Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

Purificación y caracterización de tres proteínas hidrofóbica de capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) de entre 10 y 20 kda

Purification and characterization of three hydrophobic proteins from capulín (Prunus serotina Ehrh.) between 10 and 20 kda

Jiménez-Camargo, S., Ramírez-Pimentel, J.G., Aguirre-Mancilla, C.L., Covarrubias-Prieto, J., Raya-Pérez J.C.*

Tecnológico Nacional de México / I. T. de Roque. km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, C.P. 38110, Celaya, Gto.
m21980086@roque.tecnm.mx; juan.rp1@roque.tecnm.mx; cesar.am@roque.tecnm.mx
jor_covarru-jrg@hotmail.com; juan.rp2@roque.tecnm.mx*

Área de aplicación industrial: Formación de liposomas en productos de belleza o farmacia, industria; vacunas, uso antimicrobiano, entre otras áreas.

Recibido: 19 mayo 2021
Aceptado: 26 diciembre 2022

Abstract

Lipid transfer proteins are ubiquitous proteins in plants. Lipid-binding proteins have a wide range of properties that can be used in the selection of varieties, as well as for nutritional and functional characteristics of food products of plant origin. Vicilins are relatively hydrophobic proteins in which amino acids such as leucine, glutamic acid, serine, asparagine and lysine predominate. These proteins have aroused interest due to their antimicrobial effect, their participation in the resistance of seeds to attack by insects and as an allergen present in foods. When inducing somatic embryogenesis of papaya (Carica papaya), a progressive increase in the accumulation of vicilin and abundant proteins of late embryogenesis (LEA proteins) was observed, indicating their importance in the development of the seed and the embryo. Lipid bodies have attracted interest for their involvement in the industrial manufacture of biodiesel and related high-value lipid products in various organisms, as well as obesity-related human diseases and host-pathogen interactions. The objective of this work was to purify and identify hydrophobic proteins from capulín. With the use of detergents, separation in SDS-PAGE (denaturing polyacrylamide gel electrophoresis), purification in columns and identification by means of mass spectrometry, it was possible to identify low molecular weight hydrophobic proteins of the almond of the capulín seed.

Key words: LEA protein, phase change, viciline.

Resumen

Las proteínas que transfieren lípidos son proteínas ubicuas en los vegetales. Las proteínas de unión a lípidos tienen una amplia gama de propiedades que pueden utilizarse en la selección de variedades vegetales, así como para características nutricionales y funcionales de productos alimenticios de origen vegetal. Las vicilinas son proteínas relativamente hidrofóbicas en las que predominan aminoácidos como leucina, ácido glutámico, serina, asparagina y lisina. Estas proteínas han despertado interés por su efecto antimicrobial, su participación en la resistencia de semillas al ataque por insectos y como alérgeno presente en alimentos. Al inducir embriogénesis somática de papaya (*Carica papaya*) se observó un aumento progresivo en la acumulación de vicilina y de proteínas abundantes de embriogénesis tardía (proteínas LEA), lo que indica su importancia en el desarrollo de la semilla y el embrión. Los cuerpos lipídicos han atraído el interés por su participación en la fabricación industrial de biodiésel y productos relacionados con lípidos de alto valor en diversos organismos, así como enfermedades humanas relacionadas con la obesidad y las interacciones huésped-patógeno. El estudio y la manipulación de estas proteínas que interaccionan con membranas, y por lo tanto con lípidos, permitirá un mejor manejo de algunas características de los cultivos o, por ejemplo, su uso en liposomas. Con el fin de contribuir al conocimiento de las proteínas hidrofóbicas y sus posibles métodos de separación y purificación se planteó como objetivo de este trabajo purificar e identificar proteínas hidrofóbicas de capulín. Con uso de detergentes, separación en SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante), purificación en columnas e identificación mediante espectrometría de masas se logró identificar las proteínas hidrofóbicas de bajo peso molecular de la almendra de la semilla de capulín.

Palabras clave: cambio de fase, proteína LEA, vicilina.

