

ANÁLISIS COMPARATIVO DE EXTRACCIÓN SECUENCIAL Y EXTRACCIÓN DIRECTA DE PROTEÍNAS DE RESERVA DE NUEZ (*CARYA ILLINOINENSIS*).

J.A. López-Castro ^a, L.G. Ordoñez-Acevedo ^c y M.F. León-Galván ^{b*}.

^a Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. ^b Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. ^c Centro de Investigación de Estudios Avanzados, IPN - Irapuato. Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Libramiento norte Carretera Irapuato – León km 9.6, Irapuato, Guanajuato, 36821, México. *fabiola@ugto.mx

RESUMEN:

La nuez es uno de los frutos secos más consumidos a nivel mundial. Es muy valoradas por su alto nivel nutricional, aporte de ácidos grasos, fitoquímicos y por su contenido de proteínas. El contenido de proteínas de la nuez es del 13.4% y se encuentran distribuidas en las proteínas de reserva. Las proteínas de reserva se pueden clasificar en: albuminas, globulinas 7S, globulinas 11S, prolaminas y glutelinas. El estudio de las proteínas de reserva permite identificar posibles péptidos con actividad biológica benéfica, por lo que objetivo del presente trabajo se centró en extraer las proteínas de reserva con dos métodos para establecer cuál de ellos permite una mejor extracción así como la obtención de fracciones puras. La nuez fue molida y desgrasada para la obtención de harina. La extracción seriada se realizó con una relación 1:60 (harina:solvente) mientras que la directa con una relación 1:10 (harina:solvente). La extracción seriada favorece la extracción de globulinas 11S pero merma la cantidad e integridad de las glutelinas. La extracción directa indicó que la fracción más abundante es la de glutelinas ($p < 0.05$) y se observan proteínas con pesos moleculares de 57, 42, 35, 34, 23, 21 y 15 kDa.

ABSTRACT:

The walnut is one of the dry fruits more consumed worldwide. It is much appreciated for its high nutritional level, because it provides not just fatty acids and phytochemicals, but also proteins. The walnut contains 13.4% of proteins. The proteins in walnut are distributed in storage proteins. Storage proteins can be classified into: albumins, 7S globulins, 11S globulins, prolamins and glutelins. The study of storage proteins allows to identify beneficial bioactive peptides. The main goal of this project was to compare two extraction methods for the storage proteins to establish which one allows a better extraction and purity, of protein fraction. The walnut was ground and defatted to obtain flour. Serial extraction was performed with 1:60 (flour:solvent) while direct extraction was performed with 1:10 (flour:solvent). Serial extraction enhance extraction of 11S globulins but reduces extraction and integrity of glutelins. Direct extraction indicated that glutelins are the major fraction in walnut storage proteins ($p < 0.05$). In direct extraction it could be observed proteins with molecular weight of 57, 42, 35, 34, 23, 21 y 15 kDa.

Palabras clave: nuez, extracción, proteínas.

Keywords: walnut, extraction, proteins.

Área: Cereales, leguminosas, oleaginosas y alimentos funcionales.

INTRODUCCIÓN

El fruto del pecano (*Carya illinoensis*), conocido como nuez, es considerado un fruto seco el cual es muy consumido y valorado en todo el mundo. Las nueces son fuente de micronutrientes y macronutrientes dentro de los que destacan los ácidos

grasos, sin embargo, también es fuente de fitoquímicos con propiedades antioxidantes. Por otro lado, uno de los elementos menos estudiados de la nuez es su contenido de proteínas. La nuez posee 13.4% de proteínas, lo que es superior al contenido de proteínas en cereales (12%), pero inferior al contenido de proteínas en leguminosas (18-25%) (Derbyshire et al., 1976). Aunque posee un buen perfil de aminoácidos, la nuez resulta ser deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y es alto en aminoácidos esenciales leucina y treonina (Mares, 2012). Las proteínas en la nuez se encuentran distribuidas entre las fracciones que componen las proteínas de reserva. Las proteínas de reserva son un conjunto heterogéneo de proteínas que se almacenan en las semillas con la finalidad de proporcionar aminoácidos y nitrógeno necesarios para la germinación y el desarrollo de la planta en sus primeras etapas. La primera clasificación de las proteínas de reserva (y más empleada hasta el día de hoy) fue establecida por Osborne (1924).

