

ANÁLISIS PROTEOMICO PRELIMINAR DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE LA SEMILLA DE CHICAYOTA (*Cucurbita argyrosperma sororia*)

Herrera Castillo F. L. Ma^a, Mares-Mares, E.^a, Del Rincon Castro M. C.^a,
Ordoñez Acevedo L.G.^b y León-Galván, M. F.^{a,*}

^a Departamento de Alimentos-Posgrado Biociencias, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca de la Universidad de Guanajuato. Carr. Irapuato–Silao km 9.0 Ex-Hacienda El Copal. C.P. 36500. Irapuato, Gto. México.

^b Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). Departamento de Bioquímica. Libramiento Norte Carr. Irapuato-León Km 9.6. C.P.36821. Irapuato, Gto. *fabiola@ugto.mx

RESUMEN:

La semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) brinda un alto contenido proteína (35.0±2.4%) y un alto contenido de aceites (49.5±2.3%), es muy consumida en zonas urbanas de México y de países de América Central. Las proteínas de reserva proveen una fuente de nitrógeno y azufre durante los estadios tempranos de desarrollo y crecimiento de la plántula, son ricas en asparagina, glutamina, arginina y prolina. Osborne (1924) las clasifico de acuerdo a la solubilidad seriada en Albuminas, Globulinas, Prolaminas y Glutelinas. En este trabajo se realizó la extracción de dichas fracciones proteicas utilizando un método seriado y directo, cuantificándolas con el método de Bradford y se caracterizaron sus pesos moleculares por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, así como el análisis bromatológico. El contenido de proteína total fue del 30.17%, poco menos a lo reportado, de esta, el correspondiente a la fracción soluble corresponde en un 95.09-97.18% a las glutelinas, siendo la fracción más importante. En el análisis electroforético se encontró similitud en los pesos moleculares de las globulinas 11S y glutelinas (70, 40, 28 y 23 KDa). Los resultados del análisis proteómico preliminar, surge la hipótesis de que la Chicayota puede contener péptidos bioactivos en sus proteínas de reserva.

ABSTRACT:

Chicayota seed (*Cucurbita argyrosperma sororia*) provides a high protein content (35.0 ± 2.4%) and a high oil content (49.5 ± 2.3%) is widely consumed in urban areas of Mexico and Central American countries. Storage proteins provide a source of nitrogen and sulfur during the early stages of development and growth of the seedlings, they are rich in asparagine, glutamine, arginine and proline. Osborne (1924) classify them according to their solubility in albumin, globulin, glutelins and prolamins. This paper carried out the extraction of these protein fractions using the serial and the direct method, the obtained extracts were quantified by the Bradford method and its molecular weight were characterized by SDS-PAGE under reducing conditions. According to the bromatologic analysis the protein content was 30.17%, slightly less than that reported. The amount of the soluble fraction corresponds to a 95.09-97.18% to glutelins, being these the most important fraction. In electrophoretic analysis similarity was found in the molecular weights of the 11S globulins and glutelins (70, 40, 28 and 23 KDa). From preliminary results of proteomic analysis, emerges the hypothesis that Chicayota may contain bioactive peptides in their storage proteins

Palabras clave:

Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*), Proteínas de Reserva, SDS-PAGE.

Keyword:

Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*), Storage Protein, SDS-PAGE.

Área: Nutrición y nutraceuticos; Alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

Composición química y propiedades biológicas de la Chicayota

Uno de los grupos de plantas con mayor número de especies utilizadas como alimento humano es la familia de las Cucurbitáceas. Dentro de ella, el género *Cucurbita* se destaca como uno de los más importantes; siendo *Cucurbita argyrosperma* una de las especies cultivadas del género más profundamente estudiada en los últimos años. Esta especie presenta dos sub-especies: (i) *Argyrosperma*, formada por cuatro variedades y (ii) *Sororia*, que comprende poblaciones silvestres con amplia distribución desde México hasta Nicaragua. *Cucurbita argyrosperma sororia* ha sido reconocida como el ancestro silvestre del grupo, tanto por su compatibilidad reproductiva y similitud morfológica con los restantes taxa del complejo. Las semillas son el producto más importante, sobre todo por su contenido de aceite ($49.5 \pm 2.3\%$) y de proteínas ($35.0 \pm 2.4\%$) y su alto consumo en las zonas urbanas de México y de otros países de América Central. Las semillas se consumen enteras, asadas, tostadas o molidas, siendo el principal ingrediente de salsas utilizadas para la confección de diferentes estofados, por ejemplo el pipián, mole verde, etc. así como en la elaboración de algunas bebidas (Hernández B. and León J., 1994).

