



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República (PROPAC)

“Caracterización fisicoquímica y estudio de las propiedades estructurales y tecnofuncionales del aislado proteico del subproducto de la extracción de aceite de semillas de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber)”

TESIS

Que como parte de los
requisitos para obtener el grado
de

Maestro en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

PRESENTA

IBT. Daniel Alberto Mendoza García

DIRIGIDA POR

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Santiago de Querétaro, Querétaro, MARZO 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Caracterización fisicoquímica y estudio de las propiedades estructurales y tecnofuncionales del aislado proteico del subproducto de la extracción de aceite de semillas de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber)”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBT. Daniel Alberto Mendoza García

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Presidente

Dr. Juan Alberto Resendiz Vazquez

Secretario

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Vocal

M. en C. María del Carmen Cortez Trejo

Suplente

Dra. María de la Luz Reyes Vega

Suplente

Centro Universitario, Santiago de Querétaro, Querétaro. Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (Febrero 2022) México.

RESUMEN

Se evaluaron las propiedades estructurales y tecnofuncionales del aislado proteico del subproducto de la extracción de aceite de semillas de calabaza de *Cucurbita argyrosperma* Huber. Se obtuvo el aislado proteico de semillas de calabaza (APSC) mediante precipitación por punto isoeléctrico (PI). La mínima solubilidad del aislado (PI) se observó a pH 5. La fracción mayoritaria en el aislado proteico fueron las glutelinas con 59.47 %. En cuanto a su patrón electroforético (SDS-PAGE) se evidenció la presencia de puentes de disulfuro y se identificaron proteínas características del género *Cucurbita spp.* como la albumina 2s y la globulina 11s. Los resultados de hidrofobicidad superficial mostraron que el valor más alto se presentó a pH 3, mientras que a pH 7 y 9 se observaron valores más bajos. El análisis de deconvolución de la banda amida I de los espectros de FTIR demostró que la estructura secundaria predominante en el APSC a pH 3, 7 y 9 es la hoja- β . Por otra parte, los resultados de los ensayos de propiedades tecnofuncionales indicaron que la capacidad de absorción de agua y aceite fueron similares para los tres pH evaluados; la capacidad emulsionante del APSC a pH 9 presentó el valor más alto, 137.67 ± 1.25 %, mientras que los valores mayores de capacidad y estabilidad emulsionante se presentaron a pH 3 con $61.13\% \pm 1.27$ y $60.83\% \pm 3.20$, respectivamente. El valor más alto de capacidad de espuma fue encontrado a pH 9 ($30.33\% \pm 0.58$), mientras que la mayor estabilidad de espuma se encontró en pH 7 ($64.04\% \pm 1.79$). Por último, la concentración mínima gelificante del APSC fue de 17%, 18% y 15% a pH 3, 7 y 9, respectivamente.

De acuerdo con los resultados de composición proximal y características fisicoquímicas, estructurales y tecno-funcionales, el aislado proteico del subproducto de la extracción de aceite de semillas de calabaza puede ser una nueva fuente de proteína con potencial para diferentes aplicaciones alimentarias.

Palabras clave: *Cucurbita argyrosperma* Huber, semillas de calabaza, aislado proteico, estructura, propiedades tecnofuncionales.

ABSTRACT

The structural and technofunctional properties of the protein isolate from the by-product of *Cucurbita argyrosperma* Huber pumpkin seed oil extraction were evaluated. Pumpkin seed protein isolate (PSPI) was obtained by isoelectric point precipitation. The minimum solubility of the isolate (PI) was observed at pH 5. The major fraction in the protein isolate was glutelin with 59.47%. Regarding its electrophoretic pattern (SDS-PAGE), the presence of disulfide bonds was evidenced and characteristic of proteins from the genus *Cucurbita spp.* such as 2s albumin and 11s globulin. The results of surface hydrophobicity showed that the highest value was presented at pH 3, while at pH 7 and 9 lower values were observed. Amide I band deconvolution analysis of FTIR spectra demonstrated that the predominant secondary structure in PSPI at pH 3, 7 and 9 is β -strand. On the other hand, the results of the techno-functional property tests indicated that the water and oil absorption capacity were similar at the three evaluated pH; the emulsifying capacity of the PSPI at pH 9 presented the highest value, 137.6 ± 1.25 %, while the highest values of emulsifying capacity and stability were presented at pH 3, with $61.13\% \pm 1.27$ and $60.83\% \pm 3.20$, respectively. The highest foam capacity value was found at pH 9 ($30.33\% \pm 0.58$), while the highest foam stability was observed at pH 7 ($64.04\% \pm 1.79$). Finally, the least minimum gelation of PSPI at pH 3, 7 and 9 was 17%, 18% and 15%, respectively.

In view of the proximal composition and the physicochemical, structural, and techno-functional characteristics, the protein isolate from the by-product of pumpkin seed oil extraction can be a new source of protein that has potential to be used in different food applications.

Keywords: *Cucurbita argyrosperma* Huber, pumpkin seeds, protein isolate, structure, techno-functional properties.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se desarrolló y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Daniel Alberto Mendoza García

Nombre y firma del estudiante

DEDICATORIAS

A dios

Por haberme permitido recorrer esta travesía y llegar hasta este punto, por ponerme alrededor de grandes personas durante todo este tiempo y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad, amor y fe para mi alma y corazón.

A mis padres

Por haberme brindando un apoyo incondicional, por darme la facilidad de escoger el camino que estoy creyente en ser, y reconocerlos como los mejores padres que pude tener.

Al resto de mi familia

*A mis hermanas, a mi abuela, a mis tíos, a mis tías, a mis primos... pero en especial a mi tía **Martha García Rendón** y mi tío **Fernando Ramírez Vera**. Qué, aunque los vea poco, siempre los considerare como mis otros padres. Gracias por todo por su amor, sus consejos, y por enseñarme como hacer las cosas desde mi infancia. También a **primo Juan Adolfo Ramírez García** por todas esas tardes en el gimnasio, por enseñarme cada vez más lo que es la vida, eres el hermano que nunca pude tener.*

A todos mis maestros

*Por brindar su invaluable conocimiento durante todas las clases, por hacerme enamorarme del estudio, y de su interminable conocimiento que me ofrecieron en cada una de las materias brindadas durante todo este lapso de mi vida. En especial a la **M. en C. Diana Montserrat Aguilar** y al **Dr. Carlos Hernán Herrera Méndez**, ustedes han marcado mi vida estudiantil.*

A mis amigos

Porque en los momentos importantes siempre estábamos para ayudarnos mutuamente y aunque muchas veces no compartimos más momentos, los pocos quedan marcados.

A mi novia

*Dedicatoria especial a mi novia **María Fernanda Delgado Belman**, por hacerme ver la vida de otra manera. Por motivarme a ser mejor persona cada día, eres mi mayor inspiración.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo como becario en el transcurso de la maestría incorporada en el Padrón del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

A mi familia, por haberme brindado su apoyo durante mi estancia académica en la Universidad Autónoma de Querétaro.

De manera especial a mi tutora de tesis **Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz** por aceptarme en su grupo de trabajo, por su tolerancia, paciencia y su pasión por el conocimiento que me transmitió, por ser una persona que admiro y un ejemplo a seguir en mi vida.

De igual forma, a mi sínodo de tesis **Dr. Juan Alberto Resendiz Vazquez**, por brindarme su apoyo en cualquier momento para llevar a cabo de manera exitosa esta tesis, agradezco también infinitamente por su amistad y todos los consejos dados en lo profesional y en lo personal, porque más que un colega, yo lo considero como un amigo y un padre en lo profesional.

A la **M. en C. María del Carmen Cortez Trejo** por todas las sugerencias, comentarios y consejos a lo largo de la maestría. La admiro y tengo un respeto infinito, puesto que, siempre era consciente de todos los temas tratados en el grupo académico y en la forma de realizar su trabajo, que la hacen sobresalir bastante.

A mis demás profesores y sínodos, por trasmitirme sus enseñanzas, conocimientos, su forma de ver la vida y darme las herramientas necesarias para poder culminar mi vida académica en esta nueva etapa.

A mis compañeros y amigos por haber pasado tanto tiempo juntos y complementarnos unos a los otros. A Adolfo por su ayuda en el laboratorio. A Raquel, por su compañía y consejos en el laboratorio. Y en especial a Ana y Abel, por su amistad, su apoyo y ayuda a lo largo de la maestría.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	i
Abstract.....	ii
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
1 Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 Generalidades de la calabaza y su semillas	2
2.2 Composición de la semillas de calabaza	5
2.3 <i>Cucurbita Argyrosperma</i>	3
2.4 Propiedades de las proteína de semillas de calabaza.....	8
2.5 Propiedades benéficas para la salud (compuestos nutraceuticos)	4
2.6 Aislados proteicos	9
2.7 Propiedades tecnofuncionales de las proteínas vegetales	11
2.7.1 Capacidad de absorción de agua (CAA)	11
2.7.2 Capacidad de absorción de aceite (CAAc).....	12
2.7.3 Capacidad y estabilidad espumante.....	13
2.7.4 Propiedades emulsionantes.....	14
2.7.5 Gelificación	15
2.8 Aplicación en los alimentos	16
3 Justificación.....	18
4 Objetivos	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5 Material y métodos.....	20
5.1 Preparación de la muestra	20
5.2 Obtención del aislado proteico de semillas de calabaza (APSC).....	20
5.3 Obtención de las fracciones proteicas	20
5.4 Cuantificación de proteína	21
5.5 Caracterización Fisicoquímica	22
5.5.1 Caracterización proximal del APSC.....	22
5.5.2 Perfil de solubilidad	22
5.5.3 Determinación del color	22
5.6 Caracterización Estructural	23

5.6.1	Análisis de aminoácidos.....	23
5.6.2	Perfil electroforético del aislado proteico.....	23
5.6.3	Hidrofobicidad superficial (H ₀ -ANS)	24
5.6.4	Propiedades térmicas.....	24
5.6.5	Espectroscopía FTIR.....	25
5.7	Propiedades tecno-funcionales.....	25
5.7.1	Capacidad de absorción de agua (CAA)	25
5.7.2	Capacidad de absorción de aceite (CAAc).....	25
5.7.3	Capacidad emulsificante	26
5.7.4	Actividad y estabilidad emulsificante	26
5.7.5	Capacidad mínima gelificante (CMG)	27
5.7.6	Capacidad y estabilidad espumante.....	27
5.8	Análisis estadístico.....	27
6	Resultados y discusión	28
6.1	Caracterización fisicoquímica.....	28
6.1.1	Rendimiento del proceso de obtención de APSC.....	28
6.1.2	Composición químico-proximal y cuantificación proteica del APSC por Bradford. 28	
6.1.3	Fraccionamiento proteico.....	28
6.1.4	Perfil de solubilidad de APSC.....	30
6.1.5	Análisis de color.....	31
6.2	Caracterización estructural.....	34
6.2.1	Análisis de aminoácidos.....	34
6.2.2	Perfil electroforético del APSC.....	36
6.2.3	Patrón electroforético de las fracciones del APSC.....	37
6.2.4	Hidrofobicidad superficial (H ₀ -ANS)	39
6.2.5	Propiedades térmicas.....	41
6.2.6	Espectroscopía FTIR.....	44
6.3	Propiedades tecno-funcionales.....	47
6.3.1	Capacidad de absorción de agua (CAA) y de aceite (CAAc)	47
6.3.2	Capacidad emulsificante (CE).....	49
6.3.3	Actividad emulsionante (AE) y estabilidad emulsionante (EE).....	51
6.3.4	Capacidad mínima gelificante (CMG)	53
6.3.5	Capacidad espumante (CEs) y estabilidad espumante (EEs)	54
7	Conclusiones	57

8	Bibliografía.....	58
9	Anexos.....	67
	Anexo I. Curva de Calibración de BSA para cuantificación por el método de Bradford	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis proximal de <i>Cucurbita ssp.</i>	6
Tabla 2. Porcentaje de componentes bioactivos en semillas de calabaza <i>Cucurbita ssp</i> (g/ 100 g)	7
Tabla 3. Componentes antinutricionales en semillas de calabaza <i>Cucurbita ssp.</i>	8
Tabla 4. Fracciones proteicas de APSC.....	29
Tabla 5. Parámetros de color de HDSC y APSC a diferentes pH	33
Tabla 6. Composición de aminoácidos (mg/ 100 mg de proteína) del aislado proteico de semillas de calabaza.....	35
Tabla 7. Efecto del pH en las propiedades térmicas del aislado proteico de semillas de calabaza.	42
Tabla 8. Efecto del pH en la estructura secundaria del APSC.....	45
Tabla 9. Capacidad de absorción de agua, aceite y capacidad emulsificante del aislado proteico de semillas de calabaza.....	49
Tabla 10. Comportamiento gelificante del aislado de APSC a diferentes concentraciones de proteína y niveles de pH.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de calabaza de <i>Cucurbita ssp</i> : A) con cáscara y B) sin cáscara.....	3
Figura 2. Fruto y semillas de <i>C. argyrosperma</i>	4
Figura 3. Curva de solubilidad proteica (SP%) del APSC	30
Figura 4. Patrón electroforético del aislado proteico de semillas de calabaza	37
Figura 5. Perfiles de SDS-PAGE de las fracciones proteínicas del APSC en condiciones no reductoras línea 1-4 (-) y reductoras 1-4 (+).	39
Figura 6. Hidrofobicidad superficial (H_0 -ANS) de aislados de proteína de semillas de calabaza	41
Figura 7. Termogramas de DSC del aislado proteico de semillas de calabaza a tres pH: pH 3 (a), pH 7 (b) y pH 9 (c).....	43
Figura 8. Espectro de FTIR del APSC en tres pH (3, 7 y 9).	45
Figura 9. Análisis de deconvolución de la banda amida I del espectro de APSC a diferente pH (3, 7 y 9).....	47
Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad (AE) y estabilidad emulsionante (EE) del aislado proteico de semillas de calabaza.....	53
Figura 11. Efecto del pH sobre la capacidad (CEs) y estabilidad (EEs) espumante del APSC.....	56

1 INTRODUCCIÓN

En años recientes, la necesidad de obtener alimentos con alto valor nutritivo a partir de nuevas fuentes y de reducir los desechos agroindustriales, ha generado un gran interés en el estudio de diferentes partes de vegetales que hoy en día se consideran desechos, pero que poseen alto valor nutricional y con potencial para su uso en el desarrollo de ingredientes alimentarios. Uno de estos vegetales son las calabazas (*Cucurbita ssp.*) las cuales se cultivan en zonas templadas y regiones subtropicales (Jiao *et al.*, 2014) y se referencian como una fuente de alto valor nutritivo por su elevado contenido de carbohidratos, fibra soluble, proteína, aceite, β caroteno, criptoxantina y luteína (Rössel *et al.*, 2018).

Las semillas de calabaza generalmente se consideran desechos agroindustriales, aunque en algunas partes del mundo incluyendo México se consumen crudas, asadas o cocidas (Peiretti *et al.*, 2017). Se ha reportado que el consumo de semillas de calabaza tiene efectos anticolesterolémicos, antioxidantes, anticancerígenos y antiinflamatorios (Wang *et al.*, 2017).

Las semillas de calabaza tienen una concentración promedio de lípidos de 35 a 45%, por lo que se les utilizan en la producción de aceite comestible (Jiao *et al.*, 2014). Su composición de ácidos grasos comprende principalmente ácidos oleico (23.9%) y linoleico (53.3%) (Rojas *et al.*, 2019). Además, su contenido de proteína varía entre el 24.5 y 36% (Bučko *et al.*, 2015).

Con respecto a la fracción proteica, se ha reportado que la solubilidad de las proteínas de semillas de calabaza es inferior al 20% a un pH <5, mientras que aumenta hasta un 80% a valores de pH mayores de 7 (Rezig *et al.*, 2013). No obstante, los estudios sobre las propiedades fisicoquímicas, tecnofuncionales y estructurales de las proteínas de semillas de calabaza son escasos, lo cual impide su uso e industrialización. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es caracterizar el aislado proteico del subproducto de la obtención de aceite de semillas de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber) mediante análisis fisicoquímico, propiedades tecnofuncionales y análisis estructural. La caracterización del aislado proteico de semillas de calabaza permitirá determinar sus aplicaciones en el área de alimentos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la calabaza y sus semillas

Las calabazas pertenecen al género *Cucurbita* y se cultivan ampliamente en todo el mundo como hortalizas. En México, se cultivan cuatro de las cinco especies domesticadas (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita ficifolia* y *Cucurbita argyrosperma*), mientras que otras once especies se encuentran en estado silvestre (Rössel *et al.*, 2018). Las calabazas son autóctonas del continente americano y se cultivan generalmente en el sistema denominado milpa y han sido cultivadas por milenios, debido que, sus frutos son una excelente fuente en carbohidratos y vitaminas, y sus semillas con ricas en aceites y proteínas. En cuanto a su utilización gastronómica la calabaza ha sido utilizado en platillos como en guisos, sopas, cremas, dulces y repostería, por sus flores, pulpas y semillas que son ampliamente consumidas.(CONABIO, 2012).

México es un productor importante de este vegetal, obteniendo una producción de 133 334.96 Ton, siendo Zacatecas, Guerrero y Campeche los estados con mayor producción de semillas de calabaza (Rössel *et al.*, 2018) donde de acuerdo con la producción nacional, se estima que los residuos generados de semillas de calabaza son de alrededor de 15 653.52 Ton/año.

Las semillas de calabaza tienen diversas formas incluidas las elípticas, orbiculares y ligeramente aplanadas y tienen un color característico verde oscuro debido a la presencia de protoclorofilas. Pueden estar encerradas en una cáscara de color amarillo-blanco, aunque algunas calabazas producen semillas sin cáscaras (Krimmer-Malešević *et al.*, 2011), como se muestra en la Figura 1.

La calabaza se procesa para la obtención de calabaza enlatada o en mezclas para pasteles, mientras que sus semillas suelen consumirse como bocadillos tostados y salados. Las semillas tienen un sabor característico y son abundantes en el vegetal. Aunque generalmente se les considera residuo agrícola, se aprovechan para extraer aceite, el cual suele extraerse por prensado en frío o destilación al vapor y ha emergido como competidor del aceite de oliva. El aceite de semillas de calabaza se utiliza en la preparación de muchas delicias epícolas, tales como: chocolate, barra de cereal, pan, pastel, muffins, sopa, pesto, estofado y guarnición de pasta (Patel, 2013).

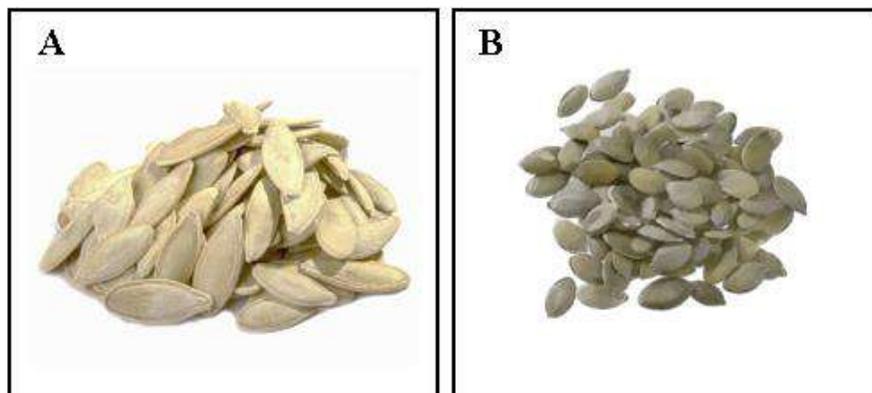


Figura 1. Semillas de calabaza de *Cucurbita ssp*: A) con cáscara y B) sin cáscara.