Introducción

El capulín (*Prunus serotina* **Ehrh.***)* tiene su origen en Norteamérica, pero actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo, se cultiva en la región oriental de Canadá y Estados Unidos de Norteamérica, México y Europa (Guzmán *et al*., 2020). En México *P. serotina* se distribuye principalmente en cuatro regiones: septentrional, occidental, central y del sudeste, con las regiones central y occidental (en estados de Michoacán, México, Tlaxcala y Querétaro). El Capulín en el oeste y centro de México crece en zonas cercanas a los bosques de encino (*Quercus*) y pino (*Pinus*) con 400-900 mm de lluvia al año. El capulín, en el centro de México estaba cerca de los asentamientos humanos, ya que sus frutos y madera eran y siguen siendo de interés para la población. Esta especie actúa de vanguardia para ambientes perturbados, lo que le da un uso potencial adicional para la recuperación de terrenos degradados (Fresnedo-Ramírez *et al*., 2011). Se ha encontrado que las hojas y flores de la planta contienen compuestos fenólicos que le confieren gran poder antioxidante principalmente asociado a algunos efectos terapeúticos como el tratamiento de la hipertensión (García-Aguilar *et al*., 2015). Las semillas del fruto son ricas en ácido oleico, en algunos trabajos se ha establecido la presencia en un extracto (acetona-agua) de la cáscara, y un pigmento posiblemente de tipo rutinósido en el fruto de capulín de la República mexicana (Hurtado y Pérez, 2013).

Los triacilgliceroles, como parte de la reserva energética de la semilla, están presentes en cuerpos lipídicos esféricos subcelulares de aproximadamente 0.5 a 2 µm de diámetro. El cuerpo lipídico tiene una matriz de triacilglicéridos recubiertos por una capa de fosfolípidos y la proteína estructural oleosina. Esta cubre completamente la superficie de los cuerpos lipídicos y los previene de la coalescencia, por impedimento estérico y de carga, incluso en semillas desecadas (Huang and Huang, 2017).

Las oleosinas son proteínas hidrofóbicas presentes en la membrana de cuerpos oleosos en los tejidos de almacenamiento de semillas. La membrana del retículo endoplásmico se abulta en el citoplasma a medida que los lípidos se acumulan, eventualmente forman el cuerpo lipídico, constituida por una monocapa de fosfolípidos incrustada con proteínas asociadas; la más abundante es la proteína oleosina (Ming-Der and Huang, 2015). Las oleosinas son proteínas de baja masa molecular (16000-26000 Da), y abundan en semillas oleaginosas. Dentro de cada especie de semilla, generalmente hay dos o más oleosinas de diferente masa molecular (Tzen *et al*., 1990; Frandsen et al., 2001). Están incrustadas en la membrana de la gota de aceite y ayuda a mantener la estructura y regula la movilización de lípidos a través de su extracción y recambio por el sistema ubiquitina-proteasoma. La capa de oleosinas les confiere estabilidad a los cuerpos lipídicos; una molécula de oleosina se puede dividir en tres porciones de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. El péptido N-terminal suele ser corto y anfipático. El péptido C-terminal puede ser corto o largo y anfipático. El polipéptido adyacente a la porción hidrófoba central podría formar una estructura anfipática-helicoidal que interactúa horizontalmente con la capa de fosfolípidos en la superficie del cuerpo lipídico. La porción hidrofóbica central de 72 residuos no polares ininterrumpidos es el sello distintivo de una oleosina. Ninguna otra proteína de ningún organismo tiene un tramo hidrofóbico tan largo.

Las proteínas de transferencia de lípidos y las puroindolinas son proteínas ricas en cisteína con masa molecular de 10-12 kDa que se unen a lípidos catiónicos. Mientras las que transfieren lípidos son proteínas ubicuas en vegetales, las puroindolinas sólo se encuentran en las semillas de plantas de las tribus Triticae y Avenae. El papel de las proteínas de transferencia de lípidos en la calidad de los alimentos ha sido demostrado en la elaboración de cerveza. Esta proteína de cebada se convierte en una proteína espumosa después de modificaciones que aumentan su anfifilicidad: acilación y glicación, que ocurren durante el malteo. Las proteínas de unión a lípidos tienen una amplia gama de propiedades que pueden utilizarse en la selección de variedades vegetales, así como para características nutricionales y funcionales de productos alimenticios de origen vegetal (Didier *et al*., 2007).

Las vicilinas son proteínas relativamente hidrofóbicas en las que predominan aminoácidos como leucina, ácido glutámico, serina, asparagina y lisina. Han despertado interés por su efecto antimicrobial, su participación en la resistencia de semillas al ataque por insectos y como alérgeno presente en alimentos (Martínez *et al*., 2011). Una acumulación de vicilina se ha observado en la embriogénesis somática de papaya, así como de proteínas de embriogénesis tardía (Botini, *et al*., 2021), lo que indicaría la importancia de estas en el desarrollo de la semilla y el embrión. Las vicilinas son trímeros con subunidades que tienen una masa molecular de 45-55 kDa y frecuentemente están glicosiladas. Algunas subunidades 7S sufren rompimiento proteolítico y los péptidos resultantes pueden permanecer unidos por interacciones no covalentes (Martínez *et al*., 2011). Los hidrolizados de vicilinas de frijol

mungo mostraron actividad antioxidante, inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y actividad antiproliferativa de células cancerosas de mama (Gupta *et al*., 2018).