Ésta clasificación se basa en la solubilidad de las diferentes fracciones de proteínas en distintos solventes: albuminas (agua), globulinas 7S (soluciones 0.1M de NaCl), globulinas 11S (soluciones 0.8M de NaCl), prolaminas (solución de etanol al 70%) y glutelinas (glutelinas alcalinas 0.1M NaOH). El estudio de las proteínas de reserva es de relevancia ya que permite conocer sus propiedades nutricionales al establecer el balance de aminoácidos esenciales que posee la semilla estudiada, así como la identificación de péptidos encriptados que posean posible actividad biológica benéfica para la salud humana. De estudios realizados en diferentes semillas, se ha encontrado que las mayores fracciones de proteínas en avena y leguminosas son las globulinas (7S y 11S), mientras que en la mayoría de los cereales son las prolaminas y las glutelinas (Higgins, 1984). Esto podría situar a la nuez como pseudocereal ya que las mayores fracciones son las de globulinas (principalmente 11S) y glutelinas. También, se ha encontrado que la mayor frecuencia de ocurrencia de péptidos con actividad antihipertensiva se halló en la fracción de glutelinas (0.2045), mientras que la mayor frecuencia de ocurrencia de péptidos con actividad antioxidante se encuentra en las fracciones de glutelinas (0.04) y globulinas 11S (0.03) (Mares, 2012). Sin embargo en la mayoría de los trabajos se emplea la extracción secuencial de 1 paso o la extracción directa. Poco se sabe de los efectos que pueda tener una extracción secuencial de múltiples pasos con el fin de agotar una fracción de proteínas antes de pasar a la siguiente en cuanto la calidad, cantidad e integridad de las proteínas de reserva.

Es por ello que el presente trabajo se centró en la comparación entre un método de extracción secuencial de múltiples pasos contra un método de extracción directa para determinar cuál método permite extraer la mayor cantidad de proteína, así como determinar si existe arrastre entre fracciones cuando se extraen de manera directa. Los resultados indican que existe un arrastre de las globulinas 11S cuando se extrae glutelinas de manera directa. Se observó que con el método secuencial se favorece la extracción de ésta fracción, pero disminuye la cantidad de glutelinas extraídas (114.96 mg de proteína/g de harina de nuez), también se aprecia una reducción en la integridad de las proteínas ya que no se apreciaron proteínas en los geles de poliacrilamida al 12.5%. Por otro lado, la extracción directa favoreció la extracción de

glutelinas (465.5 mg de proteína/g de harina de nuez) y éstas conservaron su integridad ya que se observaron 7 bandas con los pesos moleculares de 57, 42, 35, 34, 21 y 15 kDa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La nuez fue proporcionada por el Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP) del Bajío. La nuez se peló a mano para extraer el fruto, posteriormente se molió. Se utilizó un equipo soxhlet para la extracción de grasas usando éter de petróleo como solvente. Se empleó una relación 1:200 (g de nuez: mL de éter) para la extracción de extracto etéreo. Para la homogenización de la muestra, la nuez desgrasada se sometió a un tamizado en malla No.100 y el producto se denominó harina de nuez.

Extracción secuencial de las fracciones de proteínas

Se utilizó una relación 1:60 (harina: solvente) para todas las extracciones. Se realizaron 7 extracciones por cada fracción. Las extracciones se hicieron de la misma pastilla en orden secuencial. Las albuminas se extrajeron utilizando agua M.Q. Las gloulinas 7S se extrajeron utilizando una solución 0.1M de NaCl, 0.001M K_2HPO_4 , 0.01M EDTA, se ajustó el pH de la solución a 7.5. Las globulinas 11S se extrajeron utilizando una solución 0.8M de NaCl, 0.001M K_2HPO_4 , 0.01M EDTA se ajustó el pH de la solución a 7.5. Las prolaminas se extrajeron con una solución de etanol al 70% y 0.5% de acetato de sodio. Las glutelinas se extrajeron con una solución 0.1M de NaOH. La extracción se realizó con agitación en vortex durante 3 minutos, posteriormente 1 minuto en hielo. Estos pasos se repitieron por un periodo de 15 minutos. A continuación se centrifugo a 13,500 rpm durante 10 minutos y se recolecto la fase acuosa denominada extracto. Los extractos obtenidos se almacenaron a $-20^{\circ}C$.