2.2 *Cucurbita argyrosperma*

Es una de las especies del género *Cucurbita* y se le conoce de diferentes formas, tales como: calabaza criolla, X-top en la cultura maya, calabaza pipiana y actualmente como calabaza chihua. De acuerdo con la evidencia arqueológica, geográfica, lingüística y cultural indican que la *Cucurbita argyrosperma* se desarrolló en el sureste mexicano hasta Centroamérica hace más de 7000 años (Azurdia, 1999; Lira, 1995). Por otra parte, no hay mucha evidencia sobre datos de su distribución fuera de América, debido a que son muy escasos y no hay certeza de que esta especie hubiese sido cultivada en el Viejo Mundo ni tampoco fuera de su área de domesticación (Lira y Montes, 1994).

Hoy en día esta especie es cultivada principalmente en la península de Yucatán. Su fruto es principalmente empleado para la obtención de sus semillas, puesto que, son relativamente grandes (Figura 2). No obstante, tanto las flores, los brotes y los frutos jóvenes y maduros son consumidos como vegetales. Las semillas son consumidas enteras, tostadas o rostizadas y son el ingrediente principal de salsas empleadas en comidas tradicionales (papadzules y el pipián) y tienen un alto valor nutricional dada su elevado contenido de aceite y proteína. De manera cultural, en la península de Yucatán, la pulpa del fruto se emplea en la medicina tradicional para tratar quemaduras, heridas y erupciones de la piel, mientras que las semillas son empleadas como anestésico, para estimular la producción de leche en las mujeres lactantes, y como antihelmíntico (Lira y Montes, 1994).



Figura 2. Fruto y semillas de *C. argyrosperma*

2.3 Propiedades benéficas para la salud (compuestos nutraceuticos)

Las semillas de calabaza han sido utilizadas para tratar ciertas enfermedades (cardiovasculares, cáncer, parasitosis) debido a que representa una excelente fuente de compuestos nutraceuticos que exhiben efectos farmacológicos y beneficios a la salud (Lestari y Meiyanto, 2018). Se ha demostrado en estudios *in vitro*, *in vivo* y preclínicos que el aceite de semillas de calabaza tiene un amplio espectro de actividades biológicas sorprendentes. Así mismo, la presencia de un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados, esteroides y tocoferol lo convierten en un excelente producto que podría prevenir algunas enfermedades (Patel, 2013).

Chester *et al.* (2017), en ensayos clínicos en humanos, encontraron que el extracto metanólico de semillas de calabaza (*C. pepo*) puede usarse como tratamiento alternativo o adyuvante para los cálculos renales. Estos autores atribuyeron esta actividad antiurolítica a compuestos fitoquímicos presentes en las semillas de calabaza, tales como: beta-tocoferol, estigmasterol y escualeno.

Por su parte, Sharma *et al.* (2013) evaluaron el efecto antidiabético y antihiperlipidémico del extracto de las semillas de calabaza (*Cucurbita máxima*) obtenido por éter de petróleo y acetato de etilo, encontrando que una dosis de 200 mg/kg i.p. por 21 días en ratas albinas

produce una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo respecto al control (glibenclamida 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Cabe resaltar que dietas altas en semillas de calabaza han presentado capacidad anticancerígena debido a que se ha identificado que reduce los riesgos de cáncer por la gran cantidad de carotenoides que contienen (Syed, 2019), promoviendo así una alta actividad antioxidante e impulso de la respuesta inmune humoral mediada por células (Durante, Lenucci y Mita, 2014). Además, cabe señalar que Medjakovic *et al.* (2016) llevaron a cabo una investigación con extracto de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) para la inhibición de células hiperplásicas y cancerosas. En dicho estudio se realizaron pruebas de viabilidad celular con células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de adenocarcinoma colorrectal y una línea celular hiperplásica del tejido de hiperplasia prostática benigna, obteniendo una inhibición del crecimiento celular de 40 a 50 % para todas las líneas celulares.

2.4 Composición de las semillas de calabaza

Los principales componentes nutricionales de las semillas de calabaza son proteínas (30–51%) y aceite (hasta 40%). Contiene carbohidratos (hasta 10%) y micronutrientes (entre 4 y 5%). Sin embargo, esta relación no debe considerarse siempre la misma, puesto que, las diferencias en la composición química de las semillas de calabaza entre las especies de *Cucurbita* y los cultivares de diferentes partes del mundo pueden estar relacionadas con las condiciones de crecimiento, fertilización y con el tiempo de cosecha (Srbinska *et al.*, 2012).

Alfawaz, (2004) reportó para semillas de *Cucurbita máxima* 5.97% de contenido de humedad, 4.59% de cenizas, 39.25% de proteína cruda, 27.83% de lípidos, y 16.84% de fibra cruda. De igual manera, Shahangir (2015) determinó la composición nutricional de las semillas de calabaza (*Cucurbita maxima*) obteniendo un porcentaje de lípidos de 36.70%, proteínas 34.56%, fibra cruda 2.91%, humedad 4.06%, cenizas 3.87%, azúcares 1.08 % y almidón del 2.15%. En otro estudio Ogradowska *et al.* (2017) encontró que las semillas sin cáscara contienen aproximadamente el 38.67% de grasa y las semillas desnudas el 44%. Además, el intenso color del aceite de semilla de calabaza se atribuye a su alto contenido de carotenoides y clorofilas.

Por su parte, Geranpour *et al.* (2019) mencionan que los componentes bioactivos de las semillas de calabaza y el aceite de semilla de calabaza producidos por el método de prensado en frío son vitamina E (tocoferol), carotenoides, provitaminas, fitoesteroles, escualeno, ácidos grasos poliinsaturados y proteínas. Además, contienen fósforo, potasio, magnesio, así como otros minerales como zinc, manganeso, hierro, calcio, sodio y cobre, que son de valor nutricional. En una extracción de aceite por el método de fluido supercrítico (Durante *et al.*, 2014) se reportaron 13.6 mg de extracto/100 g de aceite, con un alto contenido de β -caroteno (55.21%), α -caroteno (36.10%), luteína (4.51%) y criptoxantina (1.02%). En la Tabla 1 se muestra un resumen de reportes de análisis proximal de algunas variedades de calabaza. De la misma manera, en la Tabla 2 se presentan contenidos de micro y fitonutrientes reportados en *Cucurbita ssp.*

Tabla 1. Análisis proximal de *Cucurbita ssp.*

Especie	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína Cruda (%)	FibraCruda (%)	Referencia
<i>Cucurbita pepo</i>	5.20	5.34	25.40	2.49	(Gohari <i>et al.</i> , 2011)
<i>Cucurbita moschata</i>	85.90	1.38	3.66	2.86	(Jacobo-Valenzuela <i>et al.</i> , 2011)
<i>Cucurbita argyrosperma</i>	3.67	4.16	30.17	X	(Romero, 2014)
<i>Curcubita máxima</i>	4.06	3.8	34.56	36.7	(Shahangir, 2015)

Tabla 2. Porcentaje de componentes bioactivos en semillas de calabaza *Cucurbita ssp.* (g/100 g) (Dar et al., 2017).

Componentes	Valor nutritivo
Energía	559 kcal
Carbohidratos	10.71 g
Proteínas	30.23 g
Grasa total	49.05 g
Fibra dietaría	6 g
Vitaminas	
Ácido fólico (Vitamina B9)	58 µg
Niacina	4.99 mg
Ácido pantoténico (Vitamina B5)	0.75 mg
Piridoxina (Vitamina B6)	0.14 mg
Riboflavina	0.15 mg
Tiamina	0.27 mg
Vitamina C	1.9µg
Electrolitos	
Sodio	7 mg
Potasio	809 mg
Minerales	
Calcio	46 mg
Cobre	1.34 mg
Hierro	8.82 mg
Magnesio	592 mg
Manganeso	4.54 mg
Zinc	7.81 mg
Fitonutrientes	
β-Caroteno	9 µg
β-Criptoxantina	1 µg
luteína y zeaxantina	74 µg

En cuanto a los compuestos antinutricionales, no podemos omitirlos cuando hablamos de la semilla de calabaza, puesto que, estos pueden interferir con la absorción de nutrientes, reducen su ingesta y la digestión (Popova & Mihaylova, 2019). Los compuestos antinutricionales que se han encontrado en la semilla de calabaza se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes antinutricionales en semillas de calabaza *Cucurbita ssp* (Dar *et al.*, 2017).

Compuestos antinutricionales	Concentraciones (g/100g)
Cianuro	0.22 ± 0.22
Nitrato	2.27 ± 0.03
Fitatos	35.06 ± 1.10
Oxalato	0.02 ± 0.02

2.5 Propiedades de las proteínas de semillas de calabaza

En la dieta humana las proteínas tienen un papel fundamental puesto que proporcionan aminoácidos que el cuerpo humano no puede sintetizar. Por otra parte, gracias a sus propiedades tecnofuncionales contribuyen a la calidad y propiedades sensoriales de los productos alimenticios, por lo que son piezas clave durante su preparación, procesamiento y almacenamiento. Estas propiedades están influenciadas por el tamaño molecular de la proteína, la distribución de carga y su estructura (secuencias de aminoácidos primarias, conformaciones secundarias y terciarias) (Bučko *et al.*, 2015).

Se ha encontrado en las semillas de calabaza (*Cucurbita ssp.*) que la fracción proteica principal está representada por las globulinas 12S, también conocidas como “cucurbitinas” (Blagrove y Lilley, 1980; Marcone, 1999). La molécula de cucurbitina tiene un peso molecular de 325 kDa y es el equivalente de la subfracción de globulina 11S de las semillas leguminosas; es hexamérica y cada monómero tiene un peso molecular de 54 kDa. Los monómeros están formados por dos subunidades, la ácida grande de peso molecular de 33 kDa y la pequeña básica de peso molecular de 22 kDa (Blagrove y Lilley, 1980).

Por otro lado, las cucurbitinas son acompañadas por albúminas 2S, ambas fracciones juntas conforman el 59% del contenido total de proteína cruda en las semillas de calabaza

(Fruhworth y Hermetter, 2007). Adicionalmente Fang *et al.*, (2010) detectaron pequeñas cantidades de globulinas 18S, que demostraron ser un dímero de los componentes 12S.

Con respecto a los estudios sobre las propiedades funcionales de las proteínas de semillas de calabaza (*Cucurbita maxima*) se ha descubierto que la solubilidad que presentan es inferior al 20% a un pH <5, mientras que aumenta hasta un 80% a medida que el pH se incrementa por encima de 7 (Rezig *et al.*, 2013). Por otra parte, Peričin *et al.* (2008) reportaron que la solubilidad más alta de las globulinas de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) es del 91% a un pH de 7.69 y una alta concentración de NaCl de 3.99%. Así mismo, Bučko *et al.* (2015) determinaron que la solubilidad de las proteínas de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) disminuye al aumentar el pH, permaneciendo constante a pH = 5 cuando se aumenta la concentración del extracto de proteínas. Sin embargo, el aumento de la fuerza iónica disminuye su solubilidad a pH 3, y tiene un efecto menor a pH 5 y 8.

Otras propiedades funcionales de la fracción proteica de semillas de calabaza que se han investigado ha sido su capacidad espumante, donde Rezig *et al.* (2016) determinaron que los extractos de proteínas de semillas de calabaza (*Cucurbita maxima*) obtenidos por solución salina, alcalina y por agua desionizada demostraron pobres propiedades de espuma independientemente de la fuerza iónica. Por último, Bučko *et al.* (2016) trabajaron con semillas de calabaza del género *Cucurbita pepo* y determinaron su capacidad emulsificante y concluyeron que esta es influenciada por el pH y la fuerza iónica, donde a pH 3 con NaCl 0.5 M, observaron separación del aceite inmediatamente después de la preparación de la emulsión.

2.6 Aislados proteicos

Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Dependiendo del tipo de proteína, su concentración y secuencia de unión de los monómeros constituyentes serán sus propiedades nutritivas y características fisicoquímicas (Badui, 2006; Blanco y Blanco, 2017). Una de sus aplicaciones en alimentos es por medio de la utilización de aislados proteicos. Estos se caracterizan por ser la forma comercial más pura de las proteínas, y se obtienen por la remoción de polisacáridos, oligosacáridos y algunos otros componentes mediante hidrólisis y seguido de una precipitación. Los parámetros que se controlan durante

este proceso son: pH, temperatura, solubilidad entre otros, los cuales permiten la purificación de las proteínas (Badui, 2006).

Para considerarse un aislado proteico se debe alcanzar un porcentaje de proteínas arriba del 80% (Vioque *et al.*, 2001), si no llegase a alcanzar dicho porcentaje se le considerara como un concentrado proteico que tienen un mínimo de contenido de proteína del 65 % en base seca (Yada, 2004).

Las formas para obtener un aislado proteico en proteínas vegetales son diversas, entre las cuales se encuentran las siguientes:

a) Extracción proteica por punto isoeléctrico

El proceso de extracción se realiza primeramente con una etapa a pH alcalino, puesto que, las partículas de proteína cargadas negativamente exhiben una fuerte repulsión y favorecen la solubilización de proteínas (Vilg y Undeland, 2017), esto favorece la separación de las proteínas de los compuestos no solubles. Posteriormente se realiza un ajuste de pH al punto isoeléctrico, aquí las proteínas exhiben una solubilidad mínima debido a una carga neta casi nula (Torres *et al.*, 2007). Esta relación entre la carga de la proteína y la solubilidad de la proteína forma el concepto para el método de precipitación isoeléctrica de extracción alcalina. Generalmente las proteínas vegetales tienen un punto isoeléctrico entre 4 y 5 (Shrestha *et al.*, 2021). Pasos previos a la extracción por punto isoeléctrico que deben considerarse, es que, generalmente la semillas son descascarilladas, pulverizadas y de la harina se debe eliminar lo más posible el contenido de grasas.

Extracción ácida

Mismo fundamento que la extracción anterior, sin embargo, se comienza con una extracción ácida a valores menores o iguales a pH 4, ya que, las proteínas se logran solubilizarlas para posteriormente realizar el método de precipitación adecuado, tal como: precipitación isoeléctrica, crio-precipitación o separación por membranas (Boye *et al.*, 2010).

b) Extracción con sales (micelización)

Proceso de extracción proteica donde se requiere de una disolución de sales, el cual consiste en disminuir la fuerza iónica de la solución para lograr la solubilización de las proteínas. Posteriormente de la micelización, las proteínas son recuperadas ya sea por centrifugación o filtración, terminando con un proceso de secado (Boye *et al.*, 2010).

2.7 Propiedades tecnofuncionales de las proteínas vegetales

Las propiedades tecnofuncionales de una proteína se rigen tanto por sus propiedades físicas como químicas, las cuales están involucradas en el procesamiento de alimentos como: en su almacenamiento, preparación y consumo, debido a los múltiples cambios de las proteínas en estas etapas (comportamiento proteico). Diferentes factores intrínsecos y extrínsecos afectan las propiedades funcionales de una proteína. Los factores intrínsecos incluyen la forma de la proteína, el tamaño, la composición secuencial de aminoácidos, la distribución de la carga neta, la estructura (secundaria, terciaria y cuaternaria), la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad y la capacidad de las proteínas para interactuar con otros componentes de la matriz alimentaria (Kinsella y Melachouris, 1978; Wouters *et al.*, 2016). Los factores extrínsecos incluyen pH, humedad, temperatura, fuerza iónica, enzimas, aditivos químicos y procesamiento mecánico (Joshi *et al.*, 2017). Para la posible aplicación de una proteína en diferentes sistemas alimentarios, es necesario comprender las propiedades funcionales de la proteína a medida que estas propiedades cambian con respecto a los diferentes sistemas alimentarios y productos alimenticios (Shevkani, Singh, Chen, Kaur y Yu, 2019). Generalmente, capacidad de absorción de agua (CAA), capacidad de absorción de aceite (CAAc), capacidad de espumante (CEs), estabilidad espumante (EEs), gelificación y emulsión son las principales propiedades funcionales de las proteínas.

2.7.1 Capacidad de absorción de agua (CAA)

La interacción de las proteínas con el agua ha sido expresada de diferentes maneras, siendo los siguientes términos los más popularizados: hidratación y retención de agua, fijación de agua, absorción de agua, entre otros. Existe controversia sobre el significado exacto de estos términos. No existe una terminología estandarizada en la funcionalidad de las proteínas (Zayas, 1997).

La capacidad de absorción de agua (CAA) de los alimentos se puede definir como la cantidad de agua que puede retener 1 g de proteína. Otra cosa que se debe resaltar, son las interacciones moleculares de la CAA, que serán entre las moléculas del agua y las proteínas. Estas interacciones pueden ser principalmente por ion-dipolo (grupos amidas), dipolo-dipolo (grupos hidroxilos) y dipolo inducido-dipolo (residuos hidrofóbicos). Y dependerán cual sea el caso al grupo de cadena lateral que lo conforme (Damodaran, 2000).

La CAA se ve afectada por diversos factores, en los cuales se pueden mencionar: la fuerza iónica, pH, hidrofobicidad, pH, la concentración de proteínas y la composición de aminoácidos (Damodaran, 2000; Moure *et al.*, 2006).

Una proteína con alto CAA es beneficiosa para reducir la pérdida de humedad en productos de panadería envasados y mantener la frescura y la sensación de humedad en la boca de los alimentos horneados (Frijoles) (Vinayashree y Vasu, 2021).

2.7.2 Capacidad de absorción de aceite (CAAc)

De igual manera que CAA, la CAAc se define como la cantidad de aceite que puede absorber 1 g de proteína en polvo o harina. La CAAc de proteínas aumenta con la presencia de aminoácidos con cadenas laterales apolares (Kaur y Singh, 2005). Por otra parte, la calidad sensorial de los alimentos como: la sensación en la boca y la retención del sabor, están estrechamente relacionados con la CAAc. Para optimizar la palatabilidad de algunos alimentos (derivados de la carne), los valores de CAAc de los aislados proteicos deben estar presentes en grandes cantidades (Gerzhova *et al.*, 2015). Los aminoácidos no polares en los sitios de interacción proteína-aceite son asociados a los valores de CAAc. El proceso de absorción de aceite también depende de proteínas hidrofóbicas e interacciones capilares, que ayudan en la retención del aceite absorbido.

Diferentes factores, como los tipos de proteínas, el tamaño de las partículas, el contenido de proteínas y las proporciones de cadenas laterales de aminoácidos no polares en la superficie de las moléculas de proteínas, afectan a la CAAc. La presencia de cadenas laterales de aminoácidos no polares presentes en una proteína aumenta su afinidad de unión a lípidos. La proporción de CAA/CAAc es un parámetro que gobierna la aceptabilidad de una proteína para ser utilizada en un producto alimenticio específico. La exposición de las cadenas

laterales de aminoácidos da como resultado cambios conformacionales en las proteínas que finalmente afectan la relación CAA/CAAc (Kumar *et al.*, 2022).