Las semillas están sujetas a cambios en el contenido de agua del suelo y este proceso promueve la movilización y síntesis de proteínas de reserva y proteínas de embriogénesis tardía, involucradas en la resistencia a estrés (Alvarado-López et al., 2018). En embriogénesis somática de papaya (*Carica papaya* L.) se observó un aumento progresivo en la acumulación de vicilina, proteínas abundantes de embriogénesis tardía y proteínas cloroplásticas que conducen a la maduración del embrión somático (Botini, et al., 2021). La falta de tolerancia a la desecación en la naturaleza recalcitrante de las semillas de *Quercus ilex* L. puede estar asociada con la represión de algunos genes; las proteínas de embriogénesis tardía serían uno de los candidatos, de acuerdo a Sghaier-Hammami et al., (2020). Las proteínas oleosinas estabilizan los cuerpos lipídicos en semilla y su ausencia parece aumentar el carácter recalcitrante de semillas; la ausencia de oleosinas llevó a la fusión de cuerpos lipídicos y a una pérdida en la integridad celular durante la imbibición de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) (Magnitskiy y Plaza, 2007). Los granos de polen tienen gran número de liposomas que sirven como almacén de energía para usarse a la hora de la germinación; las proteínas de superficie contribuyen a la estabilidad del liposoma en el polen de lirio (*Lillium longiflorum* Thumb). Esto ayuda a mejorar la viabilidad del polen, que está sometido a condiciones ambientales drásticas al ser transportado por los insectos o el viento (Barrow *et al*., 2012). Ampliar y profundizar el conocimiento de las proteínas que interactúan con lípidos puede permitir encontrarles aplicaciones novedosas.

Los cuerpos lipídicos han atraído el interés por su participación en la fabricación industrial de biodiésel y productos relacionados con lípidos de alto valor en organismos diversos, así como enfermedades humanas relacionadas con la obesidad y las interacciones huésped-patógeno (Ming-Der y Huang 2015; Huang y Huang, 2017). La fusión de un factor de crecimiento de fibroblastos humano con una oleosina de *Cartamus* produce un aceite que estimula la sanación de heridas y el crecimiento del pelo en ratones. Es un uso novedoso y atractivo para estas proteínas (Cai *et al*., 2018). Al parecer, la parte oleosina permite una mejor integración del factor de crecimiento con el aceite. Los liposomas han estimulado el interés de los investigadores por su posible uso como sistemas de transporte, ya sea en la industria farmacéutica o en la de los cosméticos. son estructuras esféricas que surgen espontáneamente cuando los lípidos se dispersan en un medio acuoso; su capacidad de encapsular principios activos de naturaleza diversa, su biodegradabilidad y falta de toxicidad han favorecido su utilización y búsqueda de nuevas aplicaciones; existe la posibilidad de estabilizar o mejorar propiedades de los liposomas agregando proteínas como las oleosinas o proteínas de carácter hidrofóbico (Torelló *et al*., 2002; Domazet-Lošo, 2022). La oleosina de aguacate PaOle1 es estable durante el proceso de maduración del fruto y está presente en todas las gotas de aceite del mesocarpio del fruto. Entre las diferentes variedades de aguacate, la abundancia de oleosinas está directamente relacionada con el contenido de aceite (Sánchez-Albarrán *et al*., 2021).

Las proteínas de membrana son difíciles de extraer y disolver en tampones acuosos y tienden a precipitar durante el enfoque isoeléctrico. La escasa abundancia de las proteínas de membrana es otro desafío para el estudio de estas. Por lo tanto, la adición de un paso de fraccionamiento subcelular o

bioquímico es esencial para una extracción exitosa. Es necesario un método muy estricto de enriquecimiento antes de la separación de proteínas (Vertommen, *et al*., 2010).

Cuando se usa el detergente Tritón X-114 a una temperatura por debajo del punto de nube para extraer las proteínas de la membrana, y la temperatura de esta mezcla se eleva luego por encima de 22 °C, las proteínas de membrana solubilizadas se separan en las dos fases formadas de acuerdo con su hidropatía. Las proteínas más hidrofóbicas tienden a concentrarse en la fase inferior, mientras que las proteínas más hidrofílicas aparecen principalmente en la fase superior. El Tritón X-114 es el detergente más usado para separar proteínas en un solo paso (González de la Vara y Lino-Alfaro, 2009). La hipótesis de este trabajo fue que mediante el uso del Tritón X-114 y aprovechando la separación de fases, sería posible separar y enriquecer las proteínas de semilla de carácter hidrofóbico, purificándolas para su mejor estudio (Yuan *et al*., 2020).

