

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA EN SEMILLAS DE CHÍA (*SALVIA HISPÁNICA* L.)

Estrada Marmolejo Rut Judith ⁽¹⁾, Orona Tamayo Domancar ⁽²⁾, Valverde María Elena ⁽²⁾, Paredes López Octavio ⁽²⁾

¹ [Ingeniería en Industrias Alimentarias, ITESA]

² [Depto. Bioquímica y Biotecnología. CINVESTAV-Irapuato] | domancar@ira.cinvestav.mx; oparedes@ira.cinvestav.mx

Resumen

Chía (*Salvia hispánica* L.), es una planta anual perteneciente a la familia de las Lamiaceas. Su popularidad ha incrementado debido a componentes nutraceuticos como ácidos grasos poliinsaturados, compuestos fenólicos, péptidos bioactivos encriptados en proteínas de reserva. El objetivo del trabajo fue caracterizar las proteínas de reserva en líneas comerciales de semillas de chía (blanca y pinta Jalisco), digerirlas y evaluar los efectos nutraceuticos *in vitro* de los péptidos liberados, así como secuenciar los péptidos de la fracción mayoritaria. Las proteínas fueron extraídas en base a sus propiedades de solubilidad; globulinas fueron la fracción mayoritaria en ambas líneas, seguido de albúminas, glutelinas y prolaminas. El patrón electroforético mostró que globulinas presentó bandas de mayor intensidad. Péptidos liberados de proteínas fueron confrontados contra radicales DPPH y ABTS para medir su actividad antioxidante e inhibir la actividad contra la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que provoca hipertensión, encontrando que péptidos de harinas y glutelinas son los más efectivos contra ambos radicales y péptidos de globulinas mostraron una mayor inhibición contra esta enzima. La secuenciación de péptidos indicó que existen péptidos con funciones antioxidantes y antihipertensivas. El consumo continuo de esta semilla podría contribuir potencialmente a inhibir la oxidación celular y prevenir enfermedades cardiacas.

Abstract

Salvia hispanica L. commonly is known as chia, is an annual plant of Lamiaceae family. Nowadays, chia popularity has been increasing due to its several nutraceutical compounds such as polyunsaturated fatty acids, phenolic compounds and bioactive peptides encrypted in proteins. The aim of this study was to characterize the storage proteins from commercial chia lines (Blanca and Pinta Jalisco), proteins were digested and peptides released were subjected to evaluate their nutraceutic *in vitro* effects; and corroborate by peptide sequencing. Seed proteins were extracted based on their solubility properties and globulins were the main fraction in both lines, followed by albumin, glutelin and prolamin protein fractions. Electrophoretic patterns of globulins proteins showed the most intensity bands than the other protein fractions. Peptides released with different proteases from the storage proteins were confronted against DPPH and ABTS radicals and angiotensin converting enzyme (ACE) to evaluate their antioxidant inhibition activities. Peptides from flour and glutelins were the most effective against these radicals. And peptides from globulins showed the higher inhibition against this enzyme. Peptide sequentiation indicated different functions such as antihypertensive and antioxidant activities. The constant consumption of chia seeds could be potentially contributed to inhibit the cell oxidation and prevent cardiac diseases.

Palabras Clave

Fracciones proteicas; SDS-PAGE; actividad antioxidante; actividad antihipertensiva; enzima convertidora de angiotensina (ACE).

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son aquellos que además de satisfacer y proporcionar nutrientes necesarios para el organismo ayudan a prevenir o disminuir enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, cáncer, entre otras [1]. Existen diferentes semillas con propiedades nutraceuticas y en los últimos años la popularidad de algunos ha aumentado debido a que se han comenzado a conocer estas propiedades. La chía (*Salvia hispánica* L) es un pseudocereal de la familia de las Lamiaceas, ha sido cultivada desde hace siglos en México y Guatemala [2]; actualmente ha tenido un aumento en su consumo ya que tiene efectos positivos en la salud por la gran cantidad de compuestos nutraceuticos. Su composición proximal consta de aceite (30.4%) compuesto principalmente por ácido linolenico (63.8%) y linoleico (19%) [3]. Además, contiene una alta concentración de fibra dietética (34.4%) que ayuda a una buena salud intestinal [4], compuestos fenólicos que protegen contra la oxidación celular [5], proteínas de alto valor nutrimental (15-25%) y que contienen péptidos con funciones antihipertensivas y antioxidantes [5]. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las proteínas de reserva, obtener péptidos bioactivos y evaluar sus propiedades antioxidantes y antihipertensivas *in vitro* y secuenciar péptidos provenientes de la fracción principal en dos semillas comerciales de chía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Las semillas de chía fueron proporcionadas por agricultores locales de Irapuato, Gto. Las semillas se remojaron en agua destilada en una relación 1:10 (g:mL) durante 1h, posteriormente, las semillas se congelaron (-80°C) y liofilizaron. El mucílago fue separado mecánicamente sobre una malla metálica [6]. Las semillas libres de mucílago se molieron y la harina se desgraso con hexano (1:10 g: mL) a 60 ° C durante 2 h en una unidad de extracción Buchi E-816 SOX (Flawil,