La proteína con alta capacidad de retención de aceite podría usarse en las industrias alimentarias para la formulación de carne picada, sustitutos y extensores de carne, rosquillas, sopas, salchichas, productos horneados, masas para pasteles, mayonesa y aderezos para ensaladas (Vinayashree y Vasu, 2021).

2.7.3 Capacidad y estabilidad espumante

La propiedad de las proteínas para formar espumas estables es importante en la producción de una variedad de alimentos. La espuma se puede definir como un sistema de dos fases que consta de aire separadas por una fina capa de líquido y un agente activo en la superficie (proteína), que exhibe alta viscosidad, gran área superficial, gran energía superficial y baja densidad (Zayas, 1997).

El proceso de formación de espuma de proteínas se resume en tres pasos. El primero, las proteínas globulares con alta solubilidad se difunden en la interfaz del aire y el agua, donde se concentran y disminuyen la tensión superficial. Inmediatamente, los polipéptidos de proteínas se despliegan en la interfaz con una reorientación sincrónica donde los restos polares migran hacia el agua. Por último, los polipéptidos interactúan entre sí para la formación de una película constante y continua. Esta interacción podría tener éxito mediante la coagulación y desnaturalización de proteínas. Para asegurar una mayor estabilidad de la espuma, la película debe poseer una alta cohesión intermolecular y elasticidad para permitir la deformación por contacto tópico (Kinsella y Melachouris, 1978).

Las propiedades de espuma radican principalmente en las interacciones proteína-proteína y proteína-agua, puesto que, determinan el grado de cohesión (necesario para formar una película de proteína), si existe una mayor proporción de cualquiera de estas interacciones la proteína se ve afectada, concluyendo en una desnaturalización o agregación, la cual termina con una formación de espuma bastante escasa. Las proteínas que tienen índices altos de solubilidad son las presentan las mejores propiedades de formación de espuma (Kinsella y Melachouris, 1976).

El batido de los componentes formadores de espuma como el tensioactivo (proteínas), una fase gaseosa y una líquida produce espuma. El potencial de formación de espuma de una proteína se evalúa sobre la base de CE_s, que denota la cantidad inicial de espuma producida después de batir o remover, y EE_s, que indica la cantidad de espuma que se mantiene después de un tiempo específico (Shevkani *et al.*, 2019).

Las propiedades de formación de espuma de las proteínas están influenciadas por muchos factores, incluida la fuente de proteínas, los métodos de procesamiento, la temperatura, el pH, la concentración de proteínas, el tiempo de mezcla y el método de formación de espuma (Vinayashree y Vasu, 2021).

Las espumas alimentarias tienen una aplicación importante en la producción de una variedad de alimentos como coberturas batidas, soufflé, mousse, merengue y pastel de ángel (Kinsella y Morr, 1984).

2.7.4 Propiedades emulsionantes

Las proteínas están formadas de aminoácidos con cargas que pueden ser aminoácidos polares y no polares sin carga, que producen proteínas emulsionantes y agentes tensoactivos que poseen ambas propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas y son capaces de interactuar con el agua y el aceite en sistemas alimentarios (Yu *et al.*, 2007). La interacción entre proteínas y moléculas de agua tienen lugar en regiones ricas en aminoácidos polares. El predominio de la cadena lateral polar que contiene aminoácidos en una proteína determina su propiedad de emulsificación (Shevkani *et al.*, 2015). Varias proteínas de origen animal (huevos y leche) se utilizan generalmente para la estabilización de emulsiones. Sin embargo, en el caso de las proteínas vegetales, las proteínas de soja se utilizan ampliamente como tensioactivo para la estabilización de emulsiones alimentarias. Los tensioactivos ayudan a estabilizar las emulsiones al disminuir la tasa de formación de crema y coalescencia. Las proteínas actúan como tensioactivos al difundirse rápidamente en la interfaz aceite/agua, donde se reorganizan, interactúan y crean una película de proteína en la superficie de la emulsión (Wouters *et al.*, 2016). Las proteínas también pueden aumentar la estabilidad de la emulsión al aumentar la viscosidad de la fase continua y disminuir la velocidad del movimiento de la gota de aceite a través de la emulsión (Kumar *et al.*, 2022).

Las propiedades emulsionantes incluye la actividad emulsionante (EA), que es la capacidad de la proteína para formar una emulsión, es decir, es la cantidad de aceite necesaria para emulsionar una unidad de proteína y la estabilidad de la emulsión (ES) que se define como la capacidad de las gotitas de la emulsión para permanecer dispersas sin coalescencia, floculación o formación de crema (denota el potencial de una emulsión para resistir los cambios estructurales en la emulsión durante un período de tiempo) (Vinayashree y Vasu, 2021).

Las propiedades emulsionantes se ven afectadas por la masa molecular, la hidrofobicidad, la solubilidad, la estabilidad de la conformación, la carga, el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Así mismo, las propiedades emulsificantes de las proteínas tienen mejores resultados a pH lejanos del punto isoeléctrico, puesto que, tienen mayor solubilidad. (Ferreira *et al.*, 2007).

La capacidad de la proteína para formar y estabilizar las emulsiones es importante para diversas aplicaciones alimentarias, especialmente en carne picada, blanqueadores de café, masas para pasteles, aderezos para ensaladas, mayonesa y postres congelados. Estos productos alimenticios están expuestos a diversos niveles de estrés durante la preparación y, por lo tanto, se requieren diferentes capacidades emulsionantes y estabilizantes (Vinayashree y Vasu, 2021).

2.7.5 Gelificación

Un gel se define como la etapa intermedia de un sólido entre un líquido. En términos más específicos un gel se denomina como un sistema que no tiene flujo en su estado estacionario. Para lograr este estado, el polímero se entrecruza, donde las uniones pueden ser del tipo covalente o no covalentes, las cuales van a atrapar las moléculas del agua en la red tridimensional del gel formado y demás compuestos de bajo peso molecular (Badui, 2006).

Para que se forme la red tridimensional se deben tener interacciones del tipo: interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno y electroestáticas. Estas interacciones tienen un rol importante, debido que determinan si un gel es reversible o irreversible en términos térmicos. Donde la red tridimensional es formada principalmente por interacciones no covalentes (en mayor proporción por puentes de hidrogeno) serán reversibles. Por su parte cuando el gel es generado a partir de interacciones del tipo hidrofóbicas se caracterizan por tener mayor resistencia a altas temperaturas, además son irreversibles. Un ejemplo son los geles creados a partir de clara de huevo (Badui, 2006).

Los geles de proteína son una alternativa para el desarrollo de nuevos productos, puesto que pueden retener a parte del agua, sabores, ingredientes alimentarios y azúcares que posibilita la generación innovadora de nuevos alimentos. En la industria alimentaria la gelificación se usa en la obtención de alimentos como: quesos, tofu, embutidos y masas para pan Kinsella y Melachouris, 1976; Badui, 2006).

2.8 Aplicación en los alimentos

La creciente demanda de productos alimenticios por parte de la humanidad ha contribuido a la necesidad de buscar nuevas alternativas alimentarias que puedan satisfacer sus necesidades nutrimentales. El uso de las semillas de calabaza en el sector alimenticio se ha incrementado. Por ejemplo, Navarro-Cortez *et al.* (2016) desarrollaron botanas extrudidas listas para comer usando mezclas de harinas de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) y maíz nixtamalizado (*Zea mays*), donde encontraron que el aumento de la harina de semillas de calabaza disminuyó ($p < 0.05$) la tasa de expansión y aumentó la densidad aparente y la diferencia de color total. Las condiciones óptimas del proceso que obtuvieron fueron: temperatura de extrusión de 120 °C con un contenido de humedad de alimentación de 20 g/100 g, que contenía 10.36 g/100 g de harina de semillas de calabaza, para un bocadillo listo para comer con una relación de expansión de 1.7, densidad aparente de 711.1 kg/m³, dureza de 53.5 N y un índice de absorción de agua de 5.4 g/g, contenido de proteína de 11.74 g/100 g y contenido de lípidos de 10.27 g/100 g, que es más alto que el de otros extruidos para meriendas. Concluyendo que, el bocadillo listo para comer desarrollado en esa investigación podría considerarse como un alimento funcional con beneficios nutricionales y para la salud.

Por su parte, Kumari y Dubey (2016) innovaron helados nutritivos a partir de leche de semillas de calabaza y leche de soja con o sin la adición de pulpa de piña y evaluaron su aceptabilidad y potencial nutritivo. El análisis nutricional de los dos helados más aceptables que obtuvieron indicó que el valor de proteínas y grasas fue excelente y que el contenido de calcio, hierro y vitamina C que encontraron está en buena cantidad en comparación con el helado de leche de vaca estándar. Así, estos helados serían altamente nutritivos y aceptables para la población.

Otra investigación, pero enfocada en la tecnología de encapsulación para el ámbito alimenticio fue la de Rojas *et al.* (2019). Estos autores reportaron la formulación de mayonesas que contienen aceites de semillas de chía, calabaza y barú microencapsulados, obteniendo una mayor estabilidad térmica de todos los aceites después de la encapsulación. Sus estudios de reología destacaron un aumento en la viscosidad de la mayonesa cuando se agregaron micropartículas que contenían aceite de chía y de semillas de calabaza donde las propiedades mecánicas no se vieron afectadas por la presencia de las micropartículas en la mayonesa en todas las formulaciones que probaron.

Por último, Ogrodowska *et al.* (2020) investigaron las propiedades sensoriales y la estabilidad oxidativa de la microencapsulación por secado por aspersión de mezclas de aceite de pescado y aceite de semillas de calabaza. Los resultados que obtuvieron, fue que la mezcla mejoró la estabilidad oxidativa del aceite de pescado atrapado y enmascara eficientemente su olor y sabor a pescado, así mismo, los ácidos grasos poliinsaturados tuvieron una menor pérdida durante el almacenamiento, y esto lo corroboraron con la prueba de Rancimat. Además, el aceite de calabaza contribuyó con el contenido de tocoferoles, escualeno, fitosteroles y carotenoides a la mezcla y diluyó el contenido de colesterol.

4 JUSTIFICACIÓN

La industria aceitera de las semillas de calabaza se ha presentado como una área de oportunidad para investigación científica, no solo por el hecho de que su aceite presenta efecto antioxidante y antiinflamatorio que es de interés en el área farmacéutica y médica, sino también porque el subproducto llamado “tortas de prensa” resultado de la extracción del aceite por prensado en frío a temperaturas máximas de 40°C, podría permitir la obtención de proteínas sin desnaturalización térmica y ausencia de trazas de solventes orgánicos u otros químicos, conservándose así las propiedades nutritivas y funcionales de las proteínas presentes. Actualmente este subproducto es destinado para el consumo de ganado.

Es evidente que las tortas de prensa de semillas de calabaza presentan una fuente importante de proteínas y compuestos nutraceuticos, que pueden ser utilizados en la industria de los alimentos, por lo que se requiere información sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de estas proteínas para determinar sus aplicaciones alimentarias. Por lo anterior, el presente trabajo pretende aportar a la caracterización fisicoquímica, tecnofuncional y estructural del aislado proteico del subproducto de la extracción de aceite de semillas de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el aislado proteico del subproducto de la obtención de aceite de semillas de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber) mediante análisis fisicoquímico y estructural y evaluación de sus propiedades tecnofuncionales.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener el aislado proteico del subproducto de la obtención de aceite de semillas de calabaza.
2. Caracterizar fisicoquímica y estructuralmente el aislado proteico obtenido.
3. Determinar las propiedades tecno-funcionales del aislado proteico obtenido.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Preparación de la muestra

Las tortas de prensa de semilla de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber) fueron donadas por la empresa APG Bioextracts S.A. de C.V. ubicada en la ciudad de Mérida, Yucatán. Se realizó una molienda de las tortas de prensa de semilla de calabaza con un molino de martillos (Veyco, Serie MMV) provisto con una malla con tamaño de poro de un centímetro. Posteriormente, el material pulverizado fue sometido a una extracción continua en equipo Soxhlet con hexano para eliminar cualquier resto de aceite y demás componentes liposolubles de acuerdo con los métodos oficiales de la (AOAC, 2000). La harina desgrasada resultante se secó a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, se almacenó en botellas herméticas a 4 °C hasta su utilización.

5.2 Obtención del aislado proteico de semillas de calabaza (APSC)

El aislado proteico del subproducto de la obtención de aceite de semillas de calabaza se obtuvo siguiendo la metodología presentada por Bucko *et al.* (2016) con algunas modificaciones. La metodología se basa en una extracción alcalina con precipitación isoeléctrica, es decir, se ajustó el pH al punto isoeléctrico, donde la carga neta es cero y las moléculas de proteínas puedan dejar de estar en solución y puedan ser recuperadas.

Brevemente, la torta de semillas de calabaza previamente desgrasada (harina desgrasada de semillas de calabaza) fue suspendida en solución alcalina relación 1:20 (p/v, a pH 10), la cual se ajustó con NaOH 1 M a 25 °C. Después de 30 minutos de agitación, la suspensión fue centrifugada a 10,000 rpm por 20 min a 4 °C. Las proteínas solubles fueron recuperadas para posteriormente precipitarlas, ajustando el pH a 4 con HCl 1 M. Las proteínas fueron recuperadas por centrifugación del sobrenadante a 10000 rpm durante 20 min a 4 °C. El precipitado fue recuperado y liofilizado. El aislado proteico resultante fue almacenado en bolsas herméticas a 4 °C.

5.3 Obtención de las fracciones proteicas

Se obtuvieron fracciones proteicas del APSC por el método de Osborne (1924) de acuerdo con lo reportado por Amza *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Las fracciones proteicas (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) fueron obtenidas de manera secuencial. Para

la obtención de la primera fracción (albúminas) se preparó una muestra de APSC (3 g) y se suspendió en H₂O destilada (1:10 p/v) y se agitó durante 1 h a 4°C, seguido la suspensión fue centrifugada a 13000g a 4°C por 20 min utilizando una centrifuga OHAUS (Frontier™ serie 5000, Estados Unidos). La fracción de albuminas del APSC (C-Ab) correspondió al sobrenadante recuperado. Seguido, el precipitado (P-1) resultante se utilizó para la segunda extracción proteica de “globulinas”.

La fracción de globulinas fue obtenida del precipitado P-1. Brevemente, el precipitado fue resuspendido en una solución de 50 mM tris-HCl + 0.4 M NaCl (pH 8) en una relación 1:10 (p/v) agitando la suspensión durante 1 h a 4°C, para ser enseguida centrifugada a 13000g a 4°C por 20 min. La fracción de globulinas correspondió al sobrenadante obtenido denominado “C-Gb”, el cual se almacenó a 4°C hasta su uso. El precipitado resultante (P-2) se utilizó para la tercera extracción proteica de “prolaminas”.

La fracción de prolaminas fue obtenida del precipitado P-2 resuspendiendo en etanol al 70% (1:10 p/v), la suspensión fue agitada con barra magnética durante 1 h a 4°C para enseguida centrifugar a 13000g a 4°C por 20 min. El sobrenadante resultante correspondió a la fracción prolaminas y fue denominada “C-Pr”, el cual se almacenó a 4°C hasta su uso. El precipitado resultante (P-3) se utilizó para la tercera extracción proteica de “glutelinas”.

La fracción de glutelinas fue la cuarta y última extracción, el precipitado P-3 fue resuspendido en una solución alcalina de 0.1M de NaOH (1:10 p/v), la suspensión fue agitada con barra magnética por 1 h a 4°C para enseguida centrifugar a 13000g a 4°C por 20 min. el sobrenadante obtenido fue denominado “C-Gl”. Se almaceno a 4°C hasta su uso.

5.4 Cuantificación de proteína

El contenido de proteínas tanto de las fracciones del APSC como este mismo, fue realizado por la metodología de Amza *et al.* (2015), se cuantificó por el método de Bradford (1976) (Bradford Reagent B6916, Sigma-Aldrich, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, U.S.A.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante G y las proteínas en la solución. El complejo proteína-colorante provoca un cambio en la absorción máxima del colorante de 465 a 595 nm, en donde la cantidad de absorción es

proporcional a la cantidad de proteína presente. Las suspensiones de proteínas se dejaron reaccionar por 40 min a 25°C antes de leer la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Spectra Max 190). Para la relación volumen proteína-reactivo fue de 5 µL de volumen de proteína y 250 µL de reactivo de Bradford.

Para la determinación de la concentración de proteína de cada muestra, se realizó una curva estándar con una muestra patrón de albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones de 0.0, 0.025, 0.125, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 1.5 mg/mL.

5.5 Caracterización Físicoquímica

5.5.1 Caracterización proximal del APSC

Los análisis bromatológicos del APSC se realizaron en la unidad de servicios externos de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. Se determinaron los contenidos de proteína, humedad, extracto etéreo y cenizas por triplicado de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC (2000). El contenido de carbohidratos fue calculado por diferencia (Resendiz-Vazquez *et al.*, 2019).

5.5.2 Perfil de solubilidad

La solubilidad de las proteínas del APSC fue determinada por la metodología de He et al. (2018) con modificaciones. Brevemente, 20 mg de APSC se agregaron a 10 mL de agua destilada, se trabajó en un rango de pH 2-12, las muestras se ajustaron con NaOH o HCl al 0.1 M, dependiendo el caso. Enseguida las muestras se dejaron en agitación durante 30 min en placas de agitación con el uso de barras magnéticas a temperatura ambiente, y se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a 25°C. Se utilizó el método de Bradford (1976) para determinar el contenido de proteína en el sobrenadante. El porcentaje de solubilidad de la proteína se obtuvo de acuerdo con la ecuación de la curva de solubilidad de BSA.

5.5.3 Determinación del color

Se midieron tres puntos de la zona ecuatorial de la harina de semillas de calabaza y del APSC en tres pH (3, 7 y 9), con un colorímetro (KONICA MINOLTA, Modelo CM-600d, Japón) para obtener los valores de L* (luminosidad), a* (tonalidades verdes [-] a tonalidades rojas [+]) y b* (tonalidades azules [-] a tonalidades amarillas [-]). Se hicieron tres mediciones por

muestra para obtener una media. Posteriormente, se calculó el valor del ángulo *Hue* (°) y la cromaticidad (*C**) de acuerdo con lo reportado por Mclellan *et al*, (1994) usando las siguientes ecuaciones:

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$$
$$Hue (^\circ) = \arctan\left(\frac{b}{a}\right)$$

Las imágenes representativas del color de la harina de semillas de calabaza y del APSC en tres pH (3, 7 y 9) fueron obtenidas mediante el programa de “Nix Color Sensor”.

5.6 Caracterización Estructural

5.6.1 Análisis de aminoácidos

El perfil de aminoácidos del APSC se realizaron en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Se determinó por el método interno del CIATEJ de “INS-SM/US-260” de aminoácidos totales.

5.6.2 Perfil electroforético del aislado proteico

Los pesos moleculares de las fracciones proteicas APSC se caracterizaron utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en ausencia y presencia de β-mercaptoetanol (2-ME).

La electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Laemmli (1970) con modificaciones en geles de poliacrilamida al 4% (gel concentrador) y 14% (gel separador) con y sin reducción de la proteína con 2-ME. Las muestras de proteína se suspendieron en buffer de carga (tris-HCl 0.5M pH 6.8, 20% (p/v) de glicerol y 10% (p/v) de SDS) y la reducción de puentes disulfuro se realizó con 2-ME (5% v/v) a 95.5°C por 5 min. El gel fue cargado con 20 μL (1μg/μL) de muestra por carril.

El gel fue cargado con 30 μg de muestra por carril. Las proteínas se concentraron a 120 V por 1 min, posterior 100V por 5 min y finalmente para su separación electroforética se llevó a cabo a una corriente constante de 130 V durante ~70 min. Para la estimación de los pesos

moleculares de las proteínas se utilizó el marcador de peso molecular de 10-250 kDa (Precisión Plus Protein™WesternC™ Standards).

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis vertical Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y el gel fue teñido utilizando azul de Coomassie G-250

5.6.3 Hidrofobicidad superficial (H_0 -ANS)

La H_0 -ANS se determinó utilizando 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS, Sigma-Aldrich), de acuerdo con el método de Kato y Nakai (1980) descrito por Resendiz- Vazquez *et al.* (2017) con ligeras modificaciones. En soluciones buffer de fosfatos a pH 3, 7 y 9 (1.5 mg del APSC en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M al pH deseado) se prepararon las dispersiones de proteína en concentraciones desde 0.001 hasta 0.10 mg/mL. El contenido de proteína del sobrenadante obtenido de la centrifugación de la dispersión a 8000g durante 20 min a 17 °C se determinó por el método de Bradford (1976). Paso seguido, se preparó una solución de ANS 8 mM en soluciones buffer de fosfatos a pH 3, 7 y 9 y se añadió 40 µl al sobrenadante anterior.

A longitudes de onda 364 nm (excitación) y 485 nm (emisión) se midió la intensidad de fluorescencia mediante un espectrómetro de fluorescencia Varioskan (Thermo Scientific, Estados Unidos). La H_0 -ANS. Se determinó como la pendiente resultante de un análisis de regresión lineal de la intensidad de fluorescencia contra la concentración proteica.

5.6.4 Propiedades térmicas

Las características térmicas del APSC se evaluaron con la utilización de un calorímetro de barrido diferencial (DSC, TA Q 2000, TA Instruments, New Castle, DE, USA) de acuerdo con Rezig *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. Se utilizaron crisoles de aluminio de 25 µl, para cada muestra se colocaron 6 mg que fueron sellados herméticamente. Se calentaron en un barrido de 20 a 200°C con una velocidad de calentamiento de 20°C/min. Como control se tomó un crisol vacío. Por último, para el análisis de los termogramas se utilizó el programa “Advantage/Universal Analysis (UA)” para obtener los valores de T_0 , T_d y entalpía (ΔH).

5.6.5 Espectroscopía FTIR

Se obtuvieron espectros infrarrojos mediante FTIR-ATR con un espectrómetro Spectrum GX (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) de muestras de APSC a tres valores de pH (3, 7 y 9). Para ello, previo al análisis, el APSC fue dispersado en agua y se agitó con ayuda de barras magnéticas usando una plancha de calentamiento por 60 min, con el fin de hidratar la muestra. Enseguida, se ajustó el pH a 3, 7 y 9 con NaOH 0.1 N y HCl 0.1. Posteriormente las dispersiones fueron congeladas en un ultracongelador a -70°C y se liofilizaron. Por último, la determinación de las estructuras secundarias del APSC se determinó por medio de la deconvolución en de la banca amida I localizada $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (Resendiz-Vazquez *et al.*, 2019).

5.7 Propiedades tecno-funcionales

5.7.1 Capacidad de absorción de agua (CAA)

La capacidad de absorción de agua se determinó mediante el método descrito por Vinayashree y Vasu (2020) con modificaciones. Para tal fin, se preparó una suspensión utilizando 0.5 g de APSC y 5 mL de agua que fueron colocados en tubos de centrifuga de 15 mL y enseguida fueron mezclados por 30s con ayuda de un agitador tipo vortex (USA, 2007). La suspensión se dejó reposar a temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Después, las suspensiones fueron centrifugadas en un equipo OHAUS (Frontier™ serie 5000, Estados Unidos) a 10, 000 g por 20 min a temperatura ambiente. Para terminar, se decantó el sobrenadante y se pesó el residuo. La capacidad de absorción de agua fue registrada como $\text{H}_2\text{O g}^{-1}$ de APSC.

5.7.2 Capacidad de absorción de aceite (CAAc)

La capacidad de absorción de aceite se determinó mediante el método descrito por Vinayashree y Vasu (2020) con modificaciones. Para tal fin, se preparó una suspensión utilizando 0.5 g de APSC y 5 mL de aceite de oliva refinado (Member's Mark) que fueron colocados en tubos de centrífuga de 15 mL y enseguida fueron mezclados por 30s con ayuda de un agitador tipo vortex (USA, 2007). La suspensión se dejó reposar a temperatura ambiente ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. Después, las suspensiones fueron centrifugadas en un equipo OHAUS (Frontier™ serie 5000, Estados Unidos) a 10000g por 20 min a temperatura

ambiente, para terminar, se decantó el sobrenadante y se pesó el residuo. La capacidad de absorción de aceite fue registrada como g aceite g⁻¹ de APSC.

5.7.3 Capacidad emulsificante

Se determinó siguiendo la metodología reportada por Beuchat (1977). Se preparó una muestra de APSC con 1 g en 50 mL de agua destilada la cual fue mezclada con ayuda de una licuadora (Osterizer 6630, México, D.F.) durante 1 min. Una vez dispersa la muestra y mezclándose en el equipo, se comenzó a añadir de manera lenta y progresiva aceite (aceite de oliva refinado, Member's Mark) por medio de una probeta de 250 mL graduada hasta observar un cambio aparente en la formación de la emulsión (inversión de la fase, caracterizada por una inversión de la emulsión de aceite en agua hacia agua en aceite). La capacidad emulsificante fue calculada como mL de aceite emulsificado por g⁻¹ de proteína.

5.7.4 Actividad y estabilidad emulsificante

La actividad emulsificante (AE) y la estabilidad emulsificante (EE) se realizó conforme a la metodología señalada por Lafarga *et al.* (2019) con modificaciones. En un tubo de centrifuga se pesó 0.5 g del APSC y se mezcló con 7.5 mL de agua destilada hasta que se obtuviera una suspensión, se realizó por triplicado. Una vez preparadas las suspensiones se ajustó el pH a 3, 7 y 9 agregando en su caso NaOH o HCl a 1 M. Paso seguido, se añadió 7.5 mL de aceite (aceite de oliva refinado, Member's Mark) a cada suspensión y se agitaron con un ULTRATURRAX (J-ROHi, Ultra-Turrax T25) por 2 min. Posteriormente, los tubos con la emulsión se centrifugaron usando un equipo OHAUS (Frontier™ serie 5000, Estados Unidos) a 1200 rpm durante 5 min. La A_{Em} fue determinada con la siguiente ecuación:

$$AE(\%) = \left(\frac{\text{Volumen de fase emulsionada (mL)}}{\text{Volumen del contenido total en el tubo (mL)}} \right) \times 100$$

Para la EE las muestras fueron calentadas en baño maría a 80°C por 30 min y se enfriaron a con agua de grifo. Por último, se centrifugó a 1, 200 rpm durante 5 min. La EE se calculó con la siguiente ecuación:

$$EE(\%) = \left(\frac{\text{Volumen de emulsión después del calentamiento y centrifugado (mL)}}{\text{Volumen del contenido total en el tubo (mL)}} \right) \times 100$$

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.7.5 Capacidad mínima gelificante (CMG)

Se realizó de acuerdo con el método propuesto de Pham *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Las muestras del APSC fueron preparadas con 5 mL para dispersiones de proteína entre 13 hasta 20% en tubos de ensayo. Para cada dispersión de proteína fue realizado un ajuste de pH a 3, 7 y 9 con HCl o NaOH 1 N. Los tubos con las suspensiones proteicas fueron calentados por 1 h en baño maría a 85°C y enseguida se enfriaron con baño de hielo y se almacenaron durante 2 h en condiciones de refrigeración (4°C). La CMG fue considerada como aquella en la que la muestra dentro del tubo invertido no se deslizó.

5.7.6 Capacidad y estabilidad espumante

La capacidad de espumante (CE_s) y la estabilidad espumante (EE_s) fueron determinadas por el método reportado por Kabirullah y Wills con modificaciones (Kabirullah y Wills, 1982; Resendiz-Vazquez *et al.*, 2017). Se prepararon 3 suspensiones proteicas con 0.5 g de APSC y 25 mL de agua destilada, enseguida se ajustó el pH a 3, 7 y 9 con NaOH o HCl 1 N. Las suspensiones fueron mezcladas en una licuadora (Osterizer 6630, México, D.F.) a velocidad media durante el lapso de 1 min a temperatura ambiente (27 ± 2 °C). Seguidamente del término de la homogenización, la espuma obtenida se depositó en una probeta de vidrio graduada de 250 mL. La CE_s se determinó como el volumen total de la espuma, mientras tanto la EE_s se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%EE_s = \left(\frac{\text{Volumen de espuma al transcurso de 30 min}}{\text{Volumen inicial de espuma}} \right) \times 100$$

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron aplicando un análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias de Tukey, donde las diferencias entre las medias se consideraron significativas en $p < 0.05$, se utilizó el software JMP versión 8.0

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización fisicoquímica

6.1.1 Rendimiento del proceso de obtención de APSC

A partir de 75.04 ± 0.03 gramos de harina desgrasada se obtuvieron 10.61 ± 0.12 g de aislado proteico en polvo con rendimiento de $14.14\% \pm 0.17$ de proteína. Para *Cucurbita pepo* (Bučko *et al.*, 2016) y *Cucurbita moschata* (Vinayashree y Vasu, 2021) se reportaron valores de $36.5 \pm 0.2\%$ y 33.35 ± 0.18 de rendimiento proteico, respectivamente.

6.1.2 Composición químico-proximal y cuantificación proteica del APSC por Bradford

La composición químico-proximal del APSC para el contenido de proteína, extracto etéreo, cenizas, humedad, fibra y carbohidratos fue de 93.92 ± 0.01 , 1.05 ± 0.00 , 1.79 ± 0.00 , 3.25 ± 0.01 , 0 y 0%, respectivamente. A su vez, el contenido proteico del APSC tuvo un porcentaje del $87.56 \pm 0.79\%$. Esta cuantificación proteica fue menor al reportado en los análisis proximales. Esta diferencia en la cuantificación de proteínas entre ambos métodos podría explicarse porque el método de Kjeldahl determina la proteína cuantificando el nitrógeno total, mientras que en la cuantificación por Bradford se basa solamente en la determinación de nitrógeno proteico (Weng *et al.*, 2017). El contenido de proteína del APSC es similar al reportado en los aislado proteico de semillas de calabaza del género de *Cucurbita pepo* con $84.87 \pm 2.00\%$ y *Cucurbita moschata* con $92.59 \pm 0.5\%$ por Bucko *et al.* (2016) y Vinayashree y Vasu (2020), respectivamente.

Además, de acuerdo con Vioque *et al.* (2001) este porcentaje alcanzado permite considerar al APSC como un “aislado proteico” y no simplemente como un concentrado proteico, puesto que, en dicha referencia nos indican que un contenido proteico del 80% o mayor indica que la muestra es un aislado proteico, en cambio, un contenido menor al 80% pero igual o superior al 65% se refiere a un concentrado proteico (Yada, 2004). Fraccionamiento proteico

Se encontró en el APSC los 4 diferentes tipos de fracciones proteicas en base al método de fraccionamiento de Osborne (1924) y se determinó el contenido de proteína mediante el método de Bradford, utilizando como estándar BSA (véase anexo 1).

Las proteínas presentes en el APSC fueron separadas en base a su solubilidad en cuatro diferentes fracciones: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en sal), glutelinas (solubles en álcali) y prolaminas (solubles en alcohol). La fracción mayoritaria fue la de las glutelinas, seguido de las albuminas, globulinas y prolaminas, como se reporta en la Tabla 4.

Algunos reportes sobre fraccionamiento proteico en semillas de calabaza han sido en *Cucurbita moschata* donde la fracción proteica predominante fue el grupo las glutelinas (45.82 % \pm 0.31), globulinas (8.90 % \pm 0.08) y albuminas (1.00 % \pm 0.04) (Vinayashree y Vasu, 2021). Por su parte Pham *et al.*(2017) realizaron el fraccionamiento proteico en semillas de calabaza *Cucurbita pepo* donde su principal fracción proteica fueron las glutelinas (49%), globulinas (20.4 %), albuminas (13.5%) y prolaminas (4.3%). Otro trabajo en semillas de calabaza fue en *Cucurbita argyrosperma sororia* donde las glutelinas fueron su principal fracción proteica (95.09 %), globulinas 11s y 7s (2.05 % y 1.36%, respectivamente), albuminas (1.28 %) y por último prolaminas (0.22 %) (Herrera *et al.*, 2016). Además, se concuerda con la literatura que la fracción menos predominante fueron las prolaminas, ya que, las prolaminas solo son predominantes en los cereales no en las semillas de plantas (Horax *et al.*, 2011).

Tabla 4. Fracciones proteicas de APSC.

Fracción	(mg/mL)	% Relativo
Albuminas	0.53 \pm 0.01	18.41
Globulinas	0.34 \pm 0.00	12.01
Prolaminas	0.29 \pm 0.01	10.08
Glutelinas	1.70 \pm 0.01	59.47

Los valores mostrados corresponden a la media (n=3) \pm la desviación estándar.

6.1.3 Perfil de solubilidad de APSC

Los resultados de solubilidad en agua del APSC en un rango de pH 2-12 se presenta en la Figura 3. Los resultados indican que el APSC presentó su máxima solubilidad a pH 12 (100%), mientras que el punto isoeléctrico (mínimo de solubilidad) se observó a pH 5 (0.55 %).

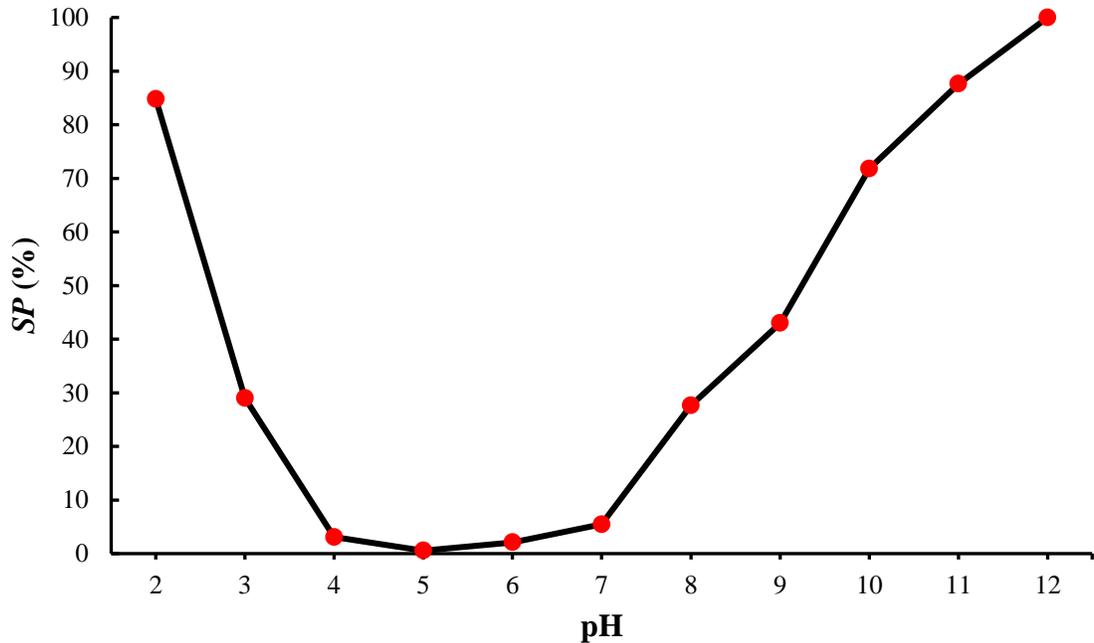


Figura 3. Curva de solubilidad proteica (SP%) del APSC. Los resultados son la media de $n = 3 \pm$ la desviación estándar.

La solubilidad de las proteínas es una propiedad funcional importante, ya que influye en otras propiedades funcionales (como emulsificación, formación de espuma, gelificación y batido) y la biodisponibilidad de las proteínas (Nakai y Li-Chang, 1985). La solubilidad mayor observada a pH 12 puede deberse al incremento de las fuerzas repulsivas de acuerdo con la literatura (Fathollahy *et al.*, 2021).

La curva de solubilidad presentada es comparable al perfil de solubilidad en “U” reportado para aislados proteicos de otras especies de semillas de calabaza, como *Cucurbita moschata*

(Vinayashree Vasu, 2021) y *Cucurbita pepo* (Bučko *et al.*, 2016), los cuales presentaron mínima solubilidad en pH 4 y 5, respectivamente.

6.1.4 Análisis de color

La determinación de color ha sido descrita por numerosos sistemas de coordenadas, uno de los más representativos es el espacio de color de la Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de l'Eclairage's) CIE L*a*b* creado en el año de 1976 que permite diferenciar el color en relación con la percepción humana (Ibraheem *et al.*, 2012).

Se debe agregar que recientemente, el análisis de imágenes se ha utilizado como un enfoque prometedor para la evaluación objetiva de la calidad de un producto seco. El color suele ser el primer parámetro de calidad que evalúan los consumidores y es fundamental en la aceptación del producto (Salehi & Kashaninejad, 2015). En este contexto, el color en aislados proteicos están relacionado con sus componentes pigmentarios y otras sustancias no pigmentarias que actúan como precursores o contribuyentes de pigmentos, como proantocianidinas, procianidinas y los ácidos fenólicos (Sharan *et al.*, 2020).

Las muestras analizadas (harina desgrasada de semilla de calabaza (HDSC) y APSC (pH 4) a pH 3 7 y 9) fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) en todos los parámetros de color (L^* , a^* , b^* , C^* , Hue ($^\circ$)) analizados y se presentan en la Tabla 5. En el primer caso, los valores para la L^* en la HDSC y en el APSC en pH 3, presentaron una tonalidad blanca por su cercanía al valor de 100, por su parte las muestras del APSC, APSC pH 7 y APSC pH 9 tuvieron una tonalidad más oscura. Esta disminución de la luminosidad puede atribuirse a la polimerización de compuestos fenólicos, puesto que incitan el oscurecimiento enzimático (Beveridge y Weintraub, 1995).