Proteínas de Reserva

Las proteínas de reserva se pueden definir como: cualquier proteína que se sintetiza y se acumula en grandes cantidades durante el desarrollo y maduración de las semillas. Son rápidamente hidrolizadas durante la germinación para proveer una fuente de nitrógeno y azufre durante los estados tempranos de desarrollo y crecimiento de la plántula y generalmente son ricas en asparagina, glutamina, arginina y prolina (Segura-Nieto et al., 1994; Mandal y Mandal, 2000; Shewry et al., 1995). Osborne desarrolló una clasificación de las proteínas vegetales en función de su solubilidad en una serie de disolventes: solubles en agua (albúminas), solubles en sal (globulinas), solubles en alcohol (prolaminas) y solubles en ácidos/álcalis (glutelinas). Cada grupo es además clasificado en varios grupos basados en sus relaciones estructurales (Miernyk and Hajduch 2011; Waksa F. and Takaiwa, 2013).

Los problemas actuales de salud pública en México y en el mundo, han llevado a la investigación de nuevas alternativas para la prevención o en su caso tratamiento de las enfermedades más frecuentes como son el cáncer, la obesidad y la hipertensión. Por lo que, una alternativa para la prevención y/o tratamiento de estas es el uso de componentes bioactivos obtenidos de fuentes naturales en la dieta (Torruco et al., 2008), estos compuestos son llamados péptidos bioactivos. No se cuenta con información bioquímica de la semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*). Esta investigación permitirá identificar la presencia de péptidos bioactivos en las semillas. Para considerarla como fuente potencial de componentes naturales para la prevención de enfermedades no transmisibles en México. Por tal motivo este trabajo está enfocado al análisis proteómico preliminar de la Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*), con la finalidad de caracterizar las proteínas de reserva y de estas, identificar péptidos con actividades biológicas en estudios posteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Las semillas de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) se adquirieron en el mercado de Ometepec, Azoyú y Marquelia Gro. Se molieron, se desengrasaron con éter de petróleo, utilizando el método 920.39 de la AOAC. La pastilla resultante libre de grasa se secó a

temperatura ambiente. La harina desengrasada se tamizó hasta obtener una harina de malla No. 100, la cual se almacenó a 4°C hasta su posterior uso

Análisis Químico Proximal

El contenido de nitrógeno total (método 954.01), grasa (método 920.39), cenizas (método 923.03), fibra (método 962.09) y humedad (método 925.09) de la Chicayota entera se determinó de acuerdo a los procedimientos estándar de la AOAC (1990), así como el contenido de Calcio y Fosforo. Todas las muestras se trabajaron por triplicado.

Extracción de Proteínas

Se utilizó el método de extracción seriada (ES) en el cual, la fracción de albúminas más nitrógeno no proteínico (NNP) se obtuvo a partir de harina desengrasada y se empleó como agente de extracción agua destilada. Las suspensiones de harina/solvente (1:10 p/v) se extrajeron con agitación magnética por 1h a 4°C y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se colectó y congeló para análisis posterior. La pastilla resultante se resuspendió en 0.1 M NaCl, 0.010 M K₂HPO₄, pH 7.5, 0.001 M EDTA para la extracción de globulinas 7S; y se siguió el procedimiento de extracción seriada arriba mencionado. La fracción de globulinas 11S se obtuvo con el buffer 0.8 M NaCl, 0.010 M K₂HPO₄, pH 7.5, 0.001 M EDTA. Las prolaminas se obtuvieron con una solución de etanol al 70% y finalmente las glutelinas con una solución 0.1 M de NaOH. Los sobrenadantes se colectaron y almacenaron a -20°C hasta su uso. Por otra parte se utilizó el método de extracción directa (ED) en el cual, para cada fracción se diluyó por separado harina desengrasada con el solvente (según la fracción) sin reutilizar las pastillas.

