



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS CM (CLOROFORMO-METANOL) DE CAPULÍN (*Prunus serotina*)”

Sandra Jiménez Camargo, J. Gabriel Ramírez Pimentel, Cesar L. Aguirre Mancilla, Jorge Covarrubias Prieto, Magdalena Mendoza Sánchez, Juan Carlos Raya Pérez*

Instituto Tecnológico de Roque, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km 8 Carretera Celaya– Juventino Rosas, C.P. 38110, Celaya, Gto.

***Autor para correspondencia**

RESUMEN

Algunos recursos son parcialmente aprovechados, tal es el caso de la semilla de capulín, rica en aceite y con un buen contenido de proteínas. De estas, las proteínas que se extraen con cloroformo-metanol (CM) han sido poco estudiadas, por lo que el objetivo de este trabajo fue extraer y caracterizar proteínas CM de la semilla de capulín. Se usó harina desgrasada con CM y a partir de allí se obtuvieron las proteínas que se trataron de purificar usando mediante la separación de fases usando tritón x114 y columna de interacción hidrofóbica. Las fracciones obtenidas se observaron en gel de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie, que mostró tres bandas abundantes a la altura del marcador de 66 kDa y un poco por debajo de este peso. Con tinción para glucoproteínas se reveló varias bandas a la altura de 66 kDa y un poco por debajo de este marcador, probablemente correspondiendo estas con las bandas abundantes vistas con azul de Coomassie. Se tiene una fracción enriquecida de proteínas CM.

Palabras clave: purificación, hidrofobicidad, glucoproteína, electroforesis.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

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

ISBN: 978-607-95635

ABSTRACT

Some resources are underused, as is the case blackcherry seed rich in oil and good protein content. Of these , proteins extracted with chloroform - methanol (CM) have been little studied , so the aim of this study was to extract and characterize proteins CM chokecherry seed . CM defatted flour was used and from thence proteins were treated using purified by phase separation using Triton x114 and hydrophobic interaction column were obtained. The fractions obtained were observed on polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue , which showed three bands abundant marker height of 66 kDa and a little below this weight . Staining for glycoproteins with various bands up to 66 kDa was revealed and a little below this marker, probably corresponding with these abundant bands seen with Coomassieblue. It has a protein-enriched CM fraction. .

Keywords: purification, hydrophobicity, glycoprotein , electrophoresis .

INTRODUCCION

En México el fruto de *Prunus serotina*, conocido popularmente como “capulín”, se consume con fines alimenticios principalmente en las zonas rurales, pertenece a la familia *Rosaceae*, e incluye alrededor de 400 especies de amplia distribución en las regiones de clima caliente y templado, principalmente en el hemisferio norte. Este género comprende árboles o arbustos perennifolios o caducifolios, a veces espinosos; el fruto, en forma de drupa y a veces carente de pulpa jugosa, posee hueso liso o rugoso, y por lo general contiene una sola semilla con endospermo.

Ha sido utilizado en la medicina tradicional mexicana, para el tratamiento de enfermedades tales como la diarrea y la tos. De igual manera estos frutos forman parte de la gastronomía nacional, consumiéndose en fresco, deshidratados y en mermelada.

En municipios de Puebla; Domingo Arenas, Calpan y San Nicolás de los Ranchos cuentan con las condiciones y el clima favorable para el cultivo de árboles de



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

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

ISBN: 978-607-95635

capulín; sin embargo, actualmente debido al poco, o escaso, manejo y conocimiento de las propiedades del capulín no le han dado el valor adecuado.

La semilla sin el endocarpio o hueso de capulín representa una fuente alternativa de proteína para el consumo humano, considerando la deficiencia de proteínas en el medio rural, el capulín podría suplirla al consumirse preparado en atole, tamales, bebidas o bien para el consumo en directo, tostado, la semilla contiene 10% a 25% de aceite (Avendaño, 2000). El análisis de la almendra presentó un elevado contenido de lípidos (la almendra de la ciudad de México 38%, y el de Uruapan 45%, el de la Meseta Tarasca 41.5%) y un contenido de proteína del 28% (Raya-Pérez *et al.*, 2012). Con la finalidad de incrementar la utilización de proteínas de origen vegetal, se deben conocer sus atributos, tales como capacidad de emulsificación, gelificación e hidratación.