El objetivo de la investigación fue extraer, purificar y caracterizar proteínas hidrofóbicas de la almendra de la semilla de capulín *Prunus serotina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó semilla cruda seca y semilla tostada obtenida de Toluca, Estado de México. El fruto maduro es separado de la pulpa, lavada y secada la semilla o huesito para posteriormente tostarla y ofrecerla al consumidor. La semilla se molió por separado, la tostada y la cruda, en un mortero de porcelana hasta que se logró la consistencia de harina. Se pesaron 5 g de harina en un vaso de precipitado y se le agregaron 4 mL de la solución 2:1 cloroformo-metanol (v/v) por cada gramo de harina, se mantuvo en agitación durante 60 min, después se filtró la materia sólida y se secó a temperatura ambiente.

Se pesaron 200 µg de harina desgrasada de cada muestra para realizar las extracciones, se agregaron 200 µL 50 mM de Tris (6.8 pH), 180 µl de agua destilada, 12 µl Tritón X-114, se mezcló y se dejó en reposo por 12 h para así obtener por diferencia de densidades y separación de fases proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas. En el fondo y fase intermedia de encuentran proteínas hidrofóbicas, en el sobrenadante se encuentran proteínas hidrofílicas.

La columna con sefadex lipofílico (Lipophilic sephadex, Sigma-Aldrich), se empacó con 250 µL de resina; a continuación, se colocó la muestra de proteína en la resina previamente activada y se le agregó la solución eluyente (la cantidad de eluyente usado fue el doble del volumen de la muestra). Cada solución se puso en un tubo de 1.5 mL con proteína eluida; primero se puso acetonitrilo 100% (grado HPLC), luego Dimetil Sulfoxido al 50% (v/v, con agua) Dimetil Sulfoxido al 100%, y al final la solución de Tris 50 mM-Tween al 1%. Como es sabido, se agrega el eluyente y se espera a que salga de la columna con las proteínas que desprende de la resina.

Las fracciones proteicas obtenidas de las columnas de separación se corrieron en gel de poliacrilamida desnaturalizante (15%) teñido con Azul de Coomassie R-250 (Raya-Pérez *et al*., 2012). Las bandas de proteína que se enviaron para su identificación se cortaron con ayuda de un bisturí, marcándolas como: A, B y C, se cortó y envió una cuarta banda que no se pudo identificar. Por haber eluido de una columna de interacción hidrofóbica se asumió que son proteínas de carácter hidrofóbico y se cortaron las bandas que aparentemente no se traslaparon con otras bandas de otras proteínas. Se pusieron, cada una por separado, en tubos de microcentrífuga en solución Tris-NaCl 25

mM, pH 8 a 4 °C; la identificación se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) de Irapuato, donde se analizó con nanoflow LC system nanoacquity (Waters corp. Milford, MA, USA) coupled to a linear ion trap LTQ Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ion source. Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry LC-MS/MS (Martínez *et al*., 2011).

Tinción de proteínas con plata. Se colocó el gel de poliacrilamida en solución fijadora de ácido tricloroacético 10% (p/v); se sacó el gel de la solución fijadora y se realizaron 3 lavados con agua destilada durante 10 min cada uno, después se colocó el gel en 30 mL de una solución de 0.00012 g L^{-1} (tiosulfato de sodio) durante unos segundos. Se decantó la solución de tiosulfato de sodio y se agregó $AgNO_3$ 0.01% (p/v) en agua (se agrega una gota de la solución de tiosulfato de sodio que se preparó para el paso anterior) con agitación durante 15 min y posteriormente se reveló el gel con una solución de carbonato de sodio 3% (p/v) y formaldehido al 3% (v/v) hasta la aparición de bandas características de color marrón. La reacción se detuvo tratando el gel con ácido acético al 3% durante unos minutos. La tinción con nitrato de plata es mucho más sensible que la de azul de Coomassie para revelar las proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó la identidad de la secuencia A con 263 aminoácidos, indica identidad con una proteína de *P. pérsica* similar a la vicilina, con cobertura de 24.71%. La segunda o péptido B resultó una proteína hipotética de *P. pérsica* similar a las proteínas de embriogénesis tardía (proteína LEA). El tercero o péptido C tiene similitud con una proteína de transferencia de lípidos. Se logró la purificación de un péptido de 20 kDa, cuya tinción con plata apoya la idea de que fue purificado a homogenidad, dada la sensibilidad de esta tinción (Figura 3). El péptido A mostró un 100% de identidad con un péptido antimicrobiano similar a la vicilina de *P. persica* (Tabla 1) Las globulinas 7S o vicilinas son un grupo de proteínas de reserva de las semillas. El método de extracción con cloroformo /metanol tiene un sesgo hacia proteínas pequeñas, lo que en principio explicaría el que se hayan obtenido proteínas de baja masa molecular (Vertommen, et al., 2010). Se obtuvo el patrón electroforético de las proteínas de sobrenadante y de pastilla de semilla cruda, eluidas a partir de una columna de interacción hidrofóbica (Figura 1, 2). Esto permitirá conocer las masas moleculares de las distintas proteínas extraídas en cada fase.