Extracción directa de las fracciones de proteínas

Se utilizó una relación 1:10 (harina: solvente) para todas las extracciones. Se realizó una sola extracción para cada fracción de diferente pastilla. Se emplearon los mismos solventes descritos para la extracción seriada. Se emplearon las mismas condiciones de extracción, centrifugación y almacenamiento que las descritas para la extracción seriada.

Cuantificación de las proteínas

Las proteínas se cuantificaron utilizando el reactivo Quick Star Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, C.A.). Se preparó una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 2,000, 1,500, 1,000, 750, 500, 250, 125 y 0 $\mu g/mL$ para cada solvente utilizado en las extracciones. Con los datos obtenidos se realizó la prueba de comparación de medias por los métodos de Tukey y Krukal-Wallis ($p < 0.05$).

Separación de proteínas

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5% para la separación de las proteínas. Se emplearon condiciones desnaturalizantes para las muestras (SDS-PAGE). La separación se realizó 25 minutos a 80V, posteriormente 120 minutos a 110V. Los geles se fijaron durante 25 minutos, se tiñieron con Bio-Safe Comassie Stain (Bio-Rad Laboratories, Hercules, C.A.) durante 45 minutos y se destiñieron durante 2-3 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio del contenido de proteínas en especies vegetales permite conocer el valor nutricional para el ser humano. La nuez posee un 13.43% de proteína (Mares, 2012) distribuidas entre las diferentes fracciones de proteínas de reserva. Los resultados de la extracción secuencial se muestran en la Tabla I, donde se observa que la fracción de glutelinas es la más abundante con un promedio de 114.96 mg de proteína/g de harina de nuez, seguida por la fracción de globulinas 11S con 16.13%. Por otro lado, las fracciones menos abundantes resultaron ser las albuminas (0.807%) y prolaminas (4.30%). Los resultados de la extracción directa en la Tabla II, en la que se muestra que la fracción más abundante es la de glutelinas con un promedio de 465.5 mg de proteína/g de harina de nuez, pero a diferencia de los resultados anteriores, aquí no hay diferencia estadísticamente significativa entre las fracciones de albuminas, globulinas 11S y prolaminas, por lo tanto estarían situadas como las fracciones más abundantes después de glutelinas. Por otro lado, se realizó la comparación entre las concentraciones de las mismas fracciones con los dos métodos de extracción. Los resultados se muestran en la Tabla III e indican que la extracción directa favorece la extracción de las albuminas, y glutelinas, sin embargo la extracción seriada favorece la extracción de las globulinas 11S. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para la extracción de prolaminas y globulinas 7S con ambos métodos. Los resultados encontrados concuerdan con lo reportado por Mares (2012) quién indica que glutelinas y globulinas en conjunto representan las fracciones más abundantes en las proteínas de reserva de la nuez. Para el caso de glutelinas, los resultados obtenidos con el método directo concuerdan con lo reportado por Osborne (1924) que indica que las glutelinas representan al menos el 80% de la proteína de reserva. Para el caso de globulinas 7S y 11S se sabe que son las fracciones más abundantes en avena y leguminosas, y resultan ser la segunda fracción más abundante en la proteína de reserva de la nuez, mientras que los cereales generalmente son más abundantes las prolaminas y glutelinas. Se observa que en el caso de las glutelinas esto corresponde con reportes previos (Higgins, 1984). Por otro lado, se sabe que para la soya, las globulinas 7S y 11S corresponden al 70% de la proteína de reserva (Meinkel et al., 1981). Para el arroz, la cantidad de glutelinas es de entre el 70 y 80% de la proteína de reserva (Katsube et al., 1999). Debido a lo anterior, la nuez podría considerarse un pseudocereal ya que posee en mayor proporción glutelinas y globulinas.