Cuantificación de Proteínas

Las fracciones de proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford con el kit Protein assay de Biorad de acuerdo con las especificaciones del fabricante y al protocolo modificado por León Galván (2011). Todas las muestras se trabajaron por triplicado

Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por León-Galván (2011). Todos los geles se corrieron en un sistema Mini-Protean III de Biorad. La reducción de puentes disulfuro se realizó con mercaptoetanol. Después de la electroforesis los geles se tiñeron con Azul de Commasie Brillante G250 en una concentración final de 0.08%. El desteñido se llevó a cabo lavando el gel con una solución de 45% de metanol + 5% ácido acético.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Químico Proximal

La composición química de la semilla permite conocer su calidad para el consumo humano. La Tabla 1 muestra la composición proximal de la Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*). El contenido total proteico es del 30.17% más alto al contenido de los cereales de 12%, e incluso aún más que al valor de las leguminosas que oscila entre 18 y 25%. El porcentaje de proteína es más alto al reportado por la bibliografía. Por lo que es una buena fuente de proteínas para la búsqueda de las proteínas de reserva.

Extracción de las proteínas de reserva y Cuantificación

Se logró obtener de cada una de las fracciones proteicas por los métodos de extracción directa (ED) y extracción seriada (ES) y a las cuales se les determino la concentración de proteína por el método de Bradford, utilizando una curva de concentración de BSA (Albumina Sérica Bovina). Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los valores encontrados en proteína de la Chicayota son superiores a los reportados por Silva 2007 comparando con el amaranto en las fracciones de Glutelinas (24-28%) pero muy inferiores para el caso de Globulinas (33-38%). Comparando con trigo el contenido de glutelinas es aun superior (hasta un 85%) pero es inferior el contenido de Globulinas, que puede estar presente hasta un 15%, según lo establecido por De la Vega (2009). Comparando con el frijol el contenido de globulinas es muy inferior, ya que el frijol puede llegar a tener hasta un 27% del contenido de Globulinas de acuerdo a lo reportado por Hernández y colaboradores (1996). Se encontraron rendimientos superiores en la extracción directa en comparación con la extracción seriada) en la fracción de las glutelinas (97.186 y 95.090% respectivamente.

Tabla 1. Análisis Proximal de la semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*)

Parámetro	Contenido (%)
Humedad	3.67
Cenizas	4.16
Proteína*	30.17
Extracto Etéreo	33.57
Extracto Libre de Nitrógeno	1.72
Fibra Total	26.71
Calcio (mg/100g)	322.97
Fósforo (mg/100g)	1232.25

*Factor de Conversión 6.25

Tabla 2. Concentración de Proteína, de las fracciones proteicas de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*).

Fracción	Extracción Seriada (ES)		Extracción Directa (ED)	
	mg/g de Harina de Chicayota	Porcentaje (%)	mg/g de Harina de Chicayota	Porcentaje (%)
Albuminas	1.617 ^a	1.278	1.624 ^a	0.627
Globulinas 7S	1.721 ^a	1.360	1.114 ^a	0.430
Globulinas 11S	2.591 ^a	2.048	4.282 ^b	1.654
Glutelinas	120.25 ^b	95.090	251.5 ^c	97.186
Prolaminas	0.280 ^c	0.221	0.262 ^d	0.101

Las medias con diferente literal presentan diferencia mínima significativa (Prueba de Tukey P<0.05)

Electroforesis SDS-PAGE

Para el análisis electroforético se utilizaron las fracciones de la extracción directa y seriada. El análisis electroforético fue llevado a cabo bajo condiciones desnaturalizantes. La fracción globulinas puede dividirse en dos clases de proteínas; globulinas 7S y globulinas 11S. En los análisis de electroforesis SDS-PAGE se detectó una gran numero de banda en albuminas, globulinas 7S y prolaminas, utilizando la extracción directa y seriada. En la Figura 1, el gel mostró las bandas principales de la glutelinas (fracción principal) de 90, 70, 40, 30, 28, 23, 22, 17, 14, 12, 11kDa de la extracción directa. Algunos de estos valores coinciden con lo reportado en las proteínas del amaranto (Silva, 2007) y Nuez (Mares, 2012). En la segunda fracción más importante de la Chicayota (Globulinas 11S) se detectaron bandas principales a 200, 120, 100, 70, 60, 50, 40, 38, 28, 25, 23, y 21 kDa de la extracción directa. La fracción de las globulinas 11S mostró una alta similitud en los pesos moleculares con las glutelinas, lo que nos indica que las Glutelinas son una familia de proteínas tipo globulinas con una estructura Hexomérica de

300KDa. (Abugouch, 2003). Se determinó de acuerdo al patrón de bandeo que la extracción directa de proteína permite la mejor caracterización de los pesos moleculares.

