

RESULTADOS PRELIMINARES DEL AISLAMIENTO DEL GEN *Cat* EN *Cucurbita argyrosperma sororia* PARA EL DISEÑO DE UNA QUIMERA ENZIMÁTICA CON POTENCIAL ANTIOXIDANTE

César Antonio López Marín^a, Francisco Javier Espitia Orozco^{ab}, Ma. Cristina del Rincón Castro^a, Ma. Fabiola León Galván^{a*}

a Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Ex Hacienda El Copal, Km. 9. Carretera Irapuato-Silao A.P. 311 C.P. 36500. Irapuato, Gto, México.

b Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, Departamento de Ingeniería Ambiental, Blvd. Cuitzeo de los Naranjos No. 401, Abasolo, Gto * fabiola@ugto.mx

RESUMEN:

Los lípidos son de los principales constituyentes de la mayoría de los alimentos, uno de los principales problemas relacionados con alimentos ricos en grasas es la oxidación o enranciamiento de ellas, produciendo sustancias que afectan las propiedades organolépticas de cualquier producto (particularmente aroma y sabor), y algunas con características tóxicas para nuestro organismo, es por esto que a lo largo del tiempo, se han generado diversas técnicas, tratamientos y sustancias capaces de actuar en contra de éste proceso de alteración, tales como algunos métodos físicos y recientemente, la introducción del uso de enzimas. El uso de las enzimas GOX y CAT en conjunto, es capaz de reducir la cantidad de oxígeno residual, por acción intermedia de glucosa, generando como producto final de las dos reacciones ácido glucónico, agua y la reducción a la mitad de una molécula de oxígeno. En este trabajo, se logró identificar por medio de RACE 5´-3´ la presencia del gen que codifica para la enzima CAT en semillas de chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) y avances preliminares del gen *gox* en *Aspergillus niger*, con la finalidad de desarrollar un sistema recombinante capaz de producir las dos enzimas simultáneamente con uso potencial en la industria de los alimentos.

ABSTRACT:

Lipids are a major constituent of most foods, one of the major problems associated with fatty foods is the oxidation or rancidity of them, producing substances that affect the organoleptic properties of any product (particularly odor and flavor) and some with toxic properties for our body, which is why over time, have generated various techniques, treatments and substances capable of acting against this process of alteration, such as some physical methods and recently the introduction the use of enzymes. Using CAT and GOX enzyme together is capable of reducing the amount of residual oxygen, glucose intermediate action, generating the final product of the two gluconic acid water reactions and halving of an oxygen molecule. The two enzymes were identified for the gene coding for the CAT enzyme in Chicayota seeds (*Cucurbita argyrosperma sororia*) and preliminary progress of *Aspergillus niger* GOX gene, using molecular techniques RACE 5´-3, in order to develop a system capable of producing recombinant simultaneously with potential used in the food industry.

Palabras clave:

Antioxidante, Enranciamiento, Chicayota.

Keyword:

Antioxidant, Rancidity, Chicayota.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Se define como deterioro de los alimentos a cualquier tipo de alteración, ya sea física, química o biológica que ocasione pérdida de características deseables al alimento, y que pueden afectar no solo sus propiedades organolépticas, sino también reducir su vida útil (Alonso *et. al.*, 2005).

Por su origen, los agentes de deterioro se clasifican en 3 grandes grupos, teniendo los agentes físicos, químicos y biológicos. Dentro de los procesos químicos de deterioro, el enranciamiento de lípidos es uno de los que adquieren mayor relevancia, producto de reacciones de oxidación e hidrólisis, dando como producto compuestos volátiles que dan olores y sabores indeseados; siendo esto más frecuente en grasas insaturadas.

Enranciamiento de lípidos

Los lípidos pertenecen a los principales constituyentes de los alimentos, éste grupo de biomoléculas pueden ser clasificados de manera general en tres grandes grupos: lípidos simples (triglicéridos, ésteres, etc.), lípidos compuestos (fosfolípidos, esfingolípidos, lipoproteínas, etc.), y los lípidos derivados (ácidos grasos, vitaminas solubles en grasas, esteroides, terpenoides, etc.). En los alimentos de origen animal existe una cantidad importante de ácidos grasos insaturados.

La insaturación en ácidos grasos, como se mencionó anteriormente, hace susceptible a las grasas a la oxidación por parte del oxígeno, generando complejos químicos que afectan de manera crítica las propiedades organolépticas de aquellos alimentos que los contienen. (Jadhav *et al.*, 1995)

Antioxidantes

Son definidos por el código alimentario como aquellas sustancias que por separado o mezcladas entre sí, pueden utilizarse para impedir o retardar, en los alimentos y las bebidas, las oxidaciones catalíticas y proceso que llevan a enranciamientos naturales provocados por la acción del aire, luz o indicios metálicos. Los alimentos más susceptibles a la oxidación son aquellos que contienen un porcentaje importante de lípidos (Pokorny *et al.*, 2005).