Se encontraron 3 resultados con altos porcentajes de identidad; banda B con extensión de 100 aminoácidos (aproximadamente 10 kDa), 100% de similitud en el 26.00% de cobertura correspondiente al tamaño de la secuencia obtenida en relación a una proteína hipotética de *P. persica,* (prupe_6G280300); se encontró una proteína abundante similar a EMB564 en *P. mume* Siebold & Zucc., que se expresa en embriogénesis tardía y en el tercer resultado, con el 99% de similitud se encontró una proteína de embriogénesis tardía B19.3 de *P. pérsica*. Las que se expresan durante la embriogénesis tardía forman parte de un grupo de proteínas protectoras que actúan cuando la planta padece sequía o stress hídrico, mantienen la integridad de membrana y en general la integridad celular (Silva, 2016). La tolerancia a la desecación de las semillas podría estar asociada con la presencia de las proteínas de embriogénesis tardía, entre otras características (Sghaier-Hammami *et al*., 2020).

Tabla 1. Secuencias de los tres péptidos analizados.

SECCIÓN DE CORTE "A" SECUENCIA
MATMTKAELP LLVLFLSTLL LATSPSARAQ VTCEEGCYSI SDQSKVGECL QMCSSHGQSC EDRCMREARW PQQQEQCLRM CRQQEQGHHL PCREQCIRSP DREMCERACQ QQQGQGGGRQ CLQQCKMITR DPRERLKCVR TCMQGQQQGV FQGQQQQQQV EQQCRQHCQS ERDPMRQQEC QEYCVGQMMQ QEYEQQCRSR CQWERPRREQ QEQCQEECTE KIRQLEQCQG GCKMQGQYGP QQQECQRMCR EQFEQGQGIR MVA
SECCIÓN DE CORTE "B" SECUENCIA
MASEKMDPQK RRELDEKARK GEVVIPGGTG GKSLEAQEHL AEGRSRGGQT RKNEIGHEGY HEMGKKGGLS TTDKSGGERA AEEGIPLDES KYKTNGRSNE
SECCIÓN DE CORTE "C" SECUENCIA
MANSGAPMKV AVLMLLMCMV MAQAVIPCSR VSQYVGPCIS YLKTGGAVPV PCCNGIRSLI GLAGTTPDRQ GVCRCLVATA KSITGIKGEL VSGLPRACNV RLPYPIGPNV DCNRIH

La secuencia de la banda "C", con 116 aminoácidos, se alineó con una proteína hipotética de *P. persica.* Se encontraron, usando toda la secuencia de 116 aminoácidos, altos porcentajes de identidad al 100% y cobertura del 27.59%; se identificó una proteína que participa en el transporte de lípidos en *P. dulcis* (Mill.) D.A.Webb., que se ha relacionado con la regeneración de brotes adventicios. También se encontró homología con proteínas de transferencia no específica de lípidos de *P. persica*, *P. mume* y *P. avivum* L. Las proteínas de transferencia de lípidos son proteínas ricas en cisteína con masa molecular de 10-12 kDa (Didier *et al*., 2007).