Las albúminas son solubles en soluciones salinas diluidas y en agua, y precipitan en sulfato de amonio al 50%; de este grupo existen muchos ejemplos como la α -lactoalbúmina de la leche, la albúmina de la clara de huevo etc.; en general estas corresponden a la clasificación de proteínas simples;

Las globulinas son prácticamente insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas diluidas; en esta categoría están la miosina del tejido muscular, la β -lactoglobulina de la leche, además de muchas enzimas.

Las histonas se caracterizan por alto contenido de aminoácidos básicos y por ser solubles en ácidos y agua, tienen poca importancia en la tecnología de alimentos ya que son muy escasas. Las proteínas hidrófobas, por otra parte, son difíciles de extraer y estudiar, por lo que se hace necesario establecer metodologías para su estudio (Vertommen *et al.*, 2010).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

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

ISBN: 978-607-95635

MATERIALES Y METODOS Para la extracción y caracterización de las proteínas se utilizó la semilla de capulín *Pronus serotina*, se trabajó con muestra tostada y sin tostar.

Extracción de proteínas con Cloroformo-Metanol.

Se usó una solución Cloroformo- Metanol (C-M) 2:1 (v/v); se pesaron 5 gr de harina cruda de almendra de capulín y gregaron 20 ml. De la solución C-M, agitando durante 30 minutos. Se filtró la materia solida con una gasa y se dejó en reposo por 24 hrs. A fin de separar el aceite de la pastilla. Se almacenó en refrigeración.

Después de haber separado la pastilla del aceite se tomaron 20 micro litros de pastilla y se pusieron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, al que se agregaron 20 microlitros de Tris (Buffer Tris, 6.8 pH), 180 microlitros de agua destilada, 12 microlitros de Tritón X-114 y se dejó en reposo por 12 hrs. para obtener una separación de fases y por lo tanto proteínas hidrofobicas e hidrofílicas. Se separó por centrifugación el sobrenadante y en la pastilla se tuvo la presencia de proteínas hidrofílicas, o menos hidrofóbicas. En el sobrenadante, rico en detergente, se tiene presencia de proteínas hidrofóbicas.

Columna de Interacción hidrofobica

Se empacó una columna con resina (Lipophilic Sephadex). Se agregó acetonitrilo 100% hasta que la resina se hinchó un poco (duración aprox. 1 hr). Se eliminó el exceso de acetonitrilo y se cargó la muestra de proteína en la columna para separar sus componentes. Se realizó la elución con acetonitrilo, seguido de DMSO al 50% y al 100%. Luego, se hizo pasar Tris-Tween al 1%.

Las proteínas eluidas de la columna se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) usando el sistema de Shagger y von Jagow. Al término de la corrida los geles se fijaron por 30 min con metanol 50% y ácido acético al 10%. Se tiñeron por 12 horas con azul brillante (Coomassie) en ácido acético al 10%. Se



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

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

ISBN: 978-607-95635

destiñeron con ácido acético al 10% en agitación hasta quedar visibles las bandas de proteínas.