Para el parámetro a^* las magnitudes de los valores fueron para la HDSC de un valor positivo de 0.56 ± 0.00^a denotando una tendencia al color rojo, aunque mínimo. Para los aislados mostraron valores positivos (colores rojizos) entre 5.47 a 9.86. Para la HDSC y para todos los aislados presentaron valores de b^* positivos (tendencia al amarillo), con rangos entre 16.69 y 28.40. La menor tonalidad amarilla y rojiza en la HDSC puede deberse a la eliminación de carotenoides durante el desengrasado (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2012). Por

otra parte, el aumento en los valores de a^* , b^* de los APSC respecto a la HDSC, se puede atribuir a la variación del pH que modificó las estructuras de las proteínas y cambió sus interacciones con los pigmentos (carotenoides) (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2012). La precipitación de proteínas a pH bajo puede ser el origen de pigmentos enmascarados que quedaron aprisionados en el precipitado. Por último, la reacción de los carotenoides con la solución de pH ácida o básica podría ser el origen de la variación del color (Bouaziz *et al.*, 2013).

Igualmente, para los valores de cromaticidad (C^*) en todas las muestras tratadas fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) y mostraron baja saturación teniendo valores entre 16.70 a 28.40, denotando mayor luminosidad (blancura) a medida que se disminuye el valor de C^* . Por último, lo que respecta de *Hue* ($^\circ$) tuvo un poco variación en la analogía de las muestras tratadas (88.08 a 69.68), con una magnitud del ángulo pequeña, presentando un brillo análogo y de baja intensidad entre las muestras tratadas.

El color que se obtuvo para el APSC comparado con la Quinoa variedad rosada, (Steffolani *et al.*, 2016) fue más oscuro ($L^* = 68.16$, $a^* = 0.9$, $b^* = 20.36$). Por su parte, Saini, Sharma, y Sharma, 2018, reportaron un color para el ajonjolí análogo al APSC ($L^* = 44.25$, $a^* = 5.48$, $b^* = 17.07$). Todavía cabe señalar, que el color de los aislados proteicos se puede controlar, debido, a ciertos factores, tales como: descascarando las semillas antes de la extracción, mediante el método de extracción de proteínas, el pH de extracción y el tamaño de partícula final (Toews y Wang, 2013).

Tabla 5. Parámetros de color de HDSC y APSC a diferentes pH

	L* (Luminosidad)	a* (rojo-verde)	b* (amarillo-azul)	C* (Croma)	Hue(°) (matiz)	Color de las muestras
Harina desgrasada (HDSC)	69.46 ± 0.02 ^a	0.56 ± 0.00 ^a	16.69 ± 0.01 ^a	16.70 ± 0.01 ^a	88.08 ± 0.00 ^a	
APSC	48.90 ± 0.15 ^b	9.86 ± 0.12 ^b	26.63 ± 0.07 ^b	28.40 ± 0.11 ^b	69.68 ± 0.18 ^b	
APSC-pH3	63.13 ± 0.01 ^c	5.85 ± 0.01 ^c	25.51 ± 0.01 ^c	26.17 ± 0.01 ^c	77.09 ± 0.03 ^c	
APSC-pH7	42.00 ± 0.00 ^d	6.94 ± 0.00 ^d	21.98 ± 0.04 ^d	23.05 ± 0.03 ^d	72.48 ± 0.04 ^d	
APSC-pH9	59.96 ± 0.01 ^e	5.47 ± 0.00 ^e	24.51 ± 0.02 ^e	25.11 ± 0.01 ^a	77.42 ± 0.01 ^a	

Los resultados son la media de n=3 ± la desviación estándar. Los diferentes superíndices en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

6.3 Caracterización estructural

6.3.1 Análisis de aminoácidos

El perfil de aminoácidos del APSC junto con la composición de referencia de los requerimientos de aminoácidos esenciales (AAE) para niños en edad preescolar y adultos (FAO /OMS, 2007), se presentan en la Tabla 6.

El APSC es rico principalmente en Glx (Glu y Gln) que es similar a lo reportado en el aislado proteico de semillas *Cucurbita moschata* (Vinayashree y Vasu, 2021) y en el aislado proteico de semillas de sandía (Wani *et al.*, 2011). Así mismo, el segundo aminoácido en mayor proporción fue Phe, seguido de Val, Tyr, Arg, Ile y Pro. Por otra parte, los aminoácidos con menores cantidades fueron Met, Lys y Cys, seguido de Trp, Leu, Gly, His y Ser. Vinayashree y Vasu, 2021 reportaron bajas cantidades de los aminoácidos de Lys, His y Thr para aislado proteico de semillas *Cucurbita moschata*, por su parte Rezig *et al.* 2013 reportaron en fracciones proteicas de semillas de calabaza (*Cucurbita pepo*) como aminoácidos limitantes a Lys y Ile. Por último, Longe *et al.* 1983 mencionó que la Lys y la Thr en la calabaza estriada (*Telfaria occidentails*) son aminoácidos limitantes según los puntajes de aminoácidos. Cabe señalar que la lisina es un aminoácido limitante importante en la mayoría de las tortas de aceite (Biswal *et al.*, 2021).

Cuando comparamos las recomendaciones de la FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud) con el perfil de aminoácidos obtenido, se determinó que los aminoácidos que cumplen con los requerimientos para niños de preescolar y adultos son Phe, Val, Ile y Thr (solo adultos). Aminoácidos como Leu, Lys, Met, Trp, y Ser no cumplieron con los requerimientos de la FAO/OMS para niños en edad preescolar ni tampoco para adultos.

Del contenido total de aminoácidos esenciales del APSC, el contenido total de aminoácidos aromáticos fue el más alto, mientras que el total de aminoácidos azufrados presentó un valor bajo. El contenido de aminoácidos aromáticos es ampliamente mayor a los requerimientos de la FAO/OMS, mientras que los aminoácidos azufrados no alcanzaron a cumplir con los requerimientos de la FAO/OMS.

El contenido de aminoácidos hidrofóbicos en el APSC fue del 46.94%, un valor mayor al reportado en el aislado proteico de *Cucurbita moschata* (39.28%) por Vinayashree y Vasu (2021) . El alto nivel de aminoácidos hidrófobos forma un núcleo interior más compacto de la proteína, lo que mejora su estabilidad (Deng *et al.*, 2019).

Tabla 6. Composición de aminoácidos (mg/ 100 mg de proteína) del aislado proteico de semillas de calabaza.

Aminoácidos	APSC*	FAO/WHO para niños	FAO/WHO para adultos
Esenciales			
Ile	4.45	2.80	1.30
Leu	0.13	6.60	1.90
Lys	>0.00146	5.80	1.60
Met	>0.00149		
Phe	15.20	6.30	1.90
Thr	1.75	3.40	0.90
Trp	0.01	1.10	0.50
Val	9.42	3.50	1.30
Total, de Aminoácidos esenciales	30.98		
No esenciales			
Ala	3.13		
Pro	4.50		
Tyr	8.90		
Arg	7.42		
Gly	0.12		
Cys	>0.0012		
Asx (Asp y Asn)	1.90		
His	0.30		
Ser	0.72	1.90	1.60
Glx (Glu y Gln)	20.40		
Total, de aminoácidos no esenciales	47.50		
AAS**	>0.00270	2.50	1.70
AAA***	24.05	6.30	1.90

APSC* – Aislado proteico de semillas de calabaza.

** Aminoácidos azufrados: Metionina + Cisteína.

*** Aminoácidos aromáticos: Fenilalanina + Tirosina.

6.3.2 Perfil electroforético del APSC

Los perfiles electroforéticos del APSC se muestran en la Figura 4. Este presentó un patrón de bandeo similar en condiciones reductoras y no reductoras. Presentó bandas desde ~217 a ~10kDa. Resultados similares han sido reportados previamente, en un rango de 15 a 110 kDa en *Cucurbita moschata* var. Kashi Harit (Vinayashree & Prasanna, 2020), 14.4 a 116 en *Cucurbita maxima* (rezig *et al.*, 2013). Por otra parte, el APSC exhibió bandas predominantes, una banda concentrada en 20 a 27 kDa y otra en 10 a 14 kDa. Esta última puede ser atribuida a la fracción proteica “albúminas”, las cuales han sido identificadas y reportadas previamente en un rango de 100 a 20 kDa, y en valores menores de 10 kDa se presentan con bandas más oscuras (Vinayashree & Prasanna, 2020). Las bandas obtenidas a <10 kDa, pueden ser atribuidas a la 2s albumina con peso molecular de 12.5 kDa. Por otra parte, las bandas obtenidas en ~50 y ~20 kDa, pueden indicar la presencia de globulina 11s, debido a que presenta un peso molecular de 50 a 60 kDa, la cual está compuesta por un polipéptido ácido a ~40 kDa y uno básico a ~20 kDa, unidos por puentes disulfuro (Blagrove & Lilley, 1980). La globulina 11s ha sido reportada ser homóloga a las semillas de leguminosas (globulinas 11s y 12s) (Rezig *et al.*, 2013). Además, estas últimas han sido reportadas ser homólogas a las glutelinas (Kawakatsu & Takaiwa, 2019). Cabe señalar que Herrera *et al.*, (2016) reportaron que las glutelinas son una familia de proteínas tipo globulinas con una estructura hexamérica de 300 kDa, debido a que la fracción de las globulinas 11s tiende a mostrar una alta similitud en los pesos moleculares con las glutelinas.

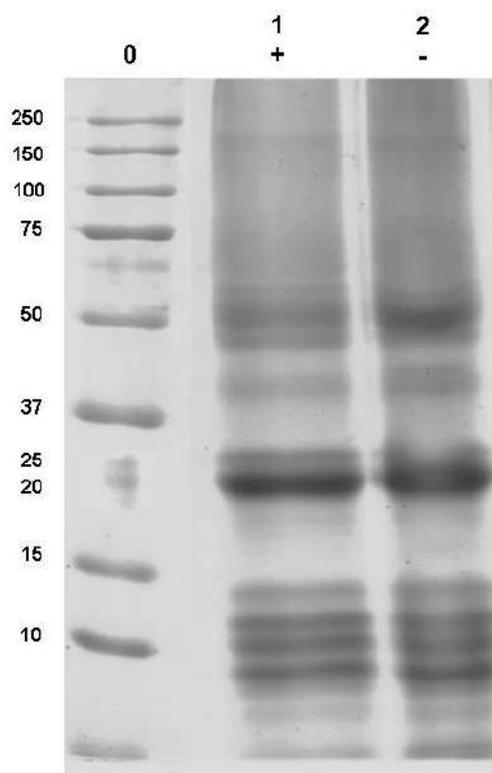


Figura 4. Patrón electroforético del aislado proteico de semillas de calabaza (APSC, líneas 1, APSC en condiciones reductoras; 2, APSC en condiciones no reductoras). La proteína estándar fue incluida como marcador de peso molecular (línea 0).

6.3.3 Patrón electroforético de las fracciones del APSC

En la Figura 5 se presentan los perfiles electroforéticos de las fracciones de albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Albuminas y globulinas tuvieron ligeras diferencias en su perfil de composición de polipéptidos, en condiciones reductoras y no reductoras, presentando bandeos a 56, 53, 51, 45, 27, 24, 17, 15, 12 y >10 kDa para albuminas y a 56, 52, 49, 45, 28, 24, 18, 15, 13 y 10 kDa para globulinas, en condiciones no reductoras.

Por otra parte, cabe resaltar que en condiciones reductoras para ambos casos hubo presencia de puentes de disulfuro, puesto que pudo observarse que para las albuminas después en condiciones reductores, el patrón de bandas a 56 y 53 kDa se disocia en tres bandas de polipéptidos de menor tamaño, a 49, 29 y 24kDa. Por último, las bandas de menor tamaño molecular evidenciaron también presencia de puentes disulfuro al disociarse el bandeo de 17,

15, 12 y >10 kDa en 14, 13 y >10 kDa evidenciando también la presencia de puentes de disulfuro en la proteína

Por su parte, las globulinas debido a la presencia de puentes de disulfuro, las bandas principales parecían estar reducidas en 50, 28 y 24 kDa. También se observó, una migración de proteínas en pesos moleculares de menor peso, indicando la presencia de puentes de disulfuro. Este perfil en condiciones reductoras y no reductoras podría corresponder al patrón característico de una globulina 11S con seis subunidades alrededor de 50-60 kDa, compuestas por cada uno de dos polipéptidos, uno ácido alrededor de 40 kDa y otro básico alrededor de 20 kDa, unidos por puente disulfuro. Por último, Vinayashree y Prassana (2020) tuvieron un bandeo con bandas más claras en el rango de 110 a 20 kDa y bandas más oscuras con un peso molecular inferior a 10 kDa, en *Cucurbita moschata*. En el caso de prolaminas no hubo presencia de bandas.

En cambio, en el extracto alcalino que corresponde a nuestra principal fracción proteica de las glutelinas, podemos evidenciar bandas con mayor peso molecular en 120, 80, 53, 43, 27 y 23 kDa, así mismo, presento tinción en bandas menores a 14, 12, 11 y >10 kDa. En condiciones reductoras, se presentó bandas con tinción en 100, 75, 65 55, 49, 43, 28, 24, kDa y bandas menores de 15, 13, 12, 10 y >10 kDa. Se evidencia la presencia de puentes de disulfuro al verse reducido las bandas de 120, 80, 53 en bandas menores como 100, 75, 65 55, 49, 43 y en 28 y 24 kDa, estas dos últimas presentaron mayor tinción, acentuando la presencia de puentes disulfuro. El perfil de las glutelinas presentó pesos moleculares similares a la globulina 11s, como se describe anteriormente. Herrera *et al.* (2016) reportaron que las glutelinas son una familia de proteínas tipo globulinas, debido a que la fracción de las globulinas 11s tiende a mostrar una alta similitud en los pesos moleculares con las glutelinas. Así mismo, estos mismos investigadores describieron bandas principales en 90, 70, 40, 30, 28, 23, 22, 17, 14, 12, 11 kDa, en *Cucurbita argyrosperma sororia*, dichas bandas son similares a las observadas en la fracción proteica mayoritaria de las glutelinas el presente trabajo. En condiciones reductoras, la fracción glutelinas presentó bandas en 40, 23-22 y 17 kDa, principalmente.

Por último, estas ligeras diferencias en el peso molecular de las proteínas de cada fracción proteica de *Cucurbita argyrosperma* Huber respecto a otras especies miembros de la familia Cucurbitaceae, pueden ser atribuidas a su posición en diferentes tribus (área de cultivación) como indican Rezig *et al.* (2013).

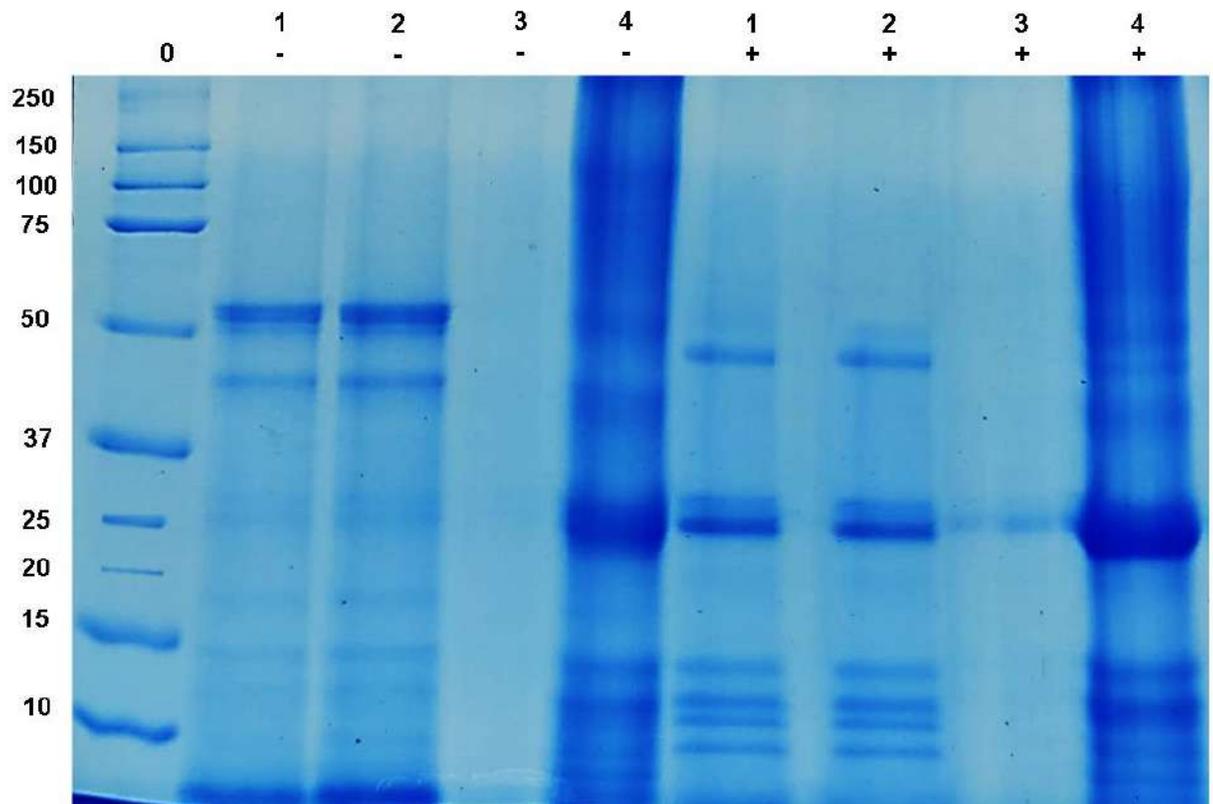


Figura 5. Perfiles electroforéticos de las fracciones proteicas del APSC en condiciones no reductoras línea 1-4 (-) y reductoras 1-4 (+). Columna 0, marcadores proteínicos estándar con pesos moleculares entre 10–250 kDa; columna 1, fracción albúmina; columna 2, fracción globulina; columna 3, fracción prolamina; columna 4, fracción glutelina.

6.3.4 Hidrofobicidad superficial (H_0 -ANS)

La hidrofobicidad superficial (H_0 -ANS) es un indicador importante para la caracterización de las propiedades funcionales de las proteínas relacionadas con la superficie (Gong *et al.*, 2016) y se basa en las características superficiales de una proteína y está relacionada con el grado

en que los aminoácidos hidrofóbicos están expuestos en la superficie de las moléculas de proteína y se ve afectada por el despliegue y la desnaturalización de las proteínas (Timilsena *et al.*, 2016). La hidrofobicidad superficial influye en las interacciones intermoleculares proteína-proteína y proteína-lípido. Generalmente, una H_0 -ANS más alta siempre da como resultado un aumento en la capacidad y actividad de formación de espuma y de emulsión de las proteínas (Nakai S. , 1983; Zhao *et al.*,2021). Por otra parte, se ha informado que la H_0 -ANS se asocia en algunos casos con el valor de solubilidad, donde valores altos de este último está relacionado con un menor número de residuos hidrófobos (menor valor de H_0 -ANS) (Moure *et al.*, 2006).