Suiza); la harina se dejó durante la noche en una campana de extracción y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Extracción de las fracciones proteicas

La obtención de las fracciones proteicas de harina de chía se obtuvieron de acuerdo con la clasificación Osborne (1924) basado en el método reportado por Orón-Tamayo y col. [5]. La fracción de albúmina se extrajo con agua destilada (1:10 g: mL) y la suspensión se mezcló durante 1 h a 4°C, se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 10 min y se colectaron los sobrenadantes. El sedimento resultante se resuspendió en 0,05 mol/L Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mol/L de NaCl, la mezcla se agitó y se centrifugó como anteriormente, la proteína soluble es designada como la fracción de globulinas. Prolaminas se extrajeron con 70/100 ml de isopropanol y se procesaron como anteriormente. Finalmente, glutelinas se extrajeron con 0.1 mol/L de Na₂B₄O₇.H₂O (pH 10). Todas las fracciones se dializaron, liofilizaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para cuantificar la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford y una curva estándar de albúmina de suero de bovino.

Perfiles proteicos en SDS-PAGE de fracciones proteicas

La separación electroforética de las fracciones proteicas se realizó en un gel discontinuo (SDS-PAGE) al 14% a 120 V y 20 μ A. Los gels fueron teñidos con Flamingo 1x (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU.) utilizando el protocolo del fabricante.

Digestión *in vitro* de las fracciones de proteína

La digestión de proteínas se basó en el método de Wang y col. [7]. Se pesaron 50 mg de cada fracción y resuspendieron en 1.8 ml de NaCl 0.03 mol/L, las mezclas se ajustaron a pH 2.0, se incubó a 80 °C por 5 min. Posteriormente, se adicionó pepsina (EC 3.4.23.1; Sigma-Aldrich, Toluca, México) previamente disuelta en 0.03 mol/L de NaCl, pH 2.0. [1:40; g:g; (enzima/fracción

proteína o enzima/harina]] y las suspensiones se agitaron a 37°C durante 3 h. Pasado este tiempo, el pH se ajustó a 7.5 y una mezcla de tripsina (EC 3.4.21.4) y pancreatina (relación 1:1; g:g; Sigma-Aldrich, Toluca, México) se disolvió en 0.1 esq./L NaHCO₃ y se añadió a las muestras [1:40; g: g; (Enzima/fracción proteína o enzima /harina)], se agitó a 37°C por 3 h. Las digestiones se detuvieron con calentamiento a 100°C después de 10 min y se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 10 min. Los péptidos se recuperaron por centrifugación a 14,000 rpm a 4°C durante 10 min utilizando filtros de corte de peso molecular de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore). Los péptidos se almacenan a -80 C hasta su uso posterior.

Actividad antioxidante contra DPPH y ABTS

La actividad antioxidante contra el radical ABTS y DPPH fue basado en Orona-Tamayo y col. [5]. Diferentes concentraciones de peptidos (1, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/ml) fueron utilizadas. Las muestras de peptidos (50 µl) se mezclaron con 180 µl de solución 0.000180 mol/L del radical DPPH disueltos en metanol al 80%. Un control se llevó a cabo de la misma manera, pero en lugar de muestra se adiciono 50 µl de agua. La placa se incubo a 37°C por 30 min en oscuridad, entonces, la absorbancia se leyó a 517 nm; (una absorbancia inferior representa una actividad de captación de DPPH superior).