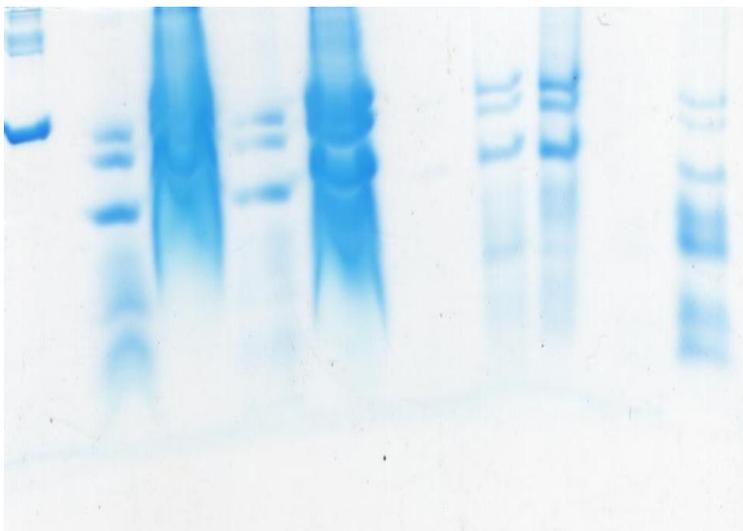
Glucoproteínas

las proteínas eluidas de las columnas se sometieron a PAGE. Al término de la corrida de electroforesis se utilizó el Kit PAS (SIGMA-ALDRICH®) para teñir glucoproteínas. Los geles se fijaron con formol-etanol por 1 hora, se lavaron con agua destilada por 1 minuto. Posteriormente se reposaron con ácido periódico por 5 minutos y se enjuagaron con agua por 6 minutos. Se incubaron con reactivo de Schiff por 15 minutos en oscuridad y se lavaron con agua por 5 minutos. Se tiñeron con Hematoxilina Gill No. 3 por medio minuto, se enjuagaron con agua por 30 segundos. y se destiñeron con Bisulfito de sodio disuelto en ácido clorhídrico hasta obtener bandas definidas de glucoproteínas.

RESULTADOS

Se observó que la metodología empleada fue adecuada para la recuperación de proteínas íntegras y la separación por cromatografía en columna permitió obtener fracciones con patrones electroforéticos distintos (Figura 1)

M 1 1 2 2 - 3 4 - 5



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

Figura 1. Electroforesis en Gel de poliacrilamida, contiene proteína obtenida de la columna de interacción hidrofóbica teñido con azul brillante. Carril M, marcador de peso molecular (66 kDa); carril 1 proteína eluída por la columna (lo que no se “pega” a la columna), carril 2, proteína eluída con Acetonitrilo al 100 %; carril 3, proteína eluida con DMSO 50%; carril 4 proteína eluida con DMSO al 100% y “carril 5” proteína eluida con Tris-Tween al 1%.

Muestra de proteína de harina tostada.

El patrón electroforético de las proteínas eluídas de la columna de interacción hidrofóbica fue semejante cuando se utilizaron los diferentes medios de elución, sin embargo, la eficiencia fue distinta, destacándose que cuando se utilizó acetonitrilo, se resolvieron mejor las bandas correspondientes a proteínas de menor peso molecular (Figura 2 y 3).

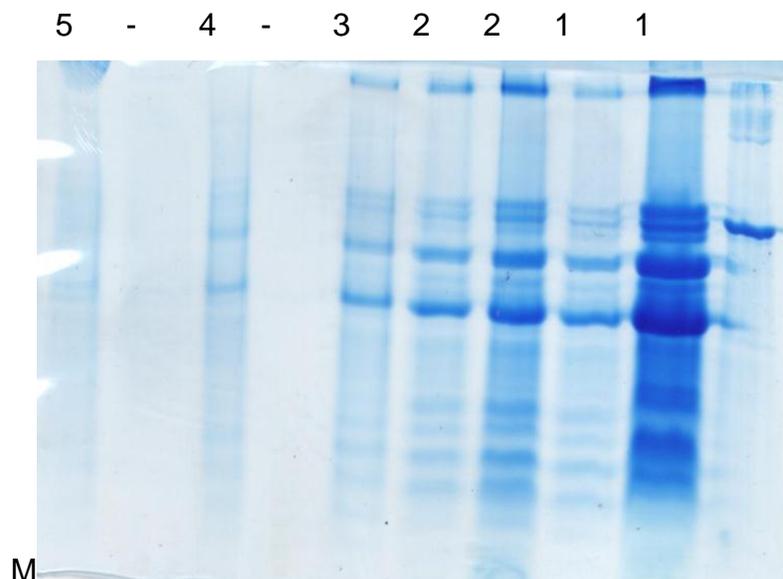


Figura 2. Gel de poliacrilamida, contiene proteína obtenida de la columna de interacción hidrofóbica teñida con azul brillante. Carril 5, proteína eluída con Tris-Tween al 1%; carril 4, proteína eluída con DMSO al 100%; carril 3, proteína eluída

“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

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

ISBN: 978-607-95635

con DMSO 50%; carril 2, proteína eluída con Acetonitrilo al 100 %; carril 1, proteína que no se “pega” la columna y carril M, marcador de albumina de bovino (66 Kda). Proteína extraída de la harina cruda. Se observan bandas de alto peso molecular (carril 1 y 2) que podrían resultar interesantes de estudiar.