Como se muestra en la Figura 6 el APSC presentó su máximo de H_0 -ANS a pH 3 (489.2 ± 2.31), seguido de pH 7 (8.64 ± 0.41) y por último pH 9 (7.12 ± 0.37), donde estos dos últimos no tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$). De manera general, los valores altos de H_0 -ANS están relacionados una mayor exposición de residuos de aminoácidos aromáticos y alifáticos mientras que valores bajos están relacionados a las agregaciones de proteínas que se dan a punto isoeléctrico, ya que, los residuos hidrofóbicos se ocultan dentro de los agregados y son menos accesibles para la sonda ANS (Jarpa-Parra *et al.*, 2015). Estos resultados observados donde pH 3 presentó el máximo valor de H_0 -ANS por encima de pH 7 y pH 9 ($pH\ 3 > pH\ 7 < pH\ 9$) están relacionado con una mayor exposición de regiones hidrofóbicas de proteínas a pH 3.0 (Ge *et al.*, 2021). Por otra parte, se debe agregar que el ANS como sonda aniónica podría interactuar con sitios cargados positivamente en las proteínas a pH bajo, lo que da como resultado una sobreestimación de la hidrofobicidad hasta cierto punto (Ge *et al.*, 2021). Resultados similares fueron obtenidos por Jarpa-Parra *et al.* (2015), quienes obtuvieron una mayor solubilidad e hidrofobicidad superficial a pH 3.0 que a pH 7.0 para proteína de lenteja.

La H_0 -ANS presente en este trabajo resulto ser menor al reportado para *Cucurbita pepo* (4793.20) (Pham *et al.*, 2017), esta diferencia entre resultados puede deberse a un mayor número de grupos hidrofóbicos expuestos al ambiente hidrofílico de los autores contrastados.

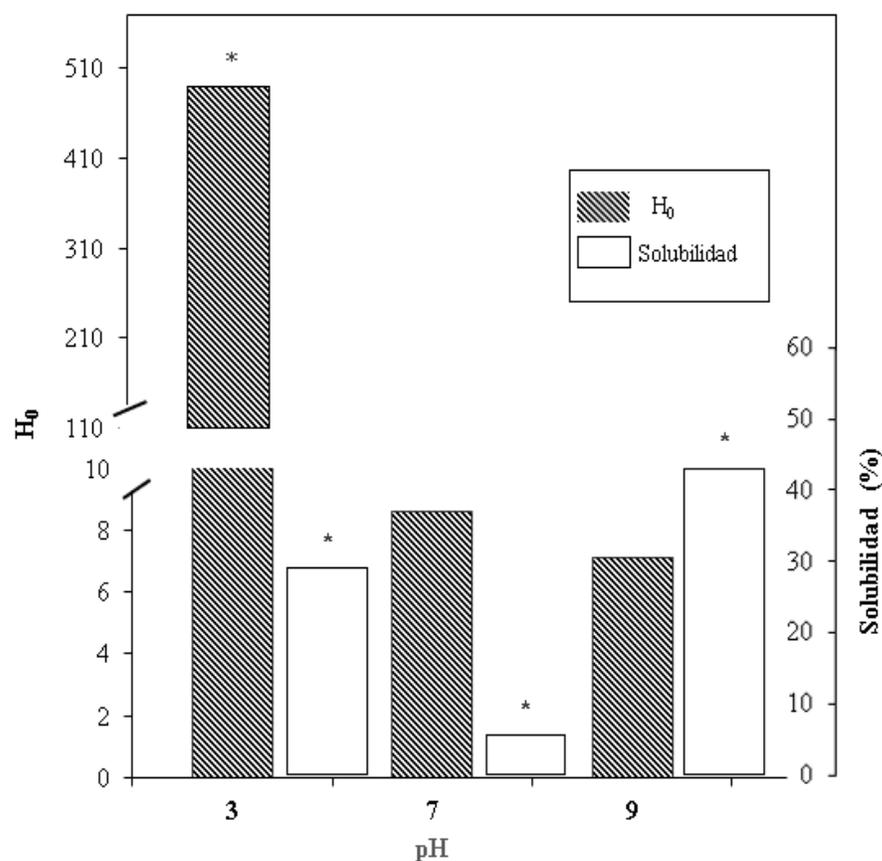


Figura 6. Hidrofobicidad superficial (H_0 -ANS) de aislados de proteína de semillas de calabaza. Los resultados son la media de $n=3 \pm$ la desviación estándar. Las diferencias significativas se marcan con * ($p < 0.05$).

6.3.5 Propiedades térmicas

Los componentes de los alimentos sufren ciertos cambios en sus propiedades físicas y químicas por el calor y estos cambios determinan las propiedades térmicas de los alimentos (Kumar *et al.*, 2022). Después de un proceso de calentamiento, los enlaces intermoleculares entre las proteínas se rompen y las proteínas se transforman en su forma desnaturalizada (Brishti *et al.*, 2017). La desnaturalización de proteínas regularmente se detecta como un pico endotérmico en el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Gundogan y Karaca, 2020).

Las propiedades térmicas del APSC a tres pH (3, 7 y 9) son presentadas en la Tabla 7 y el termograma para cada pH del APSC en la Figura 7. El APSC fue evaluado en términos de la temperatura inicial (T_0) esta se define como la temperatura de inicio de desnaturalización, la temperatura de desnaturalización térmica (T_d) que comúnmente indica la estabilidad térmica de una proteína y de la entalpía (ΔH) que representa la extensión de la estructura ordenada de una proteína (Tang, Du y Fu, 2021). Mientras que el APSC en pH 3 mostro la mayor T_d con 188.25°C, el APSC a pH 9 mostro la menor T_d con 157.99°C. Gundogan y Karaca (2020) mencionan que los altos índices de T_d en los aislados proteicos puede estar relacionado con una mayor cantidad de aminoácidos de tipo hidrofóbicos. El perfil de aminoácidos del APSC indico un alto contenido de aminoacidos hidrofobos teniendo como principales a Ile, Phe y Val que han sido relacionados de ser responsables de una proteína más estable, porque estos aminoácidos son responsables de un núcleo interior más compacto de la proteína (Horax *et al.*, 2011). Todavía cabe señalar que los resultados obtenidos para T_d pueden estar asociados a la H_0 -ANS, puesto que, al incrementarse el valor de H_0 -ANS la T_d también incrementaba. Teniendo pH 3 con mejores valores de H_0 -ANS y de T_d , seguido de pH 7 y pH 9.

Por otra parte, la T_d nos da información sobre las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas respecto al rompimiento de puentes de hidrógeno que sirven de soporte para mantener la estructura secundaria de las proteínas, también nos indica la estabilidad térmica, mientras más alto sea el contenido de enlaces disulfuro en la proteína mayor será su estabilidad (Gundogan y Karaca, 2020).

Tabla 7. Efecto del pH en las propiedades térmicas del aislado proteico de semillas de calabaza.

APSC	T_0 (°C)	T_d (°C)	ΔH (J/g)
pH 3	187.95	188.25	53.54
pH 7	177.54	178.24	150.50
pH 9	151.11	157.99	53.04

T_0 : temperatura inicial; T_d : Temperatura de desnaturalización; ΔH : entalpía de desnaturalización.

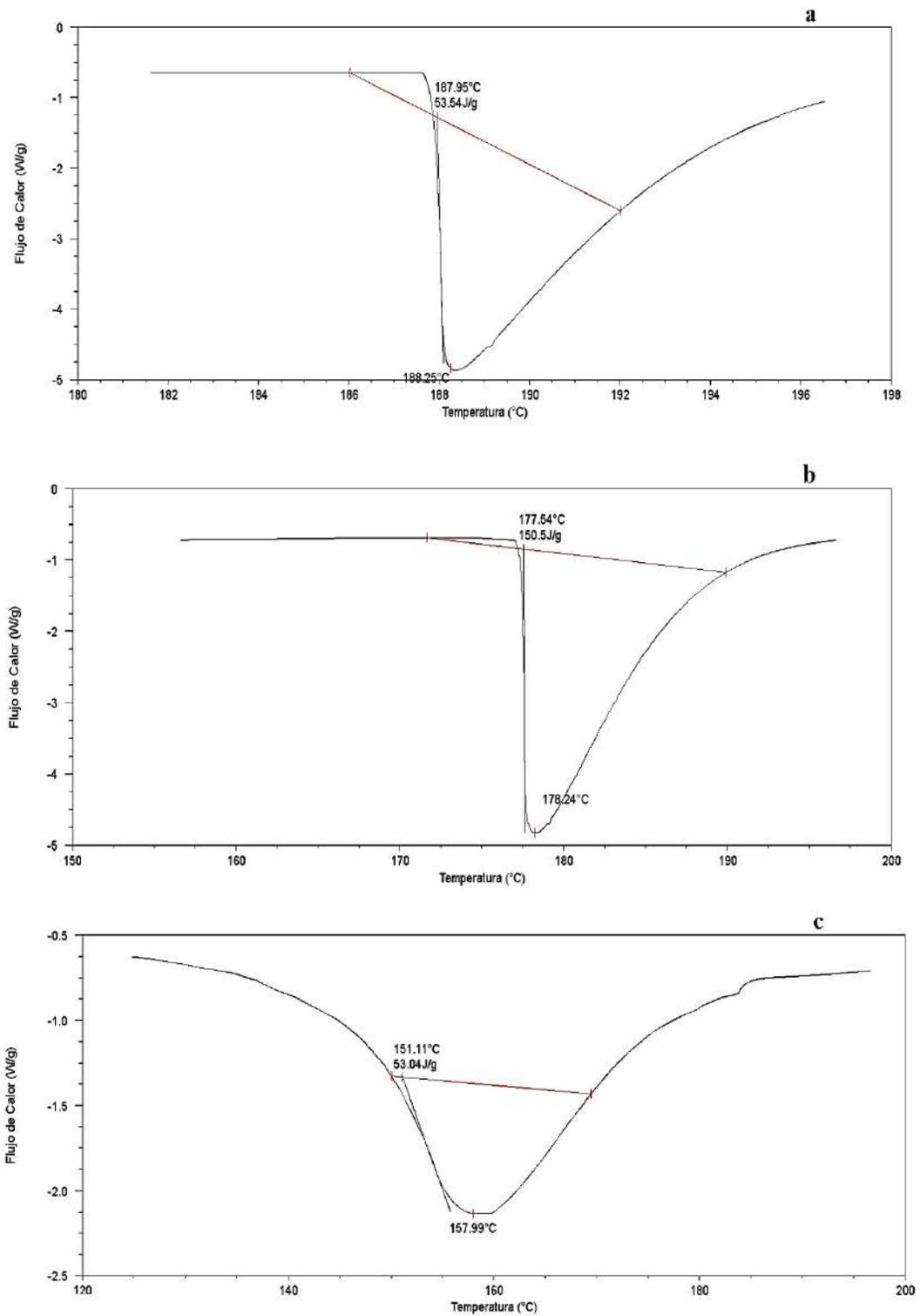


Figura 7. Termogramas de DSC del aislado proteico de semillas de calabaza a tres pH: pH 3 (a), pH 7 (b) y pH 9 (c).

6.3.6 Espectroscopia FTIR

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se basa en la absorción de radiación infrarroja por enlaces dentro de grupos funcionales químicos, lo que resulta en movimientos vibratorios de moléculas como contracción y flexión y genera un espectro con cambios en la vibración (Marimuthu y Gurumoorthi, 2013). La espectroscopia FTIR es una herramienta importante para estimar la estructura secundaria de la proteína en cualquier estado físico (sólido, líquido) (Du *et al.*, 2018). Las bandas características de absorción de IR que se aprecian en las proteínas son: amida A, B, I, II, III, IV, V, VI y VII (Zhou *et al.*, 2017). Donde la región espectral más importante de la estructura secundaria de una proteína es la banda amida I que se ubica entre 1600 y 1700 cm^{-1} ; esta banda proporciona información de la estructura secundaria de la proteína como α -hélice (1648 - 1640 cm^{-1}), hoja- β (1636 - 1602 cm^{-1}), giro- β (1695 - 1660 cm^{-1}) y espiral al azar (1657 - 650 cm^{-1}) (Resendiz-Vazquez *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Los contenidos de la estructura secundaria del APSC se muestran en la Tabla 8 mientras que el espectro infrarrojo y la deconvolución de la banda amida I se muestran en las Figuras 8 y 9, respectivamente.

El APSC a pH 3 estuvo compuesto por 42.88 % de Hoja- β , 18.13 % de Giro- β , 21.63 % de α -hélice y 17.36 % de espiral al azar. Para pH 7 tuvo contenidos de 37.61% de Hoja- β , 30.32% de Giro- β , 12.94% de α -hélice y 19.13% de espiral al azar. Por último, pH 9 obtuvo valores de 29.98% de Hoja- β , 29.70% de Giro- β , 17.38% de α -hélice y 22.94% de espiral al azar. Los resultados indican que para los tres pH se tuvo mayor proporción de hoja- β que de α -hélice, lo cual está relacionado con proteínas tipo globulares. Por otra parte, la proporción de hoja- β y giro- β se ha relacionado con la digestibilidad de las proteínas, y una disminución de la lámina β o un incremento de espiral al azar contribuye a aumentar la digestibilidad de las proteínas (Sosa *et al.*, 2021).

Después de hoja- β el segundo componente más alto fue giro- β este esta relacionado con la flexibilidad de las proteínas y contribuye a una mejor estabilización de la emulsión de agua y aceite, aumentando la capacidad de emulsión de las proteínas (Nguí *et al.*, 2021).

Resultados similares han sido reportados en *Cucurbita moschata* (Vinayashree y Vasu, 2021).

Tabla 8. Efecto del pH en la estructura secundaria del APSC.

APSC	Estructura Secundaria (%)			
	Hoja- β	Giro- β	α -hélice	Espiral al azar
pH3	42.88	18.13	21.63	17.36
pH 7	37.61	30.32	12.94	19.13
pH 9	29.98	29.70	17.38	22.94

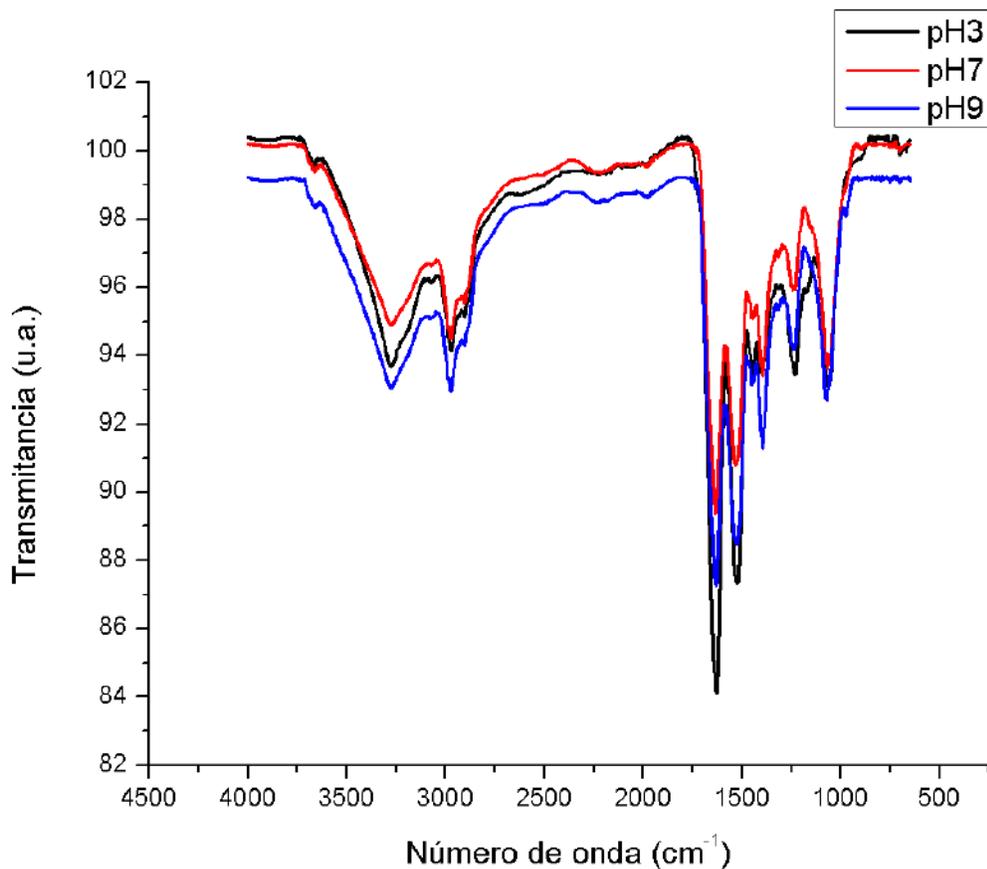
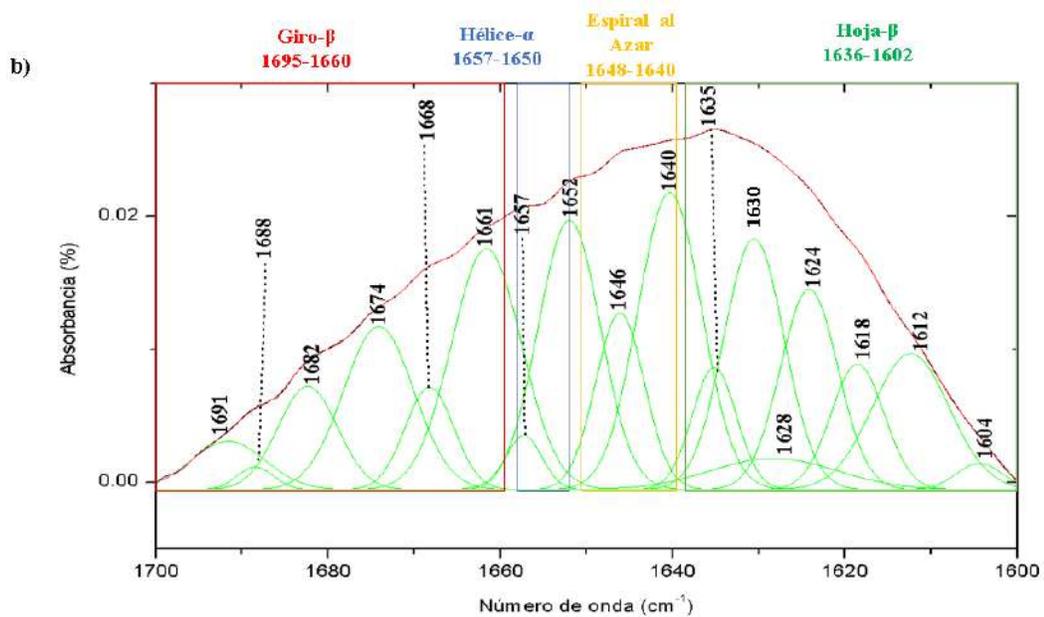
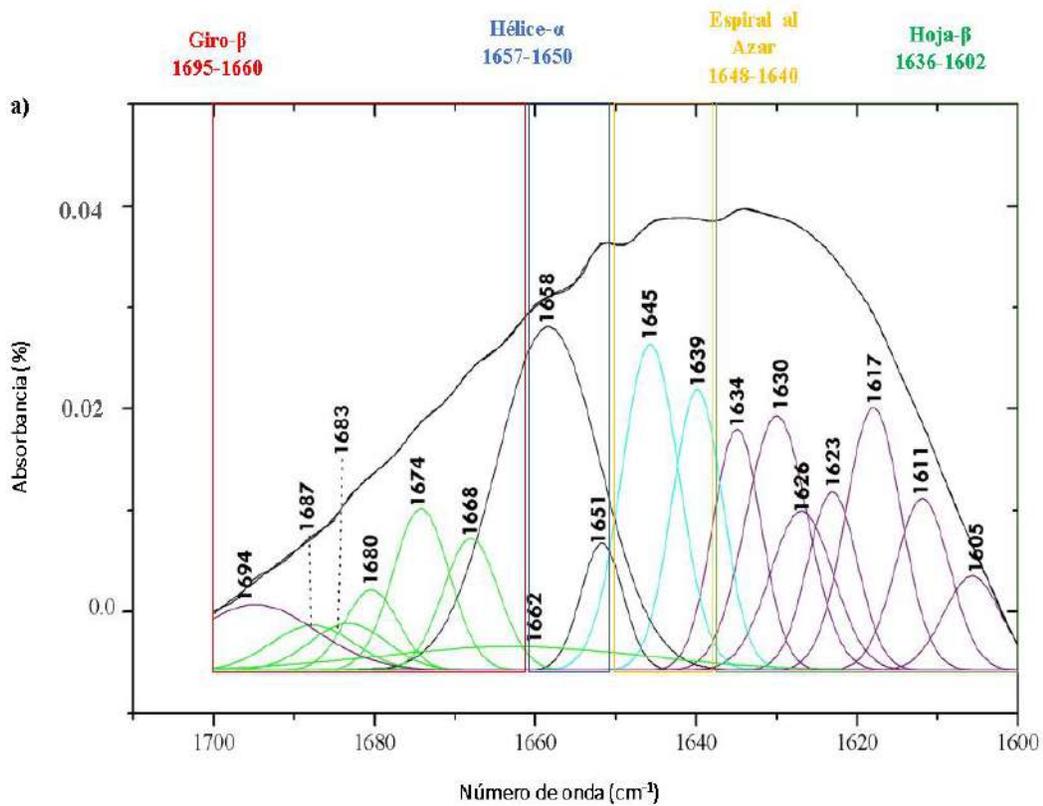


Figura 8. Espectro de FTIR del APSC en tres pH (3, 7 y 9).