El ensayo antioxidante de péptidos contra ABTS se realizó de acuerdo al método descrito por Orona-Tamayo y col. [5]. La solución madre de ABTS se generó a través de una reacción de oxidación química con persulfato de amonio (PSA). La solución de ABTS (0.007 mol/L, 3 ml) y PSA (0.00245 mol/L, 15 ml) se disolvió en agua ultra pura, se mezcló y se dejó reposar en condiciones de oscuridad a 25°C durante 16 h antes de su uso. La concentración de la solución del radical ABTS (azul-verde) se ajustó con metanol (100%) a una absorbancia de 0.700 ± 0.02 y se midió a 734 nm, después se colocaron 50 µl de cada muestra y 180 µl de solución de ABTS en una placa de 96 pozos. Las mezclas se incubaron en condiciones de oscuridad durante 6 min a temperatura ambiente y la absorbancia y se midió a 734 nm.

Los resultados se calcularon como la concentración de péptidos eficaces requeridas para inhibir un 50% (CE₅₀) contra el radical DPPH o ABTS usando la siguiente ecuación:

Concentración de péptidos Efectiva (% de inhibición) = 100-100 (Absorbancia muestra / Absorbancia control)

Actividad inhibitoria contra la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

El efecto inhibitor de los péptidos de chíá contra la ECA y que produce aumento en los latidos del corazón, se evaluó de acuerdo al protocolo reportado por Orona-Tamayo y col., [5]. Las muestras se concentraron hasta alcanzar un volumen de 50 µl y se añadió 200 µl de 0.1 mol/L de solución mezclada de fosfato de potasio [pH 8.3; 0.3 mol/L de NaCl; 0.005 mol/L HHL (hipuril-histidil-leucina)], para iniciar la reacción, se adicionaron 50 µl de una solución de ECA y se incubo a 32°C por 30 min. La reacción se detuvo adicionando 200 µl de HCl 1 mol/L. El ácido hipúrico formado se extrajo con la adición de 1 ml de acetato de etilo este fue evaporado a 80°C durante 20 min, se adiciono 1 ml de agua ultra pura y se midió a 228 nm. La muestra blanco se preparó sin la adición de enzima y el control sin la adición de extractos. La inhibición de la ECA se calculó como la concentración de péptidos efectiva necesarios para una inhibición del 50% (CE₅₀) utilizando la siguiente ecuación:

Concentración eficaz de péptidos (% de inhibición) = [(Absorbancia Control - Absorbancia muestra) - (Absorbancia control - Absorbancia blanco)] x 100

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de las fracciones mostró mayor concentración en la fracción de globulinas (Tabla 1). Resultados similares fueron obtenidos por Sandoval-Oliveros y Paredes-López [1] así como también en Orona-Tamayo y col. [5].

Tabla 1. Concentración de fracciones proteicas en semillas de chíá.

Fracción	<i>S. hispánica</i> (g/100g semillas)
----------	---------------------------------------

	Blanca (CB)	Pinta Jalisco (PJ)
Albuminas	29.7 ± 2.4 ^a	31.6 ± 2.0 ^a
Globulinas	32.6 ± 2.2 ^a	34.6 ± 1.7 ^a
Prolaminas	11.2 ± 2.0 ^b	8.4 ± 1.4 ^b
Glutelinas	26.3 ± 3.0 ^a	25.8 ± 3.0 ^a

Las letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa ($P < 0.05$; ANOVA y Tukey test).

La electroforesis mostró que globulinas presentaron mayor intensidad en el perfil proteico y exhibió ocho bandas de mayor intensidad (15-60 KDa; Figura 1), seguido de los patrones electroforéticos de glutelinas, prolaminas y albuminas.

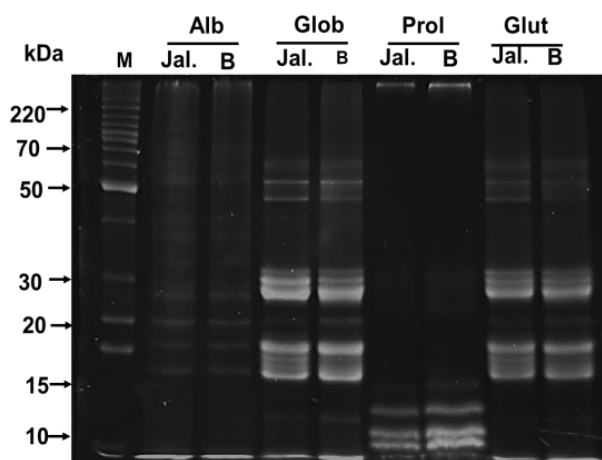


Figura 1. SDS-PAGE de fracciones proteicas de semilla de chí. Chí blanca (B) y Pinta Jalisco (Jal). M: Marcador de peso molecular; Alb: albúminas; Glob: globulinas; Prol: prolaminas; Glut: glutelinas. 25 µg de proteína por fracción.