Glucosa Oxidasa

El descubrimiento de ésta enzima es atribuida a Müller, quien encontró ésta enzima en *aspergillus niger* y en *penicillum glaucum* (Müller, 1928); Müller estableció en 1928 que ésta enzima cataliza la reacción de oxidación de glucosa en ácido glucónico, en años posteriores, Nord y Engel, encontraron una enzima con una acción similar en *Fusarium lini* (Bernhauer, 1928) Frank *et al.*, purificó la enzima a partir de *aspergillus*, y, después de varios experimentos (Franke *et al.*, 1963), y descubrió que la actividad en las preparaciones, estaba relacionada con la concentración de Flavin, esto fue el primer indicio que en un futuro fue la base para determinar que la GOX es una Flavoproteína.

Catalasa

La catalasa (CAT), igualmente conocida como peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza, principalmente en las células animales, específicamente en las mitocondrias, y en los peroxisomas (Chance *et al.*, 1955). Ésta enzima es una metaloproteína tetramérica, y su peso molecular oscila entre los 210-280 kDa. Consta de 4 subunidades idénticas que contienen un grupo prostético de protoporfirina IX, y el contenido de hierro dentro de la enzima no rebasa el 0,09 % del peso molecular total de la enzima (Hadju *et al.*, 1977).

Reacción en conjunto de Glucosa Oxidasa y Catalasa

La GOX y la CAT son enzimas utilizadas como aditivos alimentarios, para la conservación de alimentos, ya que, en combinación, son capaces de eliminar el oxígeno residual después del envasado (Ojeda *et al.*, 2011).

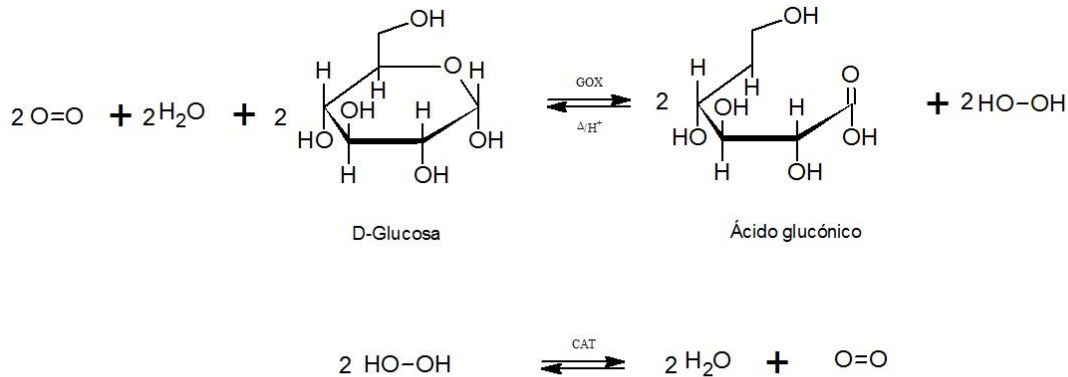


Figura 1. Reacción en conjunto de GOX y CAT (Tomada y modificada de Scott, 1953).

La reacción completa tiene una ganancia de 1/2 de moléculas de oxígeno reducido por cada glucosa oxidada, es decir, convertida a ácido glucónico, como puede observarse en la Fig. 1, la cantidad de oxígeno presente en cualquier sistema es reducida por cada reacción (Ashie *et al.*, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.

La semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) fue obtenida del mercado de Ometepec, Asoyú y Marquelia, Guerrero.

Extracción de RNA, síntesis de cDNA, y RACE de catalasa a partir de semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*).

La extracción de RNA se realizó de acuerdo al método de cloruro de Litio, la síntesis de cDNA por PCR fue realizado por medio de la enzima superscript II reverse transcriptase, de la marca invitrogen, y el RACE por PCR fue realizado utilizando oligos específicos para cada gen.

Extracción de RNA, síntesis de cDNA, y amplificación del gen glucosa oxidasa por PCR de *Aspergillus niger*.

La extracción de RNA se realizó por medio del kit power RNA isolation kit de la marca MO BIO, la síntesis de cDNA por PCR fue realizado por medio de la enzima superscript II reverse transcriptase, de la marca invitrogen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo RNA total a partir de las semillas de *Cucurbita argyrosperma sororia*, el cual fue usado posteriormente para la síntesis de cDNA de doble cadena, como se puede observar en la Figura 1, y a partir de él, utilizando un par de oligos generados a partir del análisis de secuencias del gen catalasa en organismos afines. Como se presenta en la Figura 2, se logró identificar mediante la amplificación de un fragmento específico de los extremos RACE 5' y 3' la presencia del gen catalasa.