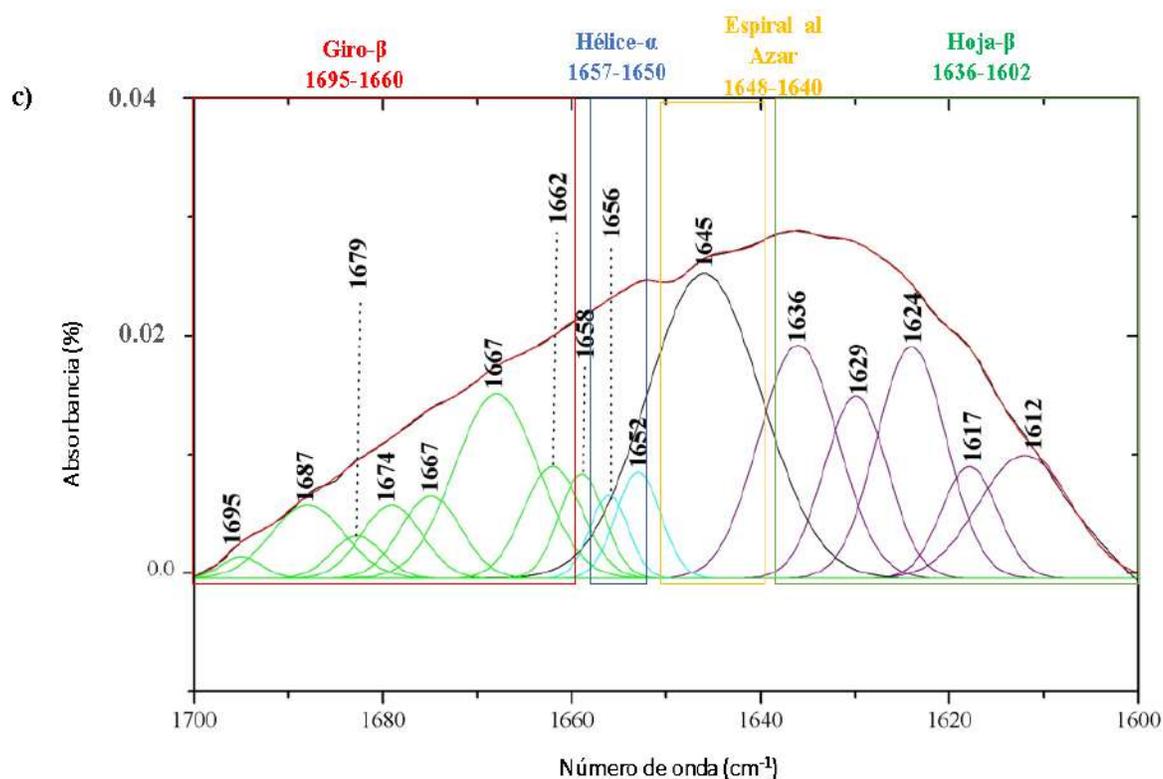


Figura 9. Análisis de deconvolución de la banda amida I del espectro de APSC a diferente pH (3, 7 y 9).

6.4 Propiedades tecno-funcionales

6.4.1 Capacidad de absorción de agua (CAA) y de aceite (CAAc)

La CAA se define como la habilidad de la proteína de retener físicamente el agua en su estructura tridimensional durante la aplicación de fuerzas tales como prensado, centrifugación o calentamiento (Zayasb, 1997). Esta propiedad se basa en la interacción directa de moléculas de proteínas con agua y otros solutos y depende de los aminoácidos hidrófilos e hidrófobos y la proporción de estos en la molécula de proteína, entre otros factores (Aryee *et al.*, 2018; Vinayashree y Vasu 2020).

En este estudio, el APSC mostro un valor de CAA para pH 3 de 1.27 g H₂O g⁻¹ de proteína, para pH 7 fue de 1.22 g H₂O g⁻¹ de proteína y por último para pH 9 de 1.20 g H₂O g⁻¹ de proteína (Tabla 9). Este último valor fue similar al reportado por Vinayashree y Vasu (2020)

con 1.29 g H₂O g⁻¹ de proteína del aislado proteico de semillas de calabaza (*Cucurbita moschata*). Otro trabajo reportado fue el de Steffolani *et al.* (2016) que trabajaron con quinua Kurmi, donde obtuvieron valores para la quinua Jacha de 4.73, 4.31 y 4.23 para pH 3, 7 y 9, respectivamente.

La composición de aminoácidos, conformación, hidrofobicidad, pH, temperatura, fuerza iónica y concentración de proteínas son parámetros que están estrechamente asociados a la CAA en las proteínas, el cual podría explicar diferencias entre un resultado a otro (Moure *et al.*, 2006; Vinayashree y Vasu 2020). Por su parte la composición de aminoácidos del APSC evidencio una mayor proporción mayor proporción de aminoácidos hidrofóbicos (46.94%) que hidrofílicos (38.25%), que limitaría la CAA, puesto que Shen *et al.* (2021) reportó que una mayor proporción de aminoácidos hidrofílicos mejoraría la CAA. A cerca de los resultados de H₀-ANS se esperaba que pH 9 mostrará mejor CAA por ser el que presento el menor valor de H₀-ANS, no obstante pH 3 mostró la mejor CAA (aunque mínimo) respecto a pH 7 y 9 y puede estar relacionado por su mayor porcentaje de α -hélice (21.63%) que en pH 7 (12.94 %) y pH 9 (17.38 %), debido a que la estructura secundaria α -hélice está correlacionado con la solubilidad, mayor porcentaje de estructura α -hélice mejor solubilidad (Resendiz-Vazquez *et al.*, 2019).

A su vez, la CAAC es una medida de la cantidad de aceite absorbido por peso de polvo (proteína). Donde el alto contenido de aminoácidos no polares o hidrófobos en las proteínas de origen vegetal es importante para que se unan a las cadenas de hidrocarburos, lo que explica su alto CAAC (Aryee y Boye, 2017).

Los resultados para CAAC mostraron que pH 9 exhibió el valor más alto con 1.40 g aceite g⁻¹ de proteína, seguido de pH 3 con 1.33 g aceite g⁻¹ de proteína y por último pH 7 con 1.17 g aceite g⁻¹ de proteína (Tabla 9). Estos valores son menores a los reportados por Vinayashree y Vasu 2020 que obtuvieron 3.59–3.70 g aceite g⁻¹ de proteína en su aislado proteico de semillas de calabaza (*Cucurbita moschata*) a pH 9 y a los reportados por Steffolani *et al.* (2016) en quinua Kurmi con 3.47 en pH 9. Cabe señalar que, aunque el APSC a valor de pH 3 tuvo el mayor índice de H₀-ANS, en comparación de valores de pH 7 y 9, dicha muestra a pH 3 no mostró un valor significativamente mayor para la CAAC. Lo anterior se debe a que

la CAAC no solo depende de la H₀-ANS, si no, que también se ve afectada por grupos lipofílicos, características conformacionales y compuestos no proteicos en la preparación de proteínas (Pham *et al.*, 2017). La CAAC se ve afectada por la fuente, el tamaño y la concentración de proteínas, el número de aminoácidos apolares, el método de procesamiento y las interacciones proteína-lípido (Aryee *et al.*, 2017).

Su funcionalidad en la industria alimentaria es bien sabido, puesto que, se conoce que la CAA y la CAAC de las proteínas están relacionadas con la textura, la sensación en la boca y la retención del sabor de los productos. Una proteína con alto CAA es beneficiosa para reducir la pérdida de humedad en productos de panadería empaquetados, mantener la frescura y la sensación húmeda en la boca de los alimentos horneados y juega un papel trascendental en la formación de su textura, proporcionando de este modo cuerpo, engrosamiento y viscosidad al producto (Zayasb, 1997; (Ulloa *et al.*, 2011); Aryee *et al.* 2018).

Tabla 9. Capacidad de absorción de agua, aceite y capacidad emulsificante del aislado proteico de semillas de calabaza.

Propiedad Funcional	APSC		
	pH 3	pH 7	pH 9
CAA (g H ₂ O g ⁻¹ proteína)	1.27 ± 0.01 ^a	1.22 ± 0.10 ^a	1.19 ± 0.06 ^a
CAAC (g aceite g ⁻¹ proteína)	1.33 ± 0.04 ^b	1.17 ± 0.05 ^b	1.40 ± 0.16 ^b
Capacidad emulsionante (mL aceite g ⁻¹ proteína)	75 ± 0.82 ^d	92 ± 4.89 ^e	137.67 ± 1.25 ^f

Los resultados son la media de n=3 ± la desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

6.4.2 Capacidad emulsificante (CE)

La CE es la cantidad de volumen en mL de aceite que es emulsificado por gramo de proteína. Este ensayo se caracteriza por una visualización de inversión de fase, donde la emulsión de aceite de aceite en agua cambia en agua en aceite. Este cambio de fase se obtiene al agregar

de manera gradualmente mL de aceite a la proteína y se registra el volumen con el cual se logra obtener dicha inversión de fases (Saucedo *et al.*, 2020).

Los valores reportados para capacidad emulsificante para el APSC se reportan en la Tabla 9, donde para pH 3 la capacidad emulsificante fue de 75.0 ± 0.8 mL aceite g^{-1} proteína, a pH 7 de 92.0 ± 4.9 mL aceite g^{-1} proteína y para pH 9 de 137.6 ± 1.3 mL aceite g^{-1} proteína. Este aumento progresivo en la capacidad emulsificante en función del incremento de pH puede sugerir que el tamaño de las gotas disminuye con el aumento del pH más allá del punto isoeléctrico (Chavan *et al.*, 2001; Atuonwu y Akobundu, 2010). Así mismo, el efecto del pH tiene un rol indirecto con la capacidad emulsificante, debido a que afecta la solubilidad de la proteína, su conformación y sus propiedades superficiales (Zayas, 1997). Ferreyra *et al.*, (2007) publicaron que las proteínas con bajas solubilidades en el punto isoeléctrico pueden afectar negativamente la capacidad emulsionante, puesto que, las proteínas tienden a formar una estructura compacta que no permite el desdoblamiento y absorción en la interfase, que no es ideal en una emulsión. Todavía cabe señalar que se puede atribuir la máxima CE en pH 3 principalmente por su índice H_0 -ANS (Figura 6), debido que, fue mucho mayor comparada con la de pH 7 y 9 que obtuvieron valores más bajos y similares, siendo este último ligeramente superior.

Dentro de los reportes de resultados previos sobre capacidad emulsificante de proteínas de semillas de vegetales se encuentran las semillas de ajonjolí (pH 3, 130 mL aceite g^{-1} proteína; pH 7, 140 mL aceite g^{-1} proteína; pH 9, 190 mL aceite g^{-1} proteína), semillas de frijol castilla (*Vigna unguiculata*) (pH 3, 70 mL aceite g^{-1} proteína; pH 7, 50 mL aceite g^{-1} proteína; pH 9, 90 mL aceite g^{-1} proteína) y semillas de Ginkgo (pH 3, 52 mL aceite g^{-1} proteína; pH 7, 57 mL aceite g^{-1} proteína; pH 9, 62 mL aceite g^{-1} proteína) reportados por Khalid *et al.*, (2003), Rabag *et al.*, (2004) y Deng *et al.* (2011), respectivamente. Se debe agregar que los valores del APSC para CE se encuentran dentro del intervalo de valores reportados para los aislados de semilla ya mencionados.

6.4.3 Actividad emulsionante (AE) y estabilidad emulsionante (EE)

La capacidad de las proteínas vegetales para facilitar la formación y estabilización de emulsiones es importante, debido que, tienen su participación como ingredientes alimentarios para varios productos alimenticios, incluidos salsas, aderezos, leches, postres, masas para pasteles y carnes trituradas (Ghribi *et al.*, 2015; Pezeshk *et al.*, 2021) y estas se ven afectadas principalmente por la solubilidad, la carga superficial neta y la H_0 -ANS (Jiang, Xiong, y Chen, 2011; Shevkani *et al.*, 2015; Ge *et al.*, 2021).

La AE y la EE del APSC se muestran en la Figura 10. En el presente trabajo, se observó mayor AE para el APSC a pH 3 ($61.13\% \pm 1.27$) seguido del pH 7 ($46.41\% \pm 3.43$) y por último pH 9 ($35.68\% \pm 3.32$), estos resultados fueron completamente lo contrario con la capacidad emulsionante teniendo a pH 9 el valor más alto de CE, luego pH 7 y por último pH 3 (Tabla 9), debido que Zayas (1997) menciona que el efecto del pH tiene un rol indirecto con la capacidad emulsificante, puesto que afecta la solubilidad de la proteína, su conformación y sus propiedades superficiales.

En cuanto a la EE se tuvo valores similares a la actividad emulsionante, teniendo el valor más alto de igual forma en pH 3 ($60.83\% \pm 3.20$), pH 7 ($44\% \pm 3.36$) y por último pH 9 ($38.33\% \pm 1.44$). Para que una proteína sea un buen emulsionante, tiene que haber un equilibrio óptimo entre los grupos hidrófilos e hidrófobos para que la molécula de proteína pueda difundirse rápidamente en la interfaz aceite/agua y cambiar su conformación para adsorber y reducir la tensión interfacial (Gundogan y Karaca, 2020). Para el perfil de aminoácidos se tuvo mayor inclinación a los grupos hidrófobos (46.94 %) que grupos hidrófilos (38.25 %), además otro factor determinante en la AE y la EE es la H_0 -ANS, puesto que, generalmente, una H_0 -ANS más alta siempre da como resultado un aumento en las propiedades emulsificantes (Vinayashree y Vasu, 2021; Zhao *et al.*, 2021). Ante esto, se ratifica que los valores de pH 3 en AE y EE son los especulados, debido a los resultados arrojados en la prueba de H_0 -ANS, donde pH 3 tuvo el valor más alto de H_0 -ANS respecto a pH 7 y pH 9. Cabe señalar, que las propiedades emulsificantes no solo se ven afectadas por el índice de solubilidad o la H_0 -ANS, también pueden verse afectadas por la masa molecular,

estabilidad de conformación, flexibilidad molecular, pH, fuerza iónica y temperatura (Vinayashree y Vasu, 2021).

Trabajos con condiciones similares han sido reportados, por ejemplo, Pérez-Saucedo *et al.*(2021) trabajaron con el aislado proteico de semilla de mango que obtuvo su valor más alto en condiciones ácidas (pH 2) para AE del 23% y EE del 20% mientras que en condiciones alcalinas (pH 10) mostró valores de 85% AE y 80% EE. Otro trabajo es el publicado por Resendiz-Vazquez *et al.* (2017) con semillas de jaca, donde en condiciones ácidas (pH 2) encontraron los menores valores para AE y EE con 60 y 90 %, respectivamente, mientras que en condiones alcalinas (pH 10) mostró su mejor AE y EE con 127% para ambos casos.

Se debe destacar, cuando las propiedades emulsionantes de una proteína son evaluadas, es muy importante especificar la concentración de proteína inicial para determinar la cantidad máxima de aceite que puede emulsificar (capacidad emulsificante) (Shen y Tang, 2014). Para posteriormente evaluar sus demás propiedades de emulsificación como la AE y la EE, entre otras. Esta primera indica la cantidad emulsionada por unidad de muestra, por su parte la EE mide la habilidad de la emulsión para resistir cambios en su estructura en un periodo definido. Por otra parte, Kato *et al.* (1985) reportaron que la AE de la proteína depende del área de las gotas de aceite disperso en la interfase, por lo tanto, es una función de la fracción de volumen de aceite de la emulsión y la concentración de proteína.

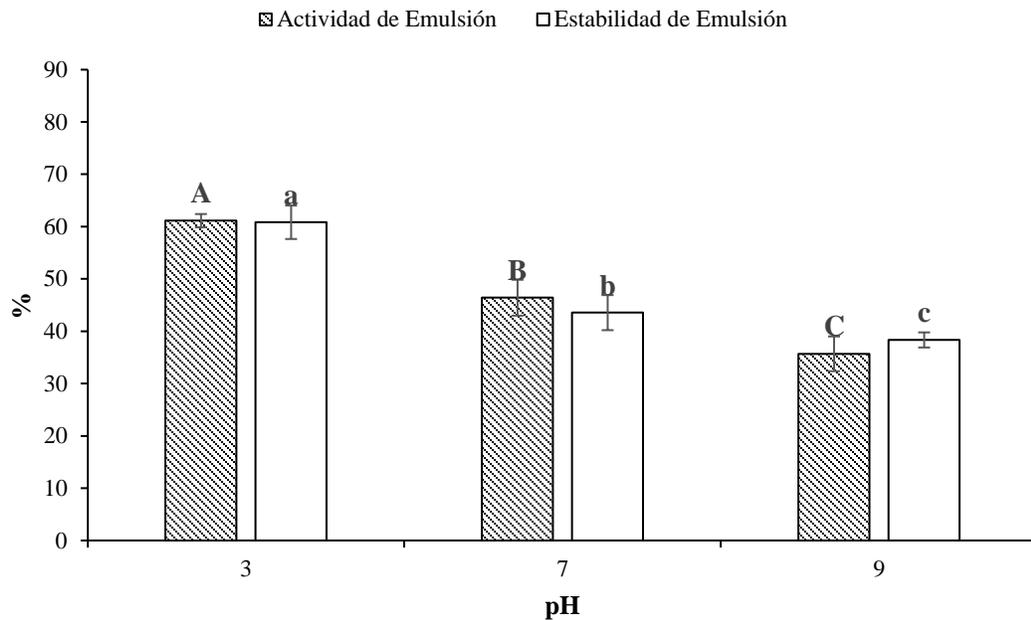


Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad (AE) y estabilidad emulsionante (EE) del aislado proteico de semillas de calabaza. Los resultados son la media de $n = 3 \pm$ la desviación estándar. Letras diferentes a lo largo de las barras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

6.4.4 Capacidad mínima gelificante (CMG)

La gelificación de proteínas inducida por calor es una propiedad funcional muy importante, debido a que determina las propiedades sensoriales y de textura en diversas aplicaciones alimentarias. Esta propiedad es de utilidad en la preparación de diversos productos (budín, jaleas, postres, productos lácteos y aplicaciones cárnicas) (Boye *et al.*, 2010). En general, la gelificación de proteínas globulares implica varios pasos como desnaturalización, agregación y formación de redes (Adebiyi y Aluko, 2011), donde los geles de proteína son formados por matrices tridimensionales, parcialmente asociadas con polipéptidos, en las cuales el agua es atrapada (Wu *et al.*, 2009). La concentración mínima de gelificación (CMG) se usa ampliamente para evaluar la capacidad de gelificación de las proteínas alimentarias, y un valor bajo de CMG indica una mejor capacidad de gelificación de la proteína (Ge *et al.*, 2021).

