

ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS DE POTENCIA PARA LA OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE SEMILLAS DE CHICAYOTA (*Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia*)

Corona Pacheco Ana Cristina (1), Rocha Mendoza María Azucena (2), León Galván Ma. Fabiola (2),
Ozuna César (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato- Salamanca, Universidad de Guanajuato] |[ac.coronapacheco@ugto.mx]

2 [Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato- Salamanca, Universidad de Guanajuato] |[cesar.ozuna@ugto.mx]

Resumen

La semilla de chicayota (*Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia*) contiene hasta 30% de proteínas de reserva las cuales podrían ser una fuente de péptidos bioactivos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de un tratamiento asistido por ultrasonidos de potencia sobre el perfil electroforético de las globulinas 11 S de la semilla de chicayota. Todas las fracciones proteicas fueron extraídas y cuantificadas con base a su solubilidad siendo las fracciones mayoritarias las glutelinas (48.19±0.06%) y las globulinas 11 S (4.97±0.02%). Las globulinas 11 S fueron sometidas a un tratamiento ultrasónico (55±7°C) a 30, 60 y 90% de amplitud de la potencia nominal del equipo (130 W; 20 kHz) por periodos de tiempo de 10, 15 y 20 min. El análisis electroforético mostró un efecto evidente en el tratamiento a 90% de amplitud ya que el bandeo fue más tenue y sin la presencia de bandas de menor peso molecular (<37 kDa). Este hecho sugiere que la aplicación de ultrasonidos puede inducir una hidrólisis en las globulinas 11 S lo cual podría favorecer una posible liberación de péptidos bioactivos.

Abstract

Chicayota seed (*Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia*) contains up to 30% of storage proteins which can be a source of bioactive peptides. The aim of this work was to study the effects of power-ultrasound assisted treatment on the electrophoretic profile of the 11 S globulin fraction of chicayota seed protein. All protein fractions were extracted and quantified based on their solubility, with glutelin (48.19±0.06%) and 11 S globulin (4.97±0.02%) being the major fractions. 11 S globulin was subjected to an ultrasonic treatment (55±7°C) at 30, 60 and 90% amplitude of the nominal power of the equipment (130 W, 20 kHz) for time periods of 10, 15 and 20 min. Electrophoretic analysis showed an evident effect of the treatment at 90% amplitude since the banding was more tenuous and with missing bands of lower molecular weight (<37 kDa). These results suggest that the application of power ultrasound may induce hydrolysis of 11 S globulin and thus favor a possible release of bioactive peptides.

Palabras Clave

Tecnologías emergentes; Fracciones proteicas; Globulinas 11 S; SDS-PAGE.

INTRODUCCIÓN

México cuenta con una amplia variedad de plantas endémicas que han sido utilizadas como base de la alimentación desde tiempos prehispánicos. La chicayota (*Cucurbita argyrosperma* subsp. *sororia*), una calabaza silvestre consumida en comunidades rurales de la región centro-sur del país, ha sido poco estudiada. Sus semillas representan una fuente importante de proteínas [1]. El contenido proteico total de las semillas de chicayota es de alrededor de 30%, lo que representa un contenido superior a lo encontrado en cereales (12%) y leguminosas (18-25%) [2].

En México existe un problema alarmante de salud pública debido al padecimientos de enfermedades crónico-degenerativas que representan la principal causa de muerte en la población [3]. En este sentido, la ciencia y tecnología de los alimentos juega un papel fundamental en el desarrollo de productos que permitan controlar el riesgo de incidencia de este tipo de enfermedades. Una alternativa para el desarrollo de estos productos es la incorporación de péptidos bioactivos obtenidos a partir de matrices de origen vegetal, ya que representan una fuente ampliamente disponible en la naturaleza [4].

En los últimos años se ha demostrado que la aplicación de tecnologías emergentes, tal es el caso de los ultrasonidos de potencia (UP), representa un método innovador, efectivo e inocuo en la liberación de péptidos bioactivos, tanto en matrices de origen vegetal como animal [5].

Debido a los efectos físicos, químicos y mecánicos inducidos por la cavitación, el uso de tratamientos asistidos por UP resulta ser una opción interesante para la modificación de moléculas complejas como lo son las proteínas [6]. Los efectos provocados por los UP dependen en gran medida de las características del medio y de los parámetros ultrasónicos [5].