Estos resultados son similares a los mostrados por Sandoval-Oliveros y Paredes-López [1] y los mostrados por Orona-Tamayo y col. [5].

La digestión de proteínas indica una alta concentración de péptidos liberados de albuminas y globulinas con respecto a las otras fracciones (Figura 2). Estos resultados indican una efectiva hidrólisis de las fracciones principales de semillas de chí. Resultados similares fueron encontrados en la concentración de péptidos liberados de globulinas de frijol Adzuki [8].

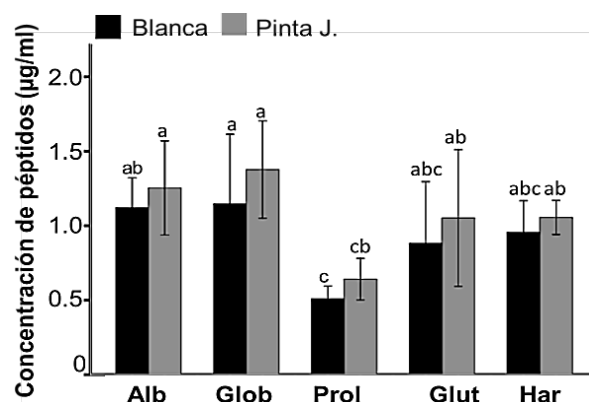


Figura 2. Cuantificación de péptidos proveniente de fracciones proteicas. Alb: Albúminas; Glob: Globulinas; Prol: Prolaminas; Glut: Glutelinas y Har: Harina. Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa ($P < 0.05$; ANOVA y Tukey test).

En cuanto a la acción antioxidante contra radicales ABTS y DPPH, los péptidos de ambas semillas mostraron diferentes actividades de inhibición contra radicales ABTS (Figura 3A). La actividad antioxidante de los péptidos de glutelinas fue superior al del resto de las fracciones con 40.84 µg/ml para CB y de 38.09 µg/ml para PJ ($P < 0.05$). A diferencia de los resultados mostrados por Orona-Tamayo y col. [5] en una línea diferente de chí, los péptidos de albuminas y globulinas son los que requieren menor concentración que el resto de las fracciones para inhibir el radical ABTS.

Péptidos de albúminas y harina fueron los que mostraron mayor capacidad antioxidante para inactivar el radical DPPH (Fig. 3B) con una CE_{50} que va de 23.3 µg/ml y 19.5 µg/ml para CB y 25.7 µg/ml y 20.2 µl/ml para PJ ($P < 0.05$). Albuminas de semillas de frijol Adzuki presentaron una capacidad antioxidante menor a la de chí ya que se necesitan de 890 µg/ml para inhibir al 50% radicales ABTS y de 790 µg/ml para inhibir DPPH [8], más altos que nuestros resultados. La actividad antioxidante contra los radicales ABTS y DPPH de los péptidos de chí podrían provenir de la extensa hidrólisis, resultando en la formación de péptidos cortos que podrían impedir su capacidad como donante de electrones [9], estos péptidos presentan altas cantidades de aminoácidos hidrófobos (Val, Pro, Gli, Tir, Met, y Leu), aminoácidos ácidos y sus amidas (Glu, Asp y Asn) presentes en las proteínas de chí, los cuales pueden interaccionar con grupos altamente reactivos del oxidante, y por lo tanto inhibiendo su efecto nocivo para las células [1].

