

# OBTENCIÓN DE DIGERIDOS TRÍPTICOS A PARTIR DE ALBÚMINAS Y GLOBULINAS 7S DE LA SEMILLA DE CHICAYOTA (*Cucurbita argyrosperma subsp. sorobia*)

Ventura Jiménez, Guadalupe (1), León Galván, Ma. Fabiola (2)

1 [Ingeniería en Procesos Bioalimentarios, Universidad Tecnológica de Tabasco] | [lupita.vent@hotmail.com]

2 [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [fabiola@ugto.mx]

## Resumen

En México una de las enfermedades crónico-degenerativas con mayor incidencia es la diabetes; una de las investigaciones que más importancia ha tomado, es el tratamiento de la diabetes mediante el uso de péptidos con actividades antidiabéticas obtenidos a partir de fuentes alimentarias; los péptidos bioactivos son cadenas de aminoácidos que tiene cierta actividad biológica y se encuentra en las proteínas de reserva, que son proteínas que se almacenan en las semillas; Osborne (1924) las clasifica de acuerdo a su solubilidad en Albuminas, Globulinas, Prolaminas y Glutelinas. La semilla de Chicayota contiene un alto contenido de proteínas, principalmente Globulinas 11s y se ha reportado la presencia de péptidos bioactivos. En este trabajo se realizaron extracciones de fracciones de Albuminas y Globulinas 7s de la misma fuente vegetal, se cuantificaron mediante el método de Bradford, se sometieron a un proceso de digestión enzimática usando tripsina, los digeridos se cuantificaron con el método de Lowry y finalmente se determinaron sus pesos moleculares por electroforesis SDS-PAGE. El análisis electroforético dio como resultado una diferencia significativa entre las fracciones proteínicas antes y después de la digestión enzimática, obteniendo proteínas de bajo peso molecular, lo que indica la presencia de péptidos que pueden tener actividad antidiabética.

## Abstract

In Mexico one of the chronic-degenerative diseases with greater incidence is diabetes; One of the investigations that has taken more is the treatment of the diabetes through the use of peptides with the antidiabetic activities obtained from alimentary sources; Bioactive peptides are chains of amino acids that have a biological activity and are found in the reserve proteins, which are the proteins that are stored in the seeds; Osborne (1924) classifies according to their solubility in Albumins, Globulins, Prolamins and Glutelins. Chicayota seeds contain a high content of proteins, mainly globulins 11 and the presence of bioactive peptides has been reported. In this work, extractions of fractions of 7s and Globulins of the same plant source were performed, quantified using the Bradford method, subjected to an enzymatic digestion process using trypsin, the digests were quantified using the Lowry method and finally They determined their molecular weights by SDS-PAGE electrophoresis. Electrophoretic analysis resulted in a significant difference between protein fractions before and after enzymatic digestion, obtaining low molecular weight proteins, indicating the presence of peptides which may have antidiabetic activity.

Palabras Clave

Tripsina; Digestión; SDS-PAGE;

## INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional abarca prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, para mantener el bienestar y prevenir enfermedades. Estos conocimientos, aptitudes y prácticas son oriundos de cada cultura.

Las calabazas se han usado en la medicina tradicional debido a la gran cantidad de propiedades que contienen, como antidiabéticas, antihipertensivas, antitumorales, antimodulatorias, antibacteriales, antihipercolesterémicas, antiparasitarias, antiinflamatorias, entre otras. [1]

En México una de las enfermedades crónico-degenerativas con mayor presencia es la diabetes, la cual es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce y es caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica. Según la OMS en 2016, la diabetes ocupaba el 14 % de las enfermedades más comunes en México.

En la actualidad, una de las investigaciones que más importancia ha tomado, es el tratamiento de la diabetes mediante el uso de péptidos con actividades antidiabéticas obtenidos a partir de fuentes alimentarias; en comparación con otros tratamientos, el uso de péptidos presenta una menor cantidad de efectos secundarios.

Los péptidos bioactivos son cadenas de aminoácidos que tiene cierta actividad biológica y se encuentra en los alimentos, los péptidos están compuestos de 3 a 20 aminoácidos [2]. Existen reportes sobre la presencia de péptidos bioactivos en las proteínas de reserva, tanto de origen vegetal como animal; actualmente debido a las funciones importantes que realizan a nivel celular se han vuelto una alternativa para usar en el desarrollo de alimentos funcionales.