Tabla I. Extracción de las fracciones de proteína de reserva utilizando el método secuencial.		
Fracción	Promedio de mg de proteína/g de harina	Porcentaje de proteína extraída (%)
Albuminas	1.29 (±0.77) ^{aa}	0.807

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Globulinas 7S	11.30 (± 2.90) ^{b/a}	7.051
Globulinas 11S	25.86 (± 5.10) ^{c/a}	16.132
Prolaminas	6.90 (± 7.56) ^{a/a}	4.303
Glutelinas	114.96 (± 3.8) ^{e/a}	71.704

Diferente literal superíndice indica diferencia estadísticamente significativa con la prueba de Tukey y Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Tabla II. Extracción de las fracciones de la proteína de reserva con el método directo.

Fracción	Promedio de mg de proteína/g de harina	Porcentaje de proteína extraída (%)
Albuminas	14.12 (± 3.36) ^{a/a}	2.71
Globulinas 7S	7.36 (± 2.41) ^{b/a}	1.14
Globulinas 11S	17.22 (± 2.17) ^{a/a}	3.31
Prolaminas	15.65 (± 0.32) ^{a/a}	3.01
Glutelinas	465.5 (± 11.15) ^{c/a}	89.54

Diferente literal superíndice indica diferencia estadísticamente significativa con la prueba de Tukey y Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). (Continuación Tabla II).

Tabla III. Comparación por fracción de la extracción de proteína de reserva con el método secuencial y el método directo.

Fracción	Promedio de mg de proteína/g de harina extracción secuencial	Promedio de mg de proteína/g de harina extracción directa
Albuminas	1.29 (± 0.77) ^{a/a}	14.12 (± 3.36) ^{b/a}
Globulinas 7S	11.30 (± 2.90) ^{a/a}	7.36 (± 2.41) ^{a/a}
Globulinas 11S	25.86 (± 5.10) ^{a/a}	17.22 (± 2.17) ^{b/a}
Prolaminas	6.90 (± 7.56) ^{a/a}	15.65 (± 0.32) ^{a/a}
Glutelinas	114.96 (± 3.8) ^{a/a}	465.5 (± 11.15) ^{b/a}

De manera horizontal diferente literal superíndice indica diferencia estadísticamente significativa con la prueba de Tukey y Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

El estudio de los patrones de proteínas en las fracciones de la proteína de reserva nos indican, el número de subunidades que componen cada fracción, la posible relación que tienen las diferentes fracciones entre sí y la integridad de la misma cuando ha pasado por un proceso de extracción (Shewery et al., 1995; Bailey et al., 1980). Todas las proteínas extraídas con el método directo mostraron mejor integridad que su homologas extraídas de manera secuencial.