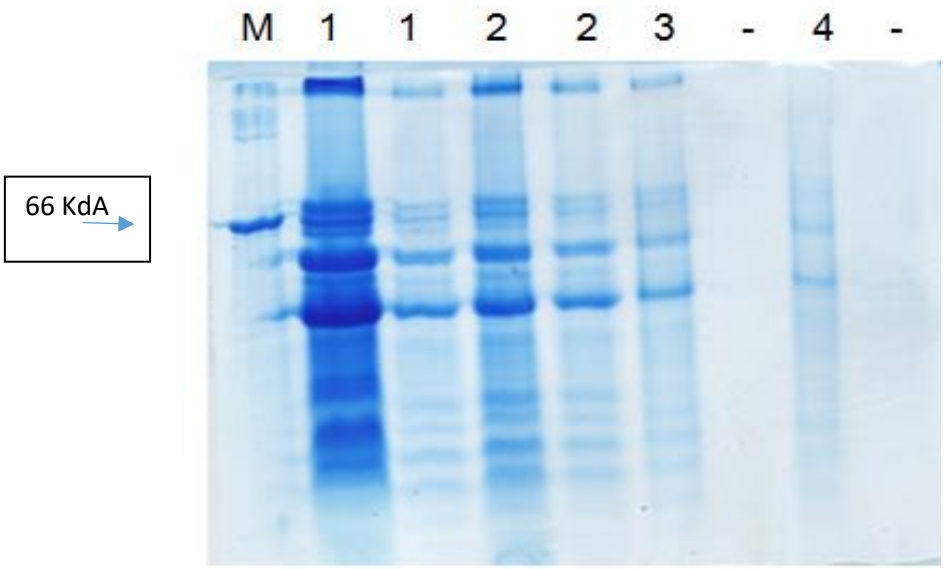


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE de sobrenadante de semilla cruda, eluidas a partir de una columna de interacción hidrofóbica. Carril M, (marcador); carril 1, proteínas eluidas con acetonitrilo 100%; carril 2, proteínas eluidas con DMSO 50%; carril 3, proteínas eluidas con DMSO 100%; carril 4, proteínas eluidas con Tris-Tween 1%.

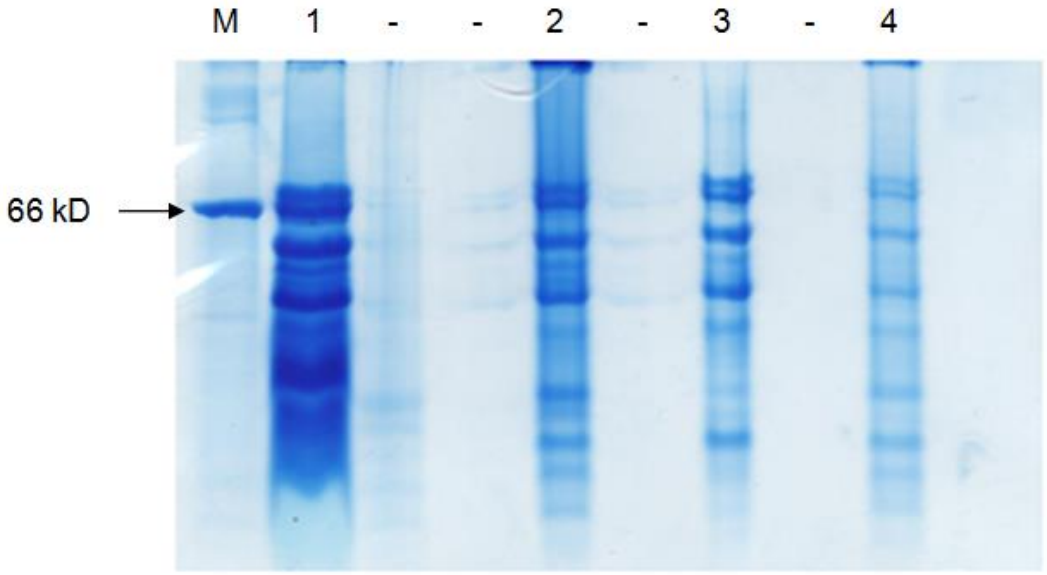


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de pastilla de semilla cruda, eluidas de una columna de interacción hidrofóbica. Carril M, marcador; Carril 1, proteínas eluidas con 100% Acetonitrilo; carril 2, proteínas eluidas con 50% DMSO; carril 3, proteínas eluidas con 100% DMSO; carril 4, proteínas eluidas con 1% Tris-Tween.

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares compuestos por proteínas y lípidos que transportan grasas por todo el organismo. En los geles (Figura 1 y 3) se muestran los patrones proteicos de las proteínas extraídas de las semillas. En la palma de aceite se han encontrado también proteínas de alto peso molecular junto con el aceite. El patrón electroforético de proteínas de cuerpos lipídicos en maíz (Tzen *et al*., 1990) muestran la presencia de tres bandas de un peso molecular aproximado de 65 kDa, algo semejante a lo mostrado en este trabajo (Figuras 2 y 3).

Las secuencias presentadas por Tzen *et al*. (1990) no parecen guardar similitud con las presentadas en este trabajo. El aislamiento de la proteína pura y de las proteínas de la separación de fases del detergente ayudará a profundizar sobre el papel de estas proteínas y su posible uso en la industria alimentaria y farmacéutica, entre otras.