Las proteínas de reserva son proteínas que se sintetizan y acumulan en grandes cantidades en las semillas [3]. Las proteínas de vegetales fueron clasificadas por Osborne de acuerdo a su solubilidad en albuminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas),

prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (solubles en ácidos o álcalis).

Los péptidos se pueden obtener a través de hidrólisis enzimáticas. En la hidrólisis de proteínas es necesaria la optimización de ciertos parámetros como la temperatura, el pH, el tiempo, entre otros, ya que esto puede influir en la calidad y resultado de la hidrólisis. También influye el tipo de enzima que se esté usando. [4]

## Propiedades y composición química de la Chicayota.

La chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, un grupo de plantas con un alto número de especies utilizadas para la alimentación; la *Cucurbita argyrosperma* es la especie más estudiada; el fruto maduro se usa pocas veces para la elaboración de dulces; las semillas son el producto más importante, se consumen tostadas, asadas, molidas o como ingredientes en salsas o guisos, tienen un alto contenido de aceite (39%) y proteína (44%), más alto que la cantidad de proteínas de cereales (12%) y leguminosas (entre 18% y 25%); su consumo es más común en zonas urbanas de México y América Central [5].

Se ha reportado que la semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) tiene un alto contenido de proteínas solubles en soluciones salinas [6], siendo las globulinas 11S las más estudiadas en cuanto a su contenido de péptidos con propiedades antidiabéticas. Sin embargo, existe la posibilidad de encontrar péptidos con estas funciones en las otras fracciones proteínicas, por lo que este estudio representa un primer paso para la obtención de este tipo de compuestos a partir de otras fracciones proteínicas de la misma fuente vegetal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material Biológico:** Las semillas de Chicayota fueron proporcionadas por un agricultor local de Ometepec, Azoyú y Marquelia Gro.

**Extracción de fracciones de proteínas:** Se extrajeron las fracciones proteínicas de albuminas, globulinas 7S y 11S, utilizando la relación 1:10

(harina/solvente), para el caso de albúminas se usó como solvente agua. Se extrajeron por agitación en vortex durante 15 min y después se centrifugo a 13000 rpm, durante 15 min a 4°C, se extrajo el sobrenadante y se almacenó para su posterior uso; la misma pastilla se resuspendió en 0.1 M NaCl, 0.010 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 0.001 M EDTA para la extracción de globulinas 7S, siguiendo la metodología antes mencionada.

**Cuantificación de fracciones proteicas:** Para la cuantificación de las fracciones proteicas se utilizó el método de Bradford, las muestras se trabajaron por triplicado.

**Hidrolisis enzimática:** Se realizó una digestión enzimática de las fracciones de albúminas y globulinas 7S; se trabajó con una concentración de proteína de 400 µg; se utilizó la enzima tripsina a diferentes relaciones conforme a la concentración de proteína que se tiene, 1:1, 1:10, 1:20 y 1:30 (proteína/enzima), además se añadió Urea 8 M, DTT, IAA y agua. Todas las muestras se incubaron a 37°C por un tiempo de 24 hrs.

**Cuantificación de Digeridos:** Se realizó una cuantificación de los digeridos, usando el método de Lowry, las muestras se trabajaron por triplicado.

**Electroforesis SDS-PAGE:** La electroforesis de proteínas se realizó para las fracciones de proteínas extraídas y para los digeridos. Se elaboraron 4 geles, con gel concentrador a 4% y los geles separadores uno al 12.5% para las fracciones proteicas y los demás a 15% para los digeridos. Todos los geles se corrieron en un sistema Mini-Protean III de Biorad, los geles se corrieron a 15 amperes por gel durante aproximadamente 2 hrs. La reducción de puentes disulfuro se realizó con mercaptoetanol. Después de la electroforesis los geles se tiñeron con Azul de Coomassie Brillante y se destiñeron lavando el gel con una solución de 45% de metanol + 5% ácido acético.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

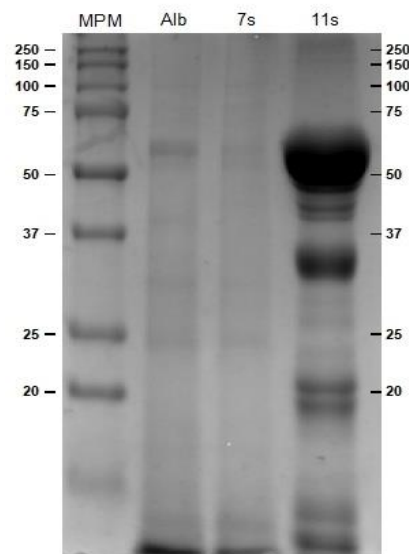
**Extracción de fracciones proteicas, cuantificación y electroforesis SDS-PAGE:** Se logró extraer todas las fracciones proteicas planteadas (albúminas y globulinas 7S). Después se determinó su concentración por el método de Bradford y usando una curva de concentración de

Albumina Sérica Bovina. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se encontró que existía una mayor concentración de la fracción proteica de Globulina 7S, aunque la diferencia en concentración contra las albúminas no era muy significativa.