Por tanto, el principal objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la amplitud ultrasónica y el tiempo del tratamiento sobre una de las fracciones proteicas mayoritarias de la chicayota (globulinas 11 S) a través de la caracterización de su perfil electroforético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Las semillas de chicayota fueron proporcionadas por el Instituto Tecnológico de Guerrero. El análisis bromatológico de las semillas se realizó siguiendo los métodos descritos por la AOAC [7]. Posteriormente, las semillas fueron procesadas (molienda, desgrasado, secado y tamizado) con el fin de obtener harina. Finalmente, la harina se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Extracción de las fracciones proteicas

La extracción de proteína de la semilla de chicayota se llevó a cabo de acuerdo con lo propuesto por Barba de la Rosa *et al* [8]. La metodología se realizó de manera seriada a un paso, manejando una muestra para todas extracciones correspondientes a cada fracción, la cual se hizo pasar por los solventes mencionados en la Tabla 1:

Tabla 1. Solventes empleados para la extracción de las fracciones proteicas en semillas de chicayota.

Fracción proteica	Solvente
Albúminas	Agua destilada
Globulinas 7 S	Buffer: 0.1 M NaCl, 0.010 M K ₂ HPO ₄ , pH 7.5, 0.001 M EDTA
Globulinas 11 S	Buffer: 0.8 M NaCl, 0.010 M K ₂ HPO ₄ , pH 7.5, 0.001 M EDTA
Glutelinas	NaOH 0.1 M
Prolaminas	Etanol al 70%

Las suspensiones de harina/solvente se agitaron durante 15 min a 4°C y se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se recogió y se mantuvo a -20°C hasta su uso. Posteriormente, se determinó la concentración de cada fracción mediante el método de Bradford, el cual se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 595 nm y se comparó con la curva de albúmina sérica bovina [9].

Tratamiento ultrasónico

El tratamiento ultrasónico de las soluciones de las fracciones proteicas de la semilla de chicayota (5 mL) se realizó empleado un sonicador tipo sonda (20 kHz, 130 W, Mod. VCX 130, Sonics & Material, Inc. USA) a una temperatura de 55±7°C. Se evaluaron diferentes porcentajes de amplitud

de la potencia eléctrica nominal del equipo (30, 60 y 90%) a diferentes tiempos de tratamiento (10, 15 y 20 min). Para cada una de las condiciones estudiadas se tomó una alícuota de 250 μ L del total de la solución, la cual fue analizada.

Caracterización electroforética de proteínas de reserva

Para realizar la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) se utilizaron como medio de soporte geles de poliacrilamida de 0.75 mm de grosor. Se empleó un gel separador al 12.5% y 15% (muestras con tratamiento) y un gel acumulador al 4%. La electroforesis se realizó de acuerdo con el método de Laemmli [10], el cual se basa en la presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio) y β -mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas. Posterior a la electroforesis, el gel se fijó (metanol 50%, ácido acético 10%) y fue teñido durante toda la noche adicionando azul de Coomassie al 0.25%. Para desteñir el gel, se lavó por 2 h con ácido acético/etanol/agua. Finalmente, el gel fue conservado en una solución de ácido acético al 3%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la cuantificación de las fracciones de proteína de reserva extraídas de la semilla de chicayota (Tabla 2), se aprecia que las fracciones más abundantes son las glutelinas (48.19 ± 0.06 mg/mL), seguidas de las globulinas 11 S (4.97 ± 0.02 mg/mL).

Estos resultados coinciden con los reportados por Herrera et al. [2], quienes evaluaron dos tipos de extracciones (seriada y directa) en las fracciones proteicas de la chicayota, quienes también observaron una relación parecida entre la cantidad de glutelinas y globulinas 11 S (aproximadamente 50:1). Por otra parte, estos autores indican que la extracción directa resultó ser la más efectiva para casi todas las fracciones proteicas excepto para las prolaminas. Además, Herrera et al. [2] mencionan que el tipo de extracción influye en la concentración de las fracciones proteicas. Por ejemplo, en la extracción seriada, al no purificar las fracciones proteicas, se puede generar un arrastre de otras fracciones de estructura similar, razón por la cual puede variar su concentración.

Fracción proteica	Concentración (mg/mL)
Glutelinas	48.19 ± 0.06
Globulinas 11 S	4.97 ± 0.02
Globulinas 7 S	2.39 ± 0.12
Albúminas	2.03 ± 0.01
Prolaminas	0.086 ± 0.03

En la Figura 1, se muestra el análisis electroforético de las fracciones proteicas extraídas de la semilla de chicayota. En este análisis se aprecia que las glutelinas y las globulinas 11 S tienen un bandeo más intenso con respecto a las otras fracciones. Este hecho está relacionado con la concentración de las fracciones proteicas realizadas en la semilla de chicayota (Tabla 2).