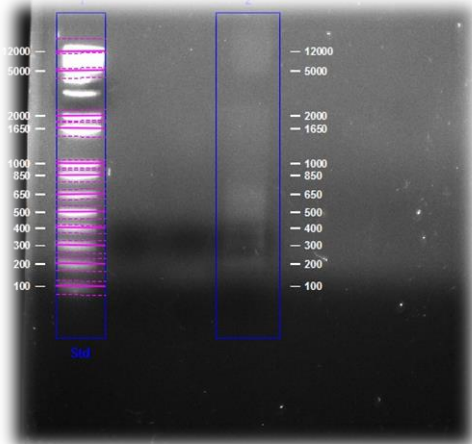


Figura 1 cDNA de chicayota

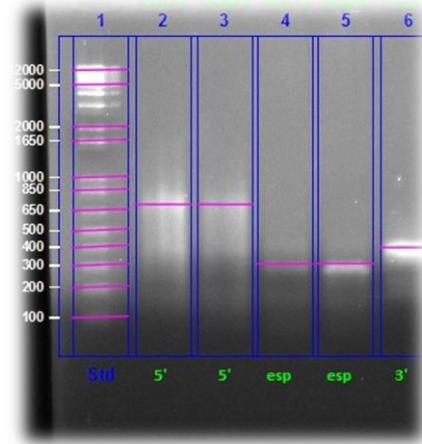


Figura 2 fragmentos del gen catalasa

En el proceso de estandarización para la detección del gen catalasa se realizó un gradiente de temperaturas para determinar las condiciones óptimas de alineamiento de los oligos en los fragmentos, obteniéndose mejor resultado a 55.7°C en el extremo 5' y 53.8 °C en el 3' (Figura 2). Los extremos fueron purificados y congelados.

Se realizó un plaqueo en medio PDA de la cepa de *Aspergillus niger*, posteriormente, se cortaron cubos de agar y se agregaron a un matraz con medio PDB, del cual se extrajo el material biológico para la extracción de RNA total, obteniéndose el barrido esperado (Figura 3) y fue usado después para la síntesis de cDNA de doble cadena (Figura 4).

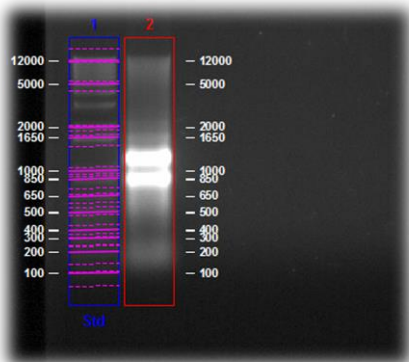


Figura 3. RNA total de *A. niger*

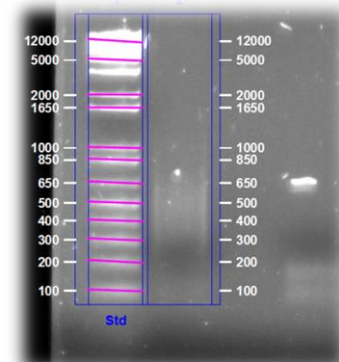


Figura 4. cDNA *Aniger*

CONCLUSIONES

Se logró detectar la presencia del gen catalasa en chicayota por medio de la técnica RACE, y fue posible obtener el cDNA de *Aspergillus niger*, el paso siguiente es la identificación del gen *gox* en el hongo, y el desarrollo del sistema recombinante, por lo tanto podemos concluir que el diseño y prueba de éste sistema es viable y posible, siendo el siguiente paso de ésta investigación, siendo éstas dos enzimas en conjunto, una opción importante en el tratamiento en contra de la autooxidación lipídica que afecta a muchos alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, M. (2005). La alimentación y la nutrición a través de la historia. J. S. Salvadó, P. G. Lorda, & J. M. S. i Ripollès (Eds.). Editorial Glosa, SL.
- Ashie, I.N.A., Simpson, B.K. & Smith, J.P. Mechanism for controlling enzymatic reactions in foods. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 36, 1–30 (1996)
- Bernhauer, K. Z. *Physiol. Chem.* 1928
- Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic, 1955;764-5.
- Franke, W., Eichhorn, G., Möchel, L., & Bertram, I. (1963). Zur Kenntnis der sogenannten Glucose-oxydase. *Archiv für Mikrobiologie*, 46(1), 96-116.
- Hadju J, Wyss SR, Aebi H. Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem* 1977; 80:199-207.
- Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D., & Madhavi, D. L. (1995). Lipid oxidation in biological and food systems. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER*.
- Müller, D. (1928). Studies on the new enzyme glucose oxidase. I. *Biochem. Z*, 199.
- National Center for Biotechnology Information, 2015, www.ncbi.nlm.nih.gov/
- Ojeda, L., Noguera, N., Triana, J. L., & Triana-Alonso, F. (2011). Obtención de un extracto enzimático de glucosa oxidasa y catalasa con potencial antioxidante en alimentos, en un medio de cultivo no convencional. *BioTecnología*, 15(2), 48-58.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). *Antioxidantes de los alimentos*. Zaragoza, Ed. Acribia SA, 364p.
- Scott, D. (1953). Food stabilization, glucose conversion in preparation of albumen solids by glucose oxidase-catalase system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(11), 727-7