**Tabla 1. Concentración de las fracciones proteicas extraídas de Chicayota (Cucúrbita Argyrosperma Sororia)**

Fracción	mg/ml
Albuminas	1817.24 ± 26.02
Globulinas 7s	1840.16 ± 37.30

En la Imagen 1, se observa que las globulinas 11s son la fracción proteica mayoritaria de la semilla de chicayota como ya se había reportado [6] y que esta fracción presenta proteínas con una mayor diversidad de masas moleculares, sin embargo tanto en las albúminas como en las globulinas 7S se puede apreciar (aunque en menor abundancia) proteínas que varían entre los 75 y 250 KDa.



**Imagen 1. Análisis electroforético de las fracciones de Albuminas, globulinas 7s y 11s. Donde: MPM es el marcador de peso molecular, las letras Alb indica albúminas, 7S y 11S se refieren a las globulinas. Condiciones reductoras-desnaturalizantes. Gel de poliacrilamida 12.5%. Tinción: Azul de Coomassie**

### Hidrolisis enzimática y análisis electroforético

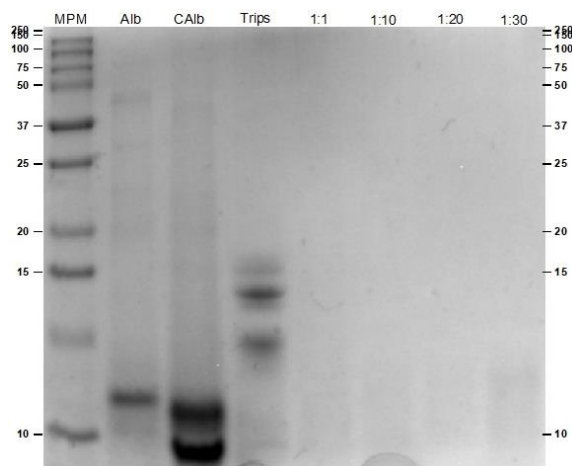
**SDS-PAGE:** Con la cuantificación de las fracciones proteínicas se determinó la cantidad de muestra a usar para concentrar a 400 µg; se obtuvieron 5 pastillas de cada fracción proteínica, una pastilla por cada una de las relaciones determinadas a usar en la digestión de las proteínas y una para el control. Las pastillas se incubarán para la digestión y terminado el tiempo de incubación se realizó la cuantificación de los digeridos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Concentración de las fracciones proteicas después de la digestión.**

Fracción	Relación	mg/ml
Albuminas	1:1	3621.5 ± 102.5
	1:10	3466.5 ± 98.9
	1:20	3291.5 ± 95.3
	1:30	3311.5 ± 91.8
Globulinas 7s	1:1	2021.5 ± 98.5
	1:10	3336.5 ± 95.8
	1:20	3706.5 ± 97.3
	1:30	4691.5 ± 103.1

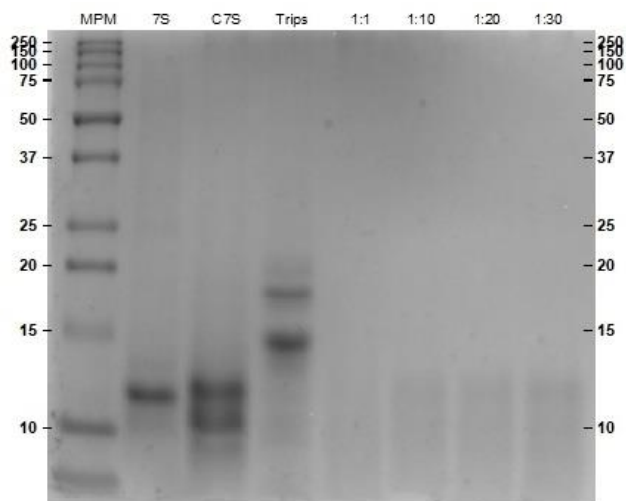
Según un análisis estadístico, ni el tipo de fracción ni la relación enzima/sustrato (p/p) tienen efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de los digeridos ( $\alpha=0.05$ ) y esta concentración corresponde aproximadamente a la proteína antes de llevar a cabo la digestión.

