figura 2. Cromatografía de exclusión molecular después de la diálisis. Las fracciones fueron monitoreadas por absorbancia 220 nm (línea azul) y la actividad inhibitoria de tripsina (línea marrón).

IV. Conclusiones

Los extractos obtenidos a partir de las semillas de Chía fueron analizados y separaron en sobrenadante y precipitado para cada etapa de purificación, debido a la aplicación de la centrifugación. Donde obtuvieron actividades inhibitorias de tripsina con el precipitado crudo y purificados parcialmente con precipitación secuencial de proteínas, diálisis y cromatografía de exclusión molecular, iguales a 804, 1840, 1833 y 3971 UI/ml respectivamente. Mientras que para el sobrenadante solo se realizó precipitación de proteínas debido a que después de la diálisis se perdió más del 90% de inhibición teniéndose inicialmente de 2084 a 2530 y disminuyendo finalmente 224 UI/ml por lo que no se aplicó la cromatografía de filtración en gel para la fracción de sobrenadante.

V. Bibliografía



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Cesar Aguirre, Silvia Valdes-Rodríguez, Guillermo Mendoza-Hernández, Arturo Rojo-Domínguez, Alejandro Blanco-Labra (2004). Anovel 8.7 kDa protease inhibitor from Chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichiade). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 138 (2004) 81–89

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-252.

Rojas-Rabiela, T. (1985). La tecnología agrícola mesoamericana en el siglo XVI, en: Rojas Rabiela T., W. T. Sanders (Edit). *Historia de la agricultura. Epoca prehispánica. Siglos XVI*. Coloc. Biblioteca del INAH. México.

Vergara-Santana M. I. y Bravo-Magaña F. (1992). *Memorias. III Reunión Nacional Selva Baja Caducifolia*, Universidad de Colima, México.