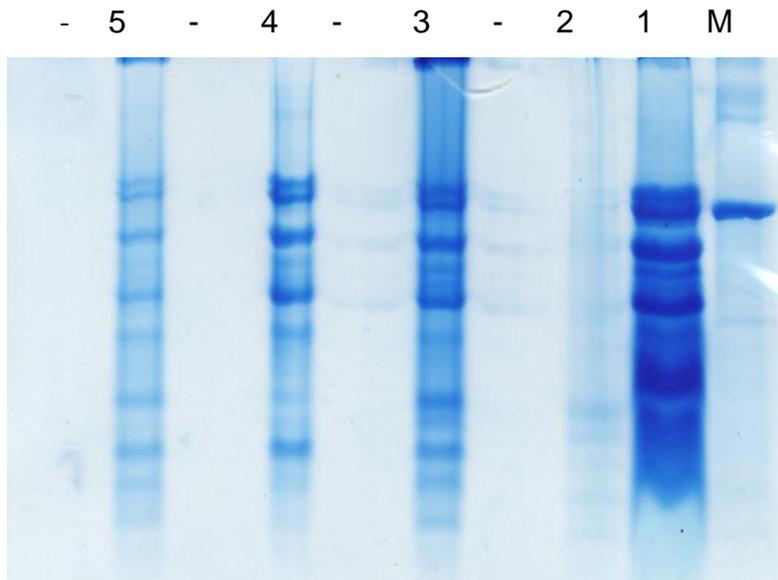


Figura 3. Gel de poliacrilamida, contiene proteína obtenida de la columna de interacción hidrofóbica, teñido con azul brillante. Carril 5 proteína eluída con Tris-Tween al 1%; carril 4, proteína eluída con DMSO al 100%; carril 3, proteína eluída con DMSO 50%; carril 2 proteína eluída con acetonitrilo al 100 %; carril 1, proteína que no se “pegó” a la columna y “carril “M” marcador de albumina de bovino (66 kDa). Proteína extraída de la harina cruda.

En la tinción específica para glucoproteínas, se observó que la fracción hidrofóbica eluída con acetonitrilo nuevamente permitió la mayor eficiencia de recuperación, mostrándose 4 bandas principales, bien definidas (Figura 4).

“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

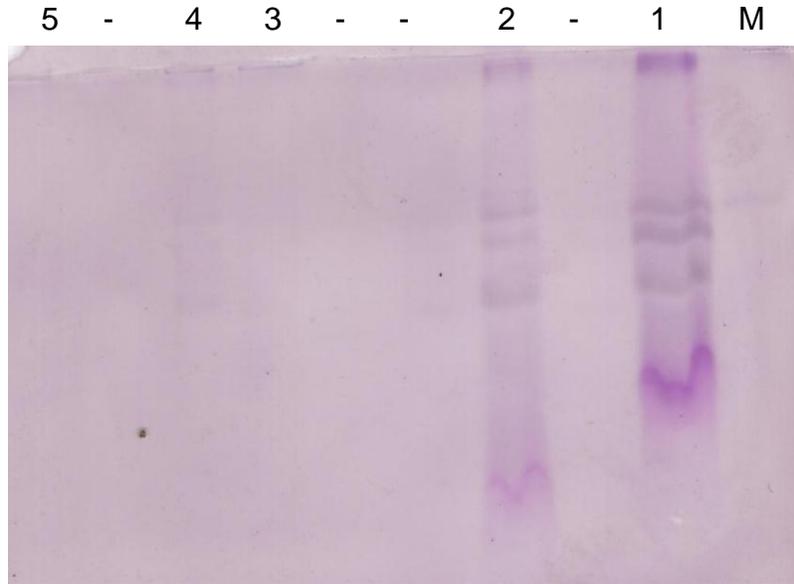


Figura 4. Gel de poliacrilamida, contiene glucoproteínas obtenidas de la columna de interacción hidrofóbica teñido con PAS. Carril 5, proteína eluída con Tris-Tween al 1%; carril 4, proteína eluída con DMSO al 100%; carril 3, proteína eluída con DMSO 50%; carril 2, proteína eluída con Acetonitrilo al 100 %; carril 1, proteína que no se “pega” a la columna y carril M marcador de peso molecular (66 kDa). Proteína extraída de harina tostada. En los carriles 1 y 2 se observa una banda de alto peso molecular que esta glucosilada.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