Los digeridos se corrieron en geles de poliacrilamida. En la Imagen 2 se muestra la fracción de albúminas y se hace una comparación con las muestras digeridas de cada relación. Se puede apreciar que en todas las relaciones se logró la digestión (aunque no en igual cantidad) de la fracción proteínica, disminuyendo sus pesos moleculares hasta menores de 10 kDa.



**Imagen 2. Análisis electroforético de las fracciones de Albuminas, comparada con sus muestras digeridas. Donde: MPM es el marcador de peso molecular, las letras Alb indica albúminas, Calb indica el control, Trips es la enzima (tripsina), y 1:1, 1:10, 1:20, 1:30 se refieren a las relaciones de trabajadas en la digestión. Condiciones reductoras-desnaturalizantes. Gel de poliacrilamida 15%. Tinción: Azul de Coomassie.**

En la Imagen 3 se muestra la fracción de globulinas 7S y su comparación con sus digeridos. Las globulinas 7S antes de la digestión tenían proteínas de altas masas moleculares igual que las albúminas, que después de la digestión disminuyeron a menos de 10 kDa, por lo cual podemos decir que se logró obtener péptidos.



**Imagen 3. Análisis electroforético de las fracciones de Globulinas 7s, comparada con sus digeridas. Donde: MPM es el**

marcador de peso molecular, las letras 7s indica albúminas, C7s indica el control, Trips es la enzima (tripsina), y 1:1, 1:10, 1:20, 1:30 se refieren a las relaciones de trabajadas en la digestión. Condiciones reductoras-desnaturalizantes. Gel de poliacrilamida 15%. Tinción: Azul de Coomassie.

Al llevar a cabo la digestión enzimática, se observó que a una relación 1:1 enzima/sustrato (p/p) y llevándose a cabo una digestión de 24h se obtiene una digestión completa. Lo anterior sugiere que se necesita una gran cantidad de tripsina para hidrolizar a tanto a las albúminas como a las globulinas de estas semillas (resistencia a la hidrólisis), como ya se ha reportado para proteínas de otros cereales [6]

## CONCLUSIONES

El uso de hidrólisis enzimática permitió determinar que se pueden obtener péptidos en las fracciones de albuminas y globulinas 72, no solo en las globulinas 11s, por lo que podríamos aprovechar una mayor cantidad de proteínas de reserva de la Chicayota para la obtención de estos compuestos bioactivos.

Se lograron estandarizar los parámetros de digestión enzimática para las albúminas y globulinas 7S de las semillas de chicayota, aplicando un procedimiento para acelerar la digestión triptica de las proteínas a péptidos mediante el uso de agentes caotrópicos y reductores.

## AGRADECIMIENTOS

A la M. en B. Fátima Luz María Herrera Castillo, estudiante de Doctorado en Biociencias por su asesoría y apoyo técnico durante está estancia.

A la Universidad de Guanajuato por el apoyo otorgado para la realización de la estancia de verano de investigación.

## REFERENCIAS

[1] Caili, F., Huan, S., & Quanhong, L. (2006). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 73–80

[2] Torruco-Uco, J. G., M. A. Domínguez-Magaña, G. Dávila-Ortiz, A. Martínez-Ayala, L. A. Chel-Guerrero, and D. A. Betancur. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de Origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6 (2): 158-168.

[3] Bewley, J. D., and J. S. Greenwood. 1990. Protein storage and utilization in seeds. En *Plant physiology, biochemistry and molecular biology*. David T Dennis and David H Tuppín. Ed. John Wiley: 456-469.

[4] Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, & Recio I.. (2010). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44, pp. 10-12.

[5] Hernández B. & León J., (1994) Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

[6] Herrera Castillo F. L., Mares-Mares, E., Del Rincón Castro M. C.a, Ordoñez Acevedo L.G. & León-Galván, M. F. (2016). Análisis proteómico preliminar de las proteínas de reserva de la semilla de chicayota (*Cucúrbita argyrosperma sororia*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1 (2), pp. 430-434.

[7] Chel, G. L., and D. Betancur. (2008). Biopéptidos alimenticios: nuevos promotores de la salud. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 9(2)