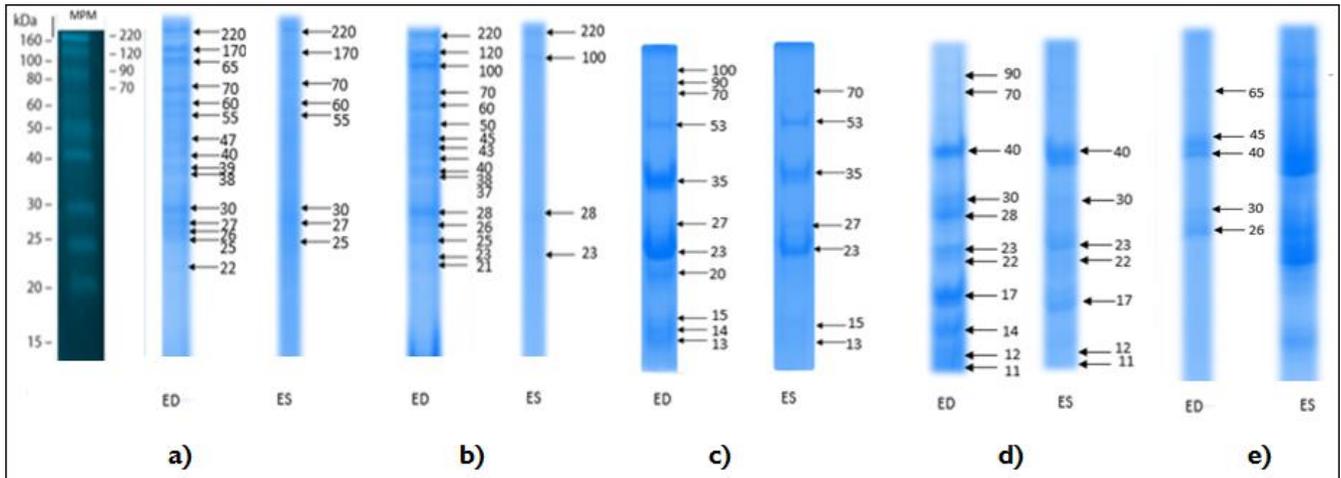


Figura 1. Análisis electroforético de las proteínas de reserva de la Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*). Extracción Directa (ED) y Extracción Seriada (ES). Fracciones: a) Albuminas, b) Globulinas 7s, c) Globulinas 11s, d) Glutelinas y e) Prolaminas.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se realizó la caracterización de las proteínas de reserva de la Chicayota, debido a que no existen reportes que exploren sus propiedades proteicas. Se determinó que las glutelinas fueron la fracción de reserva más importante, seguidas de las globulinas 11S. Se observó un marcado efecto del tipo de extracción al momento de analizar estadísticamente las concentraciones para cada una de las fracciones, con excepción de las albúminas en las cuales no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las medias obtenidas en ambos métodos de extracción. En el análisis de electroforesis SDS-PAGE no se detectó la presencia de prolaminas en el caso de la extracción directa, lo cual sugiere que la extracción sucesiva favorece la obtención de esta fracción debido a la estructura de la proteína. El hecho de que el tipo de extracción influya en la concentración de las proteínas que se obtienen se confirma al momento de comparar el número de bandas en los gels de electroforesis, observándose en general un mayor número de bandas cuando se realiza la extracción directa, observándose más definidas después de haber limpiado las fracciones. Por lo tanto, de acuerdo al análisis proteómico preliminar, surge la hipótesis de que la Chicayota contiene péptidos bioactivos en sus proteínas de reserva, y puede representar una alternativa como fuente natural para la prevención o tratamiento de enfermedades como el cáncer, diabetes, estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
 Badui, D. S. 2006. Química de los alimentos. Pearson Educación: México: 205-632.

- Barba de la Rosa, A. P., J. Gueguen, O. Paredes-López, and G. Viroben. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *J. Agric. Food Chem.* 40:931-936.
- Goesaert, H., K. Bris, W. S. Veraberbeke, C. M. Courtin, K. Gebruers, and J. A. Delcour, 2005. Wheat flour constituents: how the impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science Technology.* 16:12-30
- Hernández B. et León J., 1994. Cultures Marginalisées 1492: un autre perspective. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Higgins T. J. V., 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Plant Physiology.* 35:191-221.
- Lira S. R., Eguiarte F. L., Montes H. S., 2009. Proyecto Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros *Cucurbita* y *Sechium* que crecen y/o se cultivan en México. UNAM.
- Myernyk Ján A., Hajduch Martin, 2010. Seed proteomics. *Proteomics.* 390-400.
- Osborne TB., 1924. The vegetable proteins. Longsmans. 2nd ed. New York; Green.