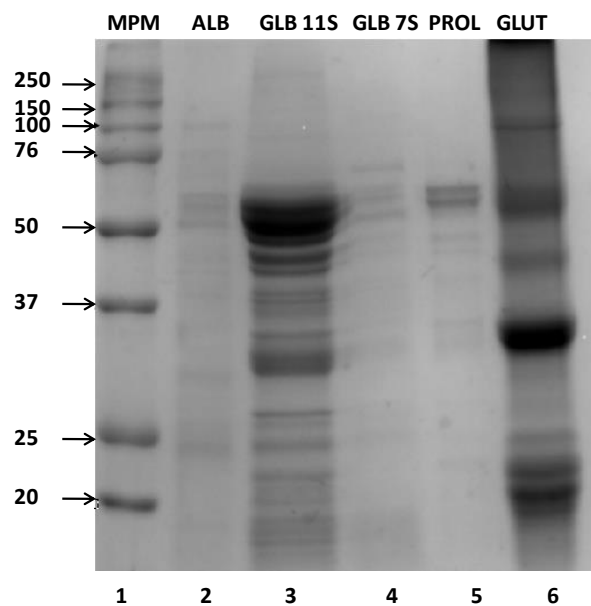


Figura 1. Perfil electroforético de las fracciones de las proteínas de reserva de la semilla de chicayota. Carril 1-MPM: marcador de peso molecular (kDa); Carril 2-ALB: albúminas; Carril 3-GLB 11 S: globulinas 11S; Carril 4-GLB 7 S: globulinas 7 S; Carril 5-PROL: prolaminas; Carril 6-GLUT: glutelinas.

El tratamiento asistido por UP fue aplicado únicamente a las globulinas 11 S, ya que representa una de las fracciones mayoritarias en la semilla de chicayota y una de las más difíciles de hidrolizar [11].

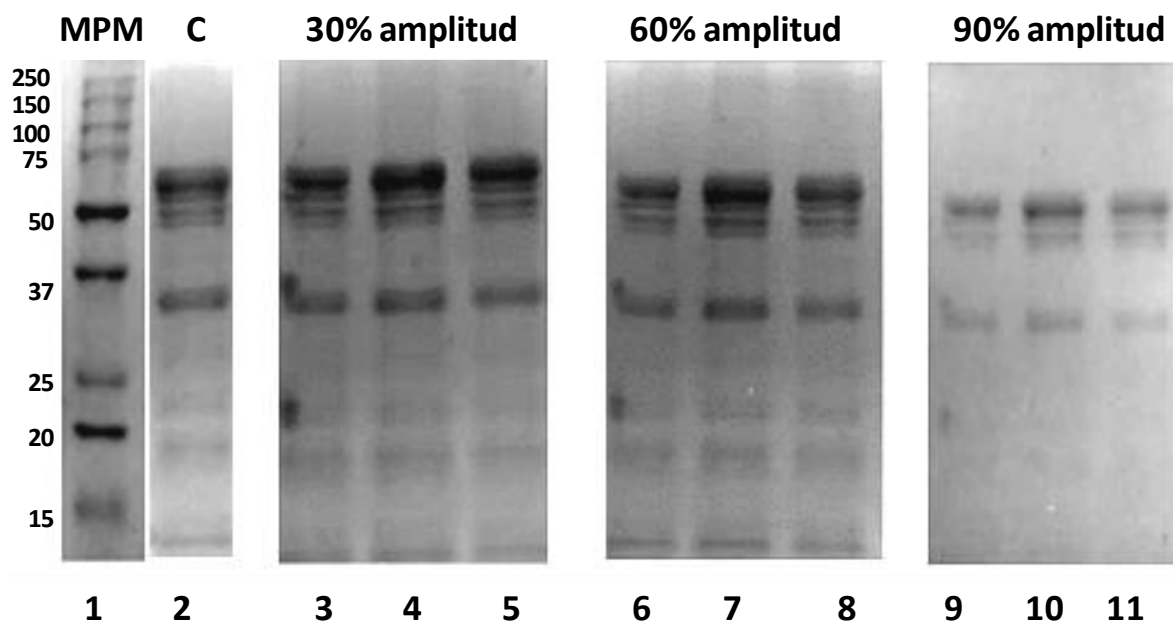


Figura 2: Perfil electroforético del tratamiento asistido por UP sobre la fracción de globulinas 11 S de la semilla de chicayota. Carril 1-MPM: marcador de peso molecular (kDa); Carril 2-C: control; Carriles 3, 4, 5: 30% de amplitud por 10, 15 y 20 min, respectivamente; Carriles 6, 7, 8: 60% de amplitud por 10, 15 y 20 min, respectivamente; Carriles 9, 10 y 11: 90% de amplitud por 10, 15 y 20 min respectivamente