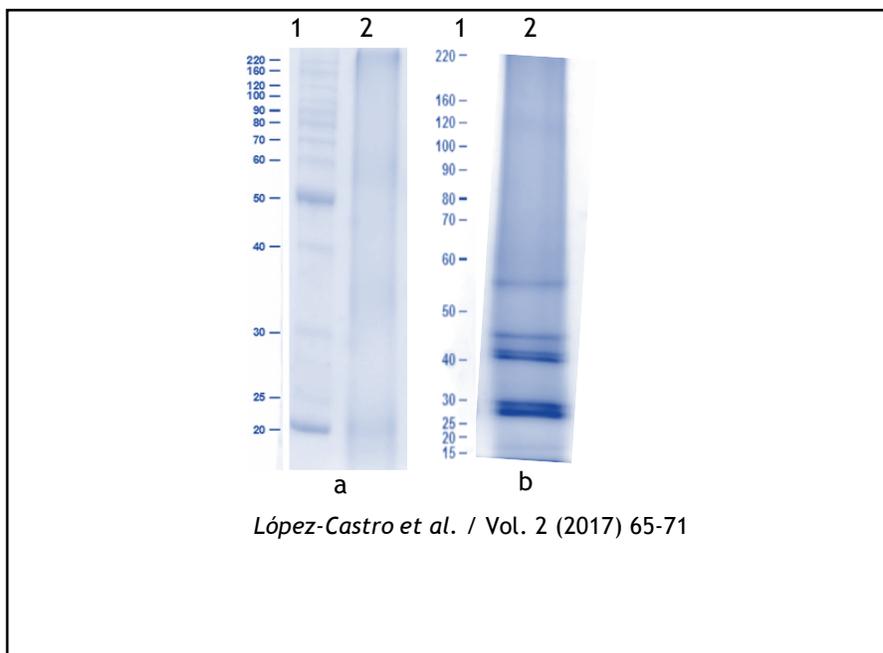


Figura 1. Patrón de bandas observado en geles de poliacrilamida al 12.5% para la fracción de glutelinas. Panel a) extracción seriada, panel b) extracción directa. Carril marcado 1) marcador de pelo molecular, carril marcado 2) glutelinas.

Es importante resaltar la integridad de las fracciones de glutelinas, ya que en diversos estudios han demostrado que es donde se encuentra la más alta frecuencia de ocurrencia para péptidos con actividad biológica benéfica como antioxidante, anticarcinogénica y antihipertensiva (de la Rosa et al., 2010; Silva et al., 2008). Como se observa en la Figura 1 panel B, la fracción de glutelinas muestra siete bandas bien definidas con pesos moleculares de 57, 42, 35, 34, 21 y 15 kDa, mientras que en el panel A no se observan bandas definidas. Esto podría deberse a que la extracción seriada es muy agresiva y como se discutió anteriormente favorece la extracción de las globulinas por lo que mermará la cantidad de proteínas en la fracción de glutelinas, ya que pertenecen a familias estrechamente relacionadas (Higgins, 1984). En contraste, de la Rosa et al., (2010) reportan cinco bandas para la fracción de glutelinas con pesos moleculares de 65, 50, 35, 22 y 20 kDa en amaranto. Esta diferencia entre las bandas de proteína puede deberse a modificaciones postraduccionales que incluyen corte del péptido señal ubicado en el extremo N-terminal (Shewry et al., 1995). Por otro lado, se ha identificado la glicosilación de las cadenas laterales de las proteínas, particularmente en el aminoácido asparagina en el cual se han encontrado residuos de manosa, glucosamina y otros azúcares neutrales en semillas de soya y chícharo (Bailey et al., 1980) por lo que contribuye a la diversidad de proteínas observadas en la fracción de glutelinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, D-S., Deluca, V., Durr, M., Verma, D-P., Maclachlan G-A, 1980. Involvement of Lipid-linked Oligosaccharides in Synthesis of Storage Glycoproteins in Soybean Seeds. *Plant Physiol* 66(6), 1113-1118.
- de la Rosa, A-P., Montoya, A-B., Martínez-Cuevas, P., Hernández-Ledezma, B., León-Galván, M., de León-Rodríguez, A. y Gonzáles, C., 2010. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide* 23(2), 106-111.
- Derbyshire, E., Wright, D-J. y Boulter, D., 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15(1), 3-24.
- Higgins, T-J., 1984. Synthesis and Regulation of Major Proteins in Seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 191-221.
- Katsube, T., Kurisaka, N., Ogawa, M., Maruyama, N., Ohstuka, R., Utsumi, S. y Takaiwa, F., 1999. Accumulation of Soybean Glycinin and Its Assembly with the Glutelins in Rice. *Plant. Physiol.* 120(4), 1063-1074.
- Mares, E., 2012. Identificación y caracterización de péptidos bioactivos en proteína de reserva de la nuez (*Carya illinoensis*). Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato. Campus Irapuato-Salamanca, División Ciencias de la Vida.
- Meinke, D-W., Chen, J., Beachy, R-N., 1981. Expression of storage protein genes during soybean seed development. *Planta*, 153(2), 130-139.

- Osborne, T-B, 1924. The Vegetable Proteins. London, Longmans, Greece, and Co., 73-81.
- Shewry, P-R., Napier, J-A. y Tatham, S-A., 1995. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 945-956.
- Silva-Sánchez, C., de la Rosa, A-P., León-Galván, M-F., de Lumen, B-O., de León-Rodríguez, A. y de Mejía, E-G., 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J. Agric, Food Chem.* 56(4), 1233-1240.