Péptidos confrontados contra la acción antihipertensiva de la ECA, mostraron que los péptidos provenientes de globulinas de ambas líneas tuvieron la mejor inhibición contra la ECA (para CB 203.61 $\mu\text{g/ml}$ y para PJ 110.11 $\mu\text{g/ml}$), seguido de péptidos de albúminas, harina, glutelinas y prolaminas. Indicando que los péptidos provenientes de globulinas son los más efectivos para inhibir la actividad de la ECA. Se encontró que se requiere de una concentración más alta de péptidos de globulinas en frijol Adzuki para inhibir a la ECA [8] a diferencia de los péptidos de chíá, que con menos concentración pueden inhibir al 50% la actividad de ECA.

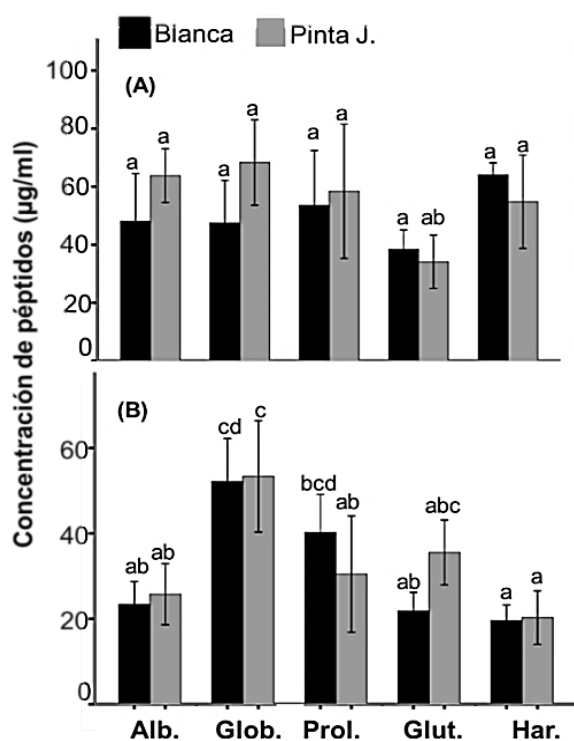


Figura 3. Actividad antioxidante de péptidos contra radicales ABTS y DPPH. Actividad antiradical de péptidos contra ABTS (A) y DPPH (B). Alb. Albúminas; Glob. Globulinas; Prol. Prolaminas; Har. Harina ($P < 0.05$; ANOVA y Tukey test).

CONCLUSIONES

La concentración de globulinas es superior en ambas líneas, seguido por albúminas, glutelinas y prolaminas. Mientras que la electroforesis mostró que globulinas de ambas líneas presentan mayor patrón de bandeo que las otras fracciones

proteicas. Péptidos provenientes de glutelinas en ambas líneas mostraron la mejor actividad antioxidante contra los radicales ABTS, mientras que los provenientes de albúminas y harina mostraron la mejor inhibición contra radicales DPPH. Los péptidos provenientes de globulinas de ambas líneas presentan mejor capacidad antihipertensiva seguido de péptidos de albúminas, harinas, glutelinas y prolaminas.

REFERENCIAS

- [1] Sandoval-Oliveros, M. R., y Paredes-Loipez, O. 2012. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). Journal of agricultural and food chemistry, 61:193-201.
- [2] Hentry, H. S., Mittleman, M., y McCrohan, P. R. 1990. Introducción de la Chíá y la goma de tragacanto en los Estados Unidos. Avances en Cosechas Nuevas. Prensa de la Madera, Portland, Ohio, 252-256.
- [3] Coates, W. 2011. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). Industrial Crops and Products, 34(2), 1366-1371.
- [4] Cahill, J. 2003. Ethnobotany of chia, (*Salvia hispanica* L.) Lamiaceae. Economic Botany, 57, 604-618.
- [5] Orón-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B., y Paredes-López, O. 2015. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. LWT-Food Science and Technology, 64(1), 236-242.
- [6] Muñoz, L.A., Cobos, A., Díaz, O., y Aguilera, J.M., 2012. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. J. Food Engineering, 108: 216-224.
- [7] Wang, W., Bringe, N. A., Berhow, M. A., y Gonzalez de Mejia, E. 2008. β -Conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells in vitro. Journal of agricultural and food chemistry, 56(11), 4012-4020.
- [8] Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A. y Świeca, M. 2013. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. Food chemistry, 141: 2177-2183.
- [9] Siow, H. L., y Gan, C. Y. 2013. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from Parkia speciosa seeds. Food chemistry, 141(4), 3435-3442.