En la Figura 2 se muestra el perfil electroforético de las globulinas 11 S sometidas a un tratamiento ultrasónico. En el perfil electroforético se puede observar que el tiempo de procesamiento en cada uno de los porcentajes de amplitud parece no influir en la degradación de las globulinas 11 S. Sin embargo, el incremento del porcentaje de amplitud parece afectar a la estructura de esta fracción proteica.

Los tratamientos con un 30% y 60% de amplitud de potencia no mostraron un efecto aparente sobre el bandeo de las globulinas 11 S. Sin embargo, en el tratamiento con un 90% de amplitud se logra observar un cambio evidente sobre el bandeo, siendo este más tenue. Además, las bandas por debajo de 37 kDa ya no se aprecian.

Este hecho sugiere que el tratamiento asistido por UP podría estar provocando una hidrólisis de la estructura de las globulinas 11 S, lo cual podría favorecer la liberación de péptidos bioactivos.

Numerosos estudios han demostrado que la aplicación de UP puede cambiar las propiedades estructurales y/o funcionales de las proteínas, alterando sus características moleculares [5, 12]. Sin embargo, el cambio inducido por UP puede depender de la naturaleza de la proteína y de su grado de desnaturalización [13].

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, un tratamiento asistido por UP parece ser efectivo para hidrolizar las globulinas 11 S de la semilla de chicayota, siempre y cuando se alcanza una potencia suficientemente amplia. Este hecho podría favorecer una posible liberación de péptidos bioactivos, los cuales podrían ser incorporados como ingredientes funcionales en alimentos que contribuyan a disminuir la incidencia a enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, es necesario profundizar tanto en el efecto de los UP en la hidrólisis de las otras fracciones proteicas de la chicayota como en su caracterización proteómica para poder analizar de manera particular los diferentes péptidos

resultantes de la hidrólisis de proteínas de la semilla de chicayota y determinar su bioactividad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de SICES Guanajuato México (Programa Incentivos a la Investigación y Desarrollo Tecnológico. Modalidad Apoyo Jóvenes Investigadores. Convenio 138/2016 UG).

REFERENCIAS

- [1] Pérez-Gutiérrez, R. M. (2016). Review of *cucurbita pepo* (pumpkin) its phytochemistry and pharmacology. *Medicinal Chemistry*, 6(1), 12-21.
- [2] Herrera Castillo F. L. M., Mares-Mares, E., Del Rincón Castro M. C., Ordoñez Acevedo L.G. y León-Galván, M. F. (2016) Análisis proteómico preliminar de las proteínas de reserva de la semilla de chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*) *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* Vol. 1, No. 2 (2016) 430-435.
- [3] Córdova-Villalobos, J. Á., Barriguete-Meléndez, J. A., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., ... & Aguilar-Salinas, C. A. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México*, 50(5), 419-427.
- [4] Oseguera-Toledo, M. E., de Mejía, E. G., Reynoso-Camacho, R., Cardador-Martínez, A., & Amaya-Llano, S. L. (2014). Proteins and bioactive peptides. *Nutrafoods*, 13(4), 147-157.
- [5] Ozuna, C., Paniagua-Martínez, I., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., & Amaya-Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*, 77, 685-696.
- [6] O'Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*, 53, 141-154.
- [7] Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis; AOAC: Washington, DC, 2006.
- [8] Barba de la Rosa A.P., Barba Montoya A., Martínez-Cuevas P. Hernández-Ledesma B., León-Galván M.F., De León-Rodríguez A., González C. (2010). Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide*, 23,106–111
- [9] Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254
- [10] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685
- [11] García M, Torre M, Marina M, Laborda F y Rodríguez A. (1997). Composition and characterization of soyabean and related products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 37(4):361-391
- [12] Chandrapala, Oliver, C, Kenthis, S & Ashhokumar. M (2012a) Ultrasonics in Food procesing- Food quality assurance and Food safety. *Trends in Food Science & Tecnology*, 26, 88-98
- [13] Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O.E., & Pílosof, A.M.R. (2012a). Comparative study of high intensity ultrasound deffects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463–472.