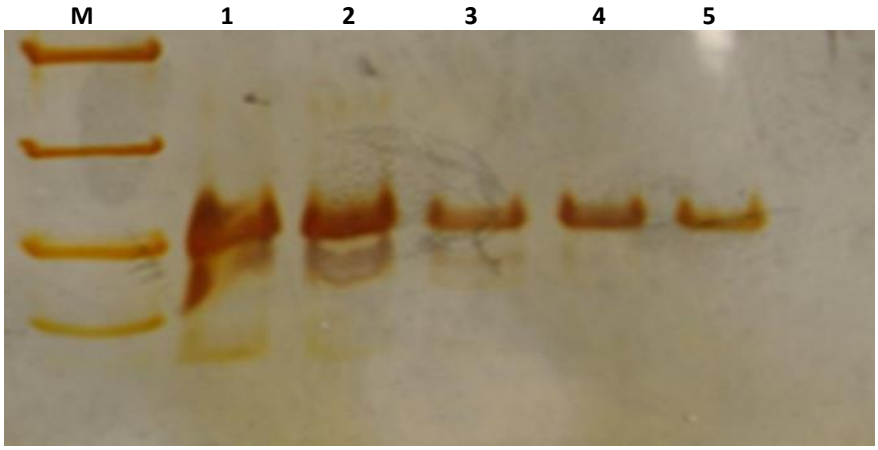


Figura 3. Proteínas de "pastilla" de semilla tras purificación a través de columna de interacción hidrofóbica eluidas con 25mM Tris-NaCl pH 8. Carril M, marcador de peso molecular; carriles 1-5, proteínas eluidas de diferentes fracciones, carril 4 y 5 aparentemente purificadas a homogeneidad.

Conclusiones

Se logró la separación de tres proteínas de semillas oleaginosas (*Prunus serotina*) con base en la solubilidad en las fases obtenidas con detergente. Se obtuvieron los patrones electroforéticos de sobrenadante y pastilla de los cuerpos lipídicos. Por comparación en la base de datos, se determinó la identidad de tres proteínas de semilla, correspondientes a dos proteínas de acumulación durante la fase tardía de la embriogénesis y una más relacionada con el transporte de lípidos, con posible participación en el desarrollo de brotes adventicios. Se logró la purificación a homogeneidad de una proteína de bajo peso molecular.

Agradecimientos.

Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el apoyo otorgado. A los revisores por sus valiosas sugerencias.

Referencias

Alvarado-López, S., X. Gómez-Maqueo, D. Soriano, A. Orozco-Segovia, A. Gamboa-deBuen. (2018). *Mobilization and synthesis of seed storage and LEA proteins during natural priming of Buddleja cordata* and *Opuntia tomentosa*. Botanical Sciences *96(1): 76-83.* doi.org/10.17129/botsci.1499

Barrow, J. R., Lucero, E., Aaltonen, M., Ronald, E., Osuna-Ávila, P. 2012. Relationship between plant lipids bodies and fungal endophytes. Terra Lat. 30(1):39-45. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57324651005

Botini, N., Astolpho-Almeida, F., Zaira-Camacho, K., Cruz, M., Souza-Reis, R., Moura-Vale, E., Garcia, A. B., Santa-Catarina, C., Silveira, V. 2021. *Stage-specific protein regulation during somatic embryo development of Carica papaya* L. *'Golden*'. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. 2021 Feb;1869(2):140561

Cai, J., Ruicheng, Wen, Wenqing Li, Xiuran Wang, Haishan Tian, Shanyong Yi, Linbo Zhang, Xiaokun Li, Chao Jiang y Haiyan Li. 2018. *Oil body bound oleosin-rhFGF9 fusion protein expressed in safflower (Carthamus tinctorius L.) stimulates hair growth and wound healing in mice.* BMC Biotechnology 18:51. https://doi.org/10.1186/s12896-018-0433-2

Didier Marion, Bénédicte Bakan, Khalil Elmorjani. 2007. *Plant lipid binding proteins: properties and applications*. Biotechnology Advances 25: 195–197. Doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.003

Domazet-Lošo, T. 2022. mRNA Vaccines: Why Is the Biology of Retroposition Ignored? Genes 13, 719. https://doi.org/10.3390/genes13050719

Frandsen, G.I., Mundy, J., Tzen, J.T.C. 2001. *Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin.* Physiologia Plantarum 112:301-307.