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

ISBN: 978-607-95635

M - 1 - 2 3 - 4 5 -

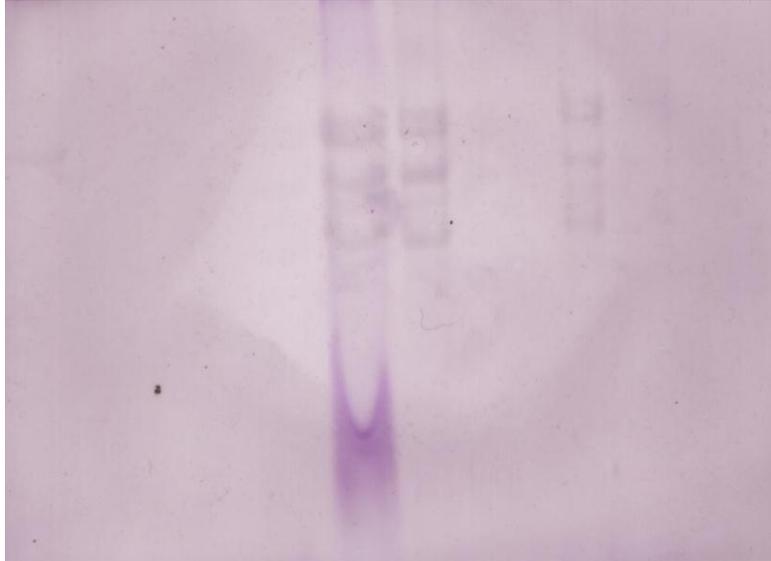


Figura 5. Gel de poliacrilamida, contiene glucoproteínas obtenidas de la columna de interacción hidrofóbica teñido con PAS. Carril M, marcador de 66 kDa; carril 1, proteína que no se “pega” a la columna; carril 2, proteína eluída con acetonitrilo al 100 %; carril 3, proteína eluída con DMSO 50%; carril 4, proteína eluída con DMSO al 100% y “carril 5” proteína eluida con Tris-Tween al 1%.

Proteína extraída de la harina cruda

CONCLUSIONES

La separación y purificación de las proteínas hidrofobicas e hidrofílicas de harina cruda se logró de manera consistente. En la de semilla tostada no fue posible extraer proteínas hidrofóbicas. Se puede obtener más claramente una separación de fases, con tritón x-114, usando la centrifuga. Luego de pasar por la columna de interacción hidrofóbica se logra un perfil electroforético “más limpio” de las proteínas más abundantes. La tinción para glucoproteínas, muestra que hay varias proteínas glucosiladas, lo que posibilita el uso de columnas de interacción para carbohidratos (lecitinas) para avanzar en su purificación.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Akintayo E. T., Esuoso A. O. 1998. Emulsifying properties of some legume proteins. *Food Science. Technology.* 33:239-246.

Avendaño G. A. 2000. Manejo y aprovechamiento de *Prunus serotina* en comunidades campesinas de Tlaxcala y Estado de México. Colegio de Postgraduados, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Montecillo, Texcoco.

Linnemann A.R., Swaving D M. 2002. Towards sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Analysis of the primary links of the production chain. *Food Science. Part. I:* 42:377-401.

Meng G. M. 2002. Characterization of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Science Technology.* 37:687-695.

McVaugh. 1951. *Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.). *Brittonia* 7: 299. 1949.

Rahman M. H. 2000. The nutritional toxicity of sweet lupin (*Lupinus Angustifolius*) seed proteins. *J. Sci. Food Agric.* 80:72-78.

Raya-Pérez, J.C.; C. L. Aguirre-Mancilla, R. Tapia-Aparicio, J. G. Ramírez-Pimentel, J. Covarrubias-Prieto. Caracterización de las proteínas de reserva y composición mineral de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). *Polibotánica* 2012: 223-235

Tian S. W., Kyle D. M. 1999. Pilot scale isolation of proteins from field peas (*Pisum sativum* L.) for use as food ingredients. *Int. J. Food Science Technology.* 34:33-39.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

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

ISBN: 978-607-95635

Vertommen A., B. Panis, R. Swennen, S. C. Carpentier (2010) Evaluation of chloroform/methanol extraction to facilitate the study of membrane proteins of non-model plants. *Planta* 231:1113-1125.

Wolf W.J., Sathe S.K. 1998. Ultracentrifugal and Polyacrylamide Gel Electrophoretic Studies of Extractability and Stability of Almond Meal Proteins. *J. Sci. Food Agric.* 78:511-521.