Fresnedo-Ramírez, J., Segura, S., y Muratalla-Lúa, A. 2011. *Morpho variability de capulín (Prunus serotina) En la región centro-occidental de México desde una perspectiva de recursos fitogenéticos.* Recursos genéticos y la evolución de los cultivos. 58 (4), 481-495. doi: 10.1007 / s10722-010-9592-2.

García-Aguilar, L., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, J.I., Vázquez-Landaverde, P.A., Luna-Vázquez, F.J., y Zavala-Sánchez, M.A. 2015. Nutritional Value and Volatile Compounds of Black Cherry (Prunus serotina) Seeds. Molecules 20, 3479-3495; doi:10.3390/molecules20023479

González de la Vara, L.E. y Lino-Alfaro, B. 2009. *Separation of membrane proteins according to their hydropathy by serial phase*

partitioning with Triton X-114. Anal. Biochemistry 387:280-286.

Gupta N., Srivastava N., Bhagyawant, S.S.2018. *Vicilin—A major storage protein of mung bean exhibits antioxidative potential,antiproliferative effects and ACE inhibitory activity*. PLoSONE 13(2):e0191265.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191265

Guzmán, FA., Segura-Ledesma S.F., Almaguer-Vargas, G. 2020. El capulín (*Prunus serotina* Ehrh.): árbol multipropósito con potencial forestal en México. Madera y Bosques 26(1):1-15.https://doi.org/10.21829/myb.2020.2611866

Huang, C.Y. y Anthony H.C. Huang.2017. *Unique motifs and length of hairpin in oleosin target the cytosolic side of endoplasmic reticulum and budding lipid droplet*. Plant Physiology 174:2248-2260. DOI:10.1104/pp.17.00366

Hurtado, H.N. y Pérez, M.2013. *Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante de las Antocianinas Aisladas de la Cáscara del Fruto de Capulí* (*Prunus serotina* sp *capuli* (Cav) Mc. Vaug Cav). Información Tecnológica. 25 (4): 131-140. Doi: 10. 4067/S0718-07642014000400015.

Martínez P., Marta Lucía Pabón, Diego Armando Gómez, Sonia Luz Albarracín.2011. *Purificación y determinación de carbohidratos en la vicilina de Canavalia ensiformis*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 40 (1), 5-26.

Magnitskiy, Stanislav V.; Plaza, Guido A. 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales Agronomía Colombiana 25 (1):96-103. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316240011

Ming-Der Huang and Anthony H.C. Huang. 2015. *Bioinformatics reveal five lineages of oleosins and the mechanism of lineage evolution related to structure/function from green algae to seed plants*. Plant Physiology 169:453-470.

Raya-Pérez, J.C., Aguirre-Mancilla C.L., Tapia-Aparicio R., Ramírez-Pimentel J.G. y Covarrubias-Prieto J. 2012. Caracterización de las proteínas de reserva y composición mineral de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). Polibotánica 34:223-235. https://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n34/n34a11.pdf

Sánchez-Albarrán F., Suárez-Rodríguez, L.M., Ruíz-Herrera, L.F., López-Meza J.E. y López-Gómez, R. 2021. Two oleosins expressed in the mesocarp of native mexican avocado, key genes in the oil content. Plants Foods for Human Nutrition 76:20-25. Doi: 10.1007/s11130-020-00868-2

Sghaier-Hammami B., Hammami S. B.M., Baazaoui, N., Gómez-Díaz, C. y Jorrín-Novo J. V. 2020. *Dissecting the Seed Maturation and Germination Processes in the Non-Orthodox Quercus ilex Species Based on Protein Signatures as Revealed by 2-DE Coupled to MALDI-TOF/TOF* Proteomics Strategy. Int. J. Mol. Sci. 21: 4870-4896. doi:10.3390/ijms21144870

Torelló, M., Viscasillas, A., y del Pozo, A. 2002. Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. Offarm 21(9):188-190. https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13038745

Tzen, J.T., Yiu-Kay Lai, Kwai-Lan Chan, and Anthony H. C. Huang.1990. *Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species*. Plant Physiology 94:1282-1289.

Vertommen A., Panis, B., Swennen, R., Carpentier, S.C. 2010. *Evaluation of chloroform/methanol extraction to facilitate the study of membrane proteins of non-model*

plants. Planta 231:1113-1125. doi:10.1007/s00425-010-1121-1

Yuan Ma, M Luo, y Xu, Y Liu, X Liu, X Bi, Y Yuan, F Su, X yin. 2020. Purification and characterization of a thaumatin-like protein-1 with polypehnol oxidase activity found in *Prunus mume*. RSC Advances 48:28746-28754. Doi: 10.1039/d0ra05659f