Los efectos del pH en la CMG son mostrados en la Tabla 10. La CMG del APSC en pH 3 fue de 17%, a pH 7 fue 18% y a pH 9 fue 15%. Pham *et al.* (2017) menciona que en pH alcalinos la CMG aumenta, debido a hay una mayor carga neta de las moléculas de proteína y una mayor repulsión electrostática entre las moléculas de proteína.

La CMG comparada con otros aislados proteicos, fue mayor, como en fracciones de semilla de calabaza (*Cucurbita pepo*) para albuminas con 12%, glubulinas 14% y glutelinas 12% (Pham *et al.*, 2017), la de nuez india con 13.5 % (Ogunwolu *et al.*, 2009) y en frijol negro con 12% (Ge *et al.*, 2021).

Tabla 10. Comportamiento gelificante del aislado de APSC a diferentes concentraciones de proteína y niveles de pH.

pH	Concentración APSC (% P/V)						
	13	14	15	16	17	18	20
3	-	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	+	+
9	-	-	+	+	+	+	+

(-) No gelificó; (+) Gelificó.

6.4.5 Capacidad espumante (CEs) y estabilidad espumante (EEs)

Tanto las propiedades de capacidad y estabilidad espumante de las proteínas juegan un papel importante en la producción de una variedad de alimentos, debido a que determinan su utilización en productos alimenticios, tales como: helados, pasteles, productos de panadería, galletas, bebidas y merengues (Zayas, 1997; Ge *et al.*, 2021). La capacidad de formación de espuma podría verse afectada por la solubilidad, la flexibilidad molecular, la conformación y el peso molecular de la proteína (Li *et al.*, 2021).

La Figura 11 muestra el efecto del pH sobre las propiedades espumantes del APSC. A medida que el pH aumentaba en el APSC se obtenían mejores resultados, siendo la máxima CEs en pH 9 ($30.33\% \pm 0.58$), seguido del pH 7 ($14\% \pm 2.65$) y por último pH 3 ($7.67\% \pm 2.08$). Una alta CEs es producto de una alta solubilidad, a pH 9 se obtuvo el valor más alto de

solubilidad (Figura 3). Además, no solo la alta solubilidad de las proteínas puede mostrar una alta CEs, también influyen factores como la alta carga superficial y excelente equilibrio de aminoácidos hidrofílicos-hidrofóbicos (Gundogan y Karaca, 2020), que este último para el APSC tuvo mayor inclinación a grupos hidrofóbicos que hidrofílicos (Tabla 6). Todavía cabe señalar, que la carga superficial neta aumenta la CEs al facilitar la absorción de proteínas en la interfaz aire-agua al tiempo que aumenta tanto la solubilidad como la flexibilidad de la proteína al reducir las interacciones hidrofóbicas entre proteínas (Gundogan y Karaca, 2020). Para la EEs, se encontró su máximo valor en pH 7 ($64.04\% \pm 1.79$), mientras que el mínimo se encontró en pH 3 ($30.63\% \pm 2.44$) y pH 9 ($51.29\% \pm 4.09$).

La proteína soluble es necesaria para la formación de espuma, ya que facilita la difusión, adsorción y propagación. Para convertirse en un buen agente espumante, una proteína debe poder adsorber aire rápidamente durante el burbujeo y también debe sufrir cambios conformacionales y reordenamiento en la interfaz aire-agua (Vinayashree y Vasu, 2021).

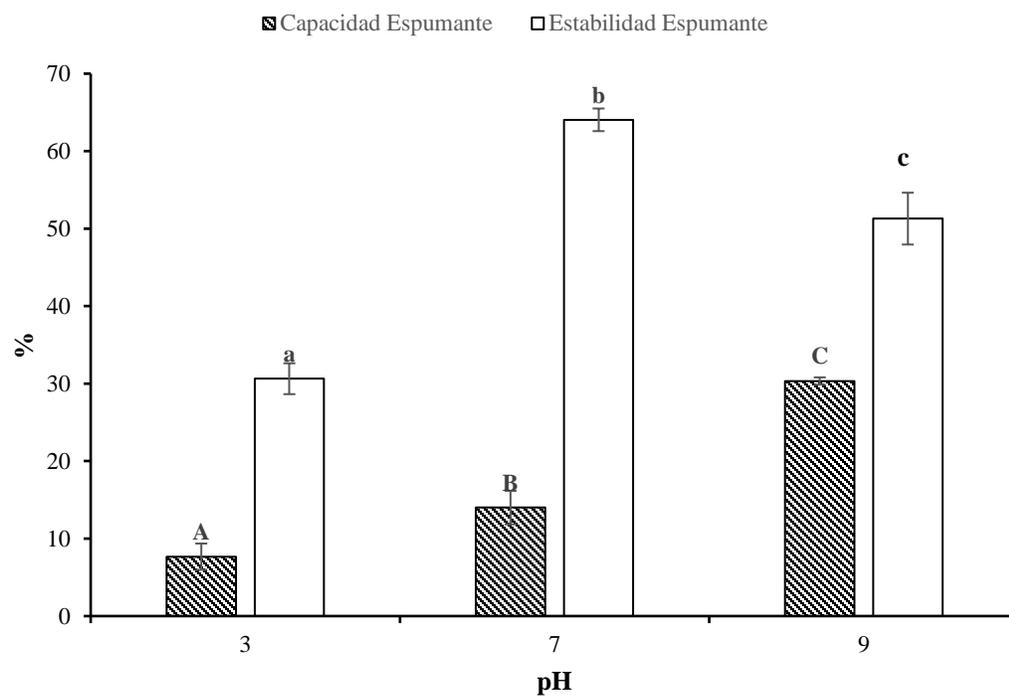


Figura 11. Efecto del pH sobre la capacidad (CEs) y estabilidad (EEs) espumante del APSC. Los resultados son la media de $n = 3 \pm$ la desviación estándar. Letras diferente a lo largo de las barras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

7 CONCLUSIONES

El presente trabajo reporta las propiedades fisicoquímicas, estructurales y tecnofuncionales del aislado proteico del subproducto de aceite de semillas de calabaza del género de *Cucurbita argyrosperma* Huber.

El APSC se obtuvo por extracción por punto isoeléctrico, el elevado contenido proteico obtenido por análisis proximal y el método de Bradford (93.92 y 87.56 %) permiten considerarlo un “aislado proteico”.

Se caracterizó fisicoquímica y estructuralmente el APSC, el cual tuvo su punto isoeléctrico en pH 5, el cual está acorde con la mayoría de las proteínas alimentarias vegetales. El fraccionamiento Osborne reveló que la fracción proteica más abundante en el APSC son las glutelinas. A su vez, el perfil de aminoácidos determinó que el APSC es rico en Phe, Val, Ile y Thr comparados con los requerimientos para adultos de la FAO/OMS. En lo que corresponde al perfil electroforético, se evidenció la presencia de puentes disulfuro en el APSC y en cuanto a la H_0 -ANS a pH 3 tuvo su valor más alto. El análisis térmico indicó que la T_d más alta fue a pH 3 (188.25 %), mientras que a pH 9 la mayor ΔH (150.50 %). La deconvolución en la banda amida I arrojó que la estructura secundaria más abundante en el APSC es la hoja- β .

Se determinó las propiedades tecnofuncionales del aislado proteico obtenido. La capacidad de agua y de aceite no tuvieron diferencias significativas entre los pH evaluados de 3, 7 y 9. La capacidad emulsionante en pH 9 fue la más alta y fue contraria a la AE y la EE, donde en condiciones ácidas (pH 3) encontró su mayor valor (61.13% \pm 1.27 y 60.83% \pm 3.20, respectivamente), además de una concentración mínima gelificante alta y una CE y EE con valores más altos en pH 9 y pH 7 de 30.33% \pm 0.58 y 64.04% \pm 1.79, respectivamente.

Estos resultados podrían ser beneficiosos para ofrecer un mejor conocimiento sobre las propiedades de las proteínas de semilla de calabaza, lo que permitiría la utilización innovadora de las proteínas como ingrediente en la elaboración de alimentos.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food research international*, 46(1), 360-369.
- Adebiyi, A., & Aluko, R. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128(4), 902-908.
- Alfawaz, M. (2004). Chemical composition and oil characteristics of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed kernels. *Food Science and Agriculture*, 2(1), 5-18.
- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. *The Association of Official Analytical Chemists*, 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.
- Aryee, A., & Boye, J. (2017). Comparative study of the effects of processing on the nutritional, physicochemical and functional properties of lenti. *Journal of food processing and preservation*, e12824.
- Aryee, A., Agyei, D., & Udenigwe, C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. *Proteins in food processing*, 27-45.
- Azurdia, C. (1999). Las cucúrbitas de Guatemala. *Tikalía*, 17, 41-58.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Ciudad de México: PEARSON.
- Beveridge, T., & Weintraub, S. E. (1995). Effect of blanching pretreatment on color and texture of apple slices at various water activities. *Food Research International*, 83-86.
- Biswal, A., Lenka, C., Panda, P., Yang, J., & Misra, P. (2021). Investigation of the functional and thermal properties of Mahua deoiled cake flour and its protein isolate for prospective food applications. *LW*, 110459.
- BLAGROVE, R., & LILLEY, G. (1980). Characterisation of cucurbitin from various species of the Cucurbitaceae. *European journal of biochemistry*, 103(3), 577-584.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Chapter 3 - Proteins. *Medical Biochemistry*, 21-71.
- Bouaziz, M., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2013). Chemical composition and some functional properties of soluble fibro-protein extracts from Tunisian date palm seeds. *African Journal of Biotechnology*, 1121-1131.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food research international*, 43(2), 414-431.
- Brishti, F. H., Zarei, M., Muhammad, S., Ismail-Fitry, M., Shukri, R., & Saari, N. (2017). Evaluation of the functional properties of mung bean protein isolate for development of textured vegetable protein. *International Food Research Journal*, 24(4), 1595-1605.

- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Petrović, L., & Milinković, J. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocolloids*, *60*, 271-278.
- Bučko, S., Katona, J., Popović, L., Vaštag, Z., Petrović, L., & Vučinić-Vasić, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, *64*(2), 609-615.
- CONABIO. (2012). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). *Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad*, 1-12.
- Damodaran, S. (2000). Aminoácidos, péptidos y proteínas. *Química de los alimentos.*, 383-511.
- Dar, A., Sofi, S., & Rafiq, S. (2017). Pumpkin the functional and therapeutic ingredient: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, *2*(6), 165-170.
- Deng, Y., Huang, L., Zhang, C., Xie, P., Cheng, J., Wang, X., & Li, S. (2019). Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein isolate. *Food chemistry*, 539-548.
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., & Xie, M. (2018). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, *76*, 131-140.
- Durante, M., Lenucci, M., & Mita, G. (2014). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (*Cucurbita* spp.): A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(4), 6725-6740.
- Fang, E., Wong, J., Lin, P., & Ng, T. (2010). Biochemical characterization of the RNA-hydrolytic activity of a pumpkin 2S albumin. *FEBS letters*, *584*(18), 4089-4096.
- Fathollahy, I., Farmani, J., Kasaai, M. R., & Hamishehkar, H. (2021). Characteristics and functional properties of Persian lime (*Citrus latifolia*) seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *LWT*, *140*, 1-9.
- Fellows, P. (2017). Properties of food and principles of processing. *Food Processing Technology*, 3-200.
- Fruhirth, G., & Hermetter, A. (2007). Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*(11), 1128-1140.
- Ge, J., Sun, C. X., Mata, A., Corke, H., Gan, R. Y., & Fang, Y. (2021). Physicochemical and pH-dependent functional properties of proteins isolated from eight traditional Chinese beans. *Food Hydrocolloids*, 1-9.
- Geranpour, M., Emam-Djomeh, Z., & Asadi, G. (2019). Investigating the effects of spray drying conditions on the microencapsulation efficiency of pumpkin seed oil. *Journal of food processing and preservation*, *43*(7), e13947.

- Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, S., & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, *187*, 322-330.
- Gohari, A., Farhoosh, R., & HADDAD, K. (2011). Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaka*) grown in Iran. *J. Agr. Sci. Tech*, *13*, 1053-1063.
- Gong, K., Shi, A., Liu, M., Liu, L., Hu, H., Adhikari, B., & Wang, Q. (2016). Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate. *Journal of Food Engineering*, *170*, 33-40.
- Gundogan, R., & Karaca, A. C. (2020). Physicochemical and functional properties of proteins isolated from local beans of Turkey. *LWT - Food Science and Technology*, *130*, 1-9.
- Herrera.Castillo, F. L., Mares-Mares, E., Del Rincon, M. C., Ordoñez, L. G., & León-Galván, M. F. (2016). ANALISIS PROTEOMICO PRELIMINAR DE LAS PROTEINAS DE RESERVA DE LA SEMILLA DE CHICAYOTA (*Cucurbita argyrosperma sororia*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *1(2)*, 430-435.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Kannan, A., & Chen, P. (2011). Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, *124*, 545-550.
- Ibraheem, N. A., Hasan, M. M., Khan, R. Z., & Mishra, P. K. (2012). Understanding Color Models: A Review. *ARPN Journal of Science and Technology*, 265-275.
- Jacobo-Valenzuela, N., Maróstica-Junior, M., Zazueta-Morales, J., & Gallegos-Infante, J. (2011). Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs. Cehualca: A Review. *Food Research International*, *44(9)*, 2587-2593.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Tian, Z., Zeng, H., Temelli, F., & Chen, L. (2015). Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *132*, 45-53.
- Jiang, J., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2011). Role of β -conglycinin and glycinin subunits in the pH-shifting-induced structural and physicochemical changes of soy protein isolate. *Journal of food science*, *76(2)*, C293-C302.
- Jiao, J., Li, Z., Gai, Q., Li, X., Wei, F., Fu, Y., & Ma, W. (2014). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food chemistry*, *147*, 17-24.
- KATO, A., FUJISHIGE, T., MATSUDOMI, N., & KOBAYASHI, K. (1985). Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. *Journal of Food Science*, *50(1)*, 56-58.

- Kaur, M., & Singh, N. (2005). Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food chemistry*, 403-411.
- Kawakatsu, T., & Takaiwa, F. (2019). Rice proteins and essential amino acids. *AACC International Press*, 109-130.
- Kinsella, J., & Melachouris, N. (1978). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 7(3), 219-280.
- Krimer-Malešević, V., Mađarev-Popović, S., Vaštag, Z., Radulović, L., & Peričin, D. (2011). Phenolic acids in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. In *Nuts and seeds in health and disease prevention*. *Academic Press*, 925-932.
- KUMARI, J., & DUBEY, R. (2016). Development of nutritious ice-creams from soymilk and pumpkin seed milk and evaluation of their acceptability. *Food Science Research Journal*, 7(1), 96-100.
- Ladjal-Ettoum, Y., Boudries, H., Chibane, M., & Romero, A. (2016). Pea, chickpea and lentil protein isolates: Physicochemical characterization and emulsifying properties. *Food Biophysics*, 11(1), 43-51.
- Lestari, B., & Meiyanto, E. (2018). A review: The emerging nutraceutical potential of pumpkin seeds. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 9(2), 92-101.
- Li, K., Fu, L., Zhao, Y. Y., Xue, S. W., Wang, P., Xu, X. L., & Bai, Y. H. (2020). Use of high-intensity ultrasound to improve emulsifying properties of chicken myofibrillar protein and enhance the rheological properties and stability of the emulsion. *Food Hydrocolloids*, 98, 105275.
- Li, X., Shi, J., Scanlon, M., Xue, J. S., & Lu, J. (2021). Effects of pretreatments on physicochemical and structural properties of proteins isolated from canola seeds after oil extraction by supercritical-CO₂ process. *LWT*, 1-9.
- Lin, C., & Zayas, J. F. (2010). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. *Journal of Food Science*, 52(5), 1308-1311.
- Lira, R., & Montes, S. (1994). Cucurbits (*Cucurbita* spp.). *Neglected crops*, 1492, 63-77.
- Lira, S. R. (1995). Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitáceas Latinoamericanas de Importancia Económica. In: *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools*. *International Plant Genetic Resources Institute*, 281.
- Longe, O., Farinu, G., & Fetuga, B. L. (1983). Nutritional value of the fluted pumpkin (*Telfaria occidentalis*). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 989-992.
- Marcone, M. (1999). Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Research International*, 32(2), 79-92.

- Marimuthu, M., & Gurumoorthi, P. (2013). Physicochemical and functional properties of starches from Indian Jack bean (*Canavalia ensiformis*), an underutilized wild food legume. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(1), 221-225.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. (2006). Functionality of oilseed protein products: a review. *Food research international*, 39(9), 945-963.
- Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(4), 676-683.
- Nakai, S., & Li-Chang, E. (1985). Structure modification and functionality of whey proteins: Quantitative structure-activity relationship approach. *Journal of Dairy Science*, 68(10), 2763-2772.
- Navarro-Cortez, R., Hernández-Santos, B., Gómez-Aldapa, C., Castro-Rosas, J., Herman-Lara, E., Martínez-Sánchez, C., & Rodríguez-Miranda, J. (2016). Development of extruded ready-to-eat snacks using pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) and nixtamalized maize (*Zea mays*) flour blends. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 409-422.
- Ngui, S. P., Nyobe, C. E., Bassogog, C., Tang, E., Minka, S. R., & Mune, M. (2021). Influence of pH and temperature on the physicochemical and functional properties of Bambara bean protein isolate. *Heliyon*, 7(8), e07824.
- Ogrodowska, D., Laaksonen, D., Tańska, M., Konopka, I., & Linderborg, K. (2020). Pumpkin oil addition and encapsulation process as methods to improve oxidative stability of fish oil. *LWT*, 124, 109142.
- Ogrodowska, D., Tańska, M., & Brandt, W. (2017). The influence of drying process conditions on the physical properties, bioactive compounds and stability of encapsulated pumpkin seed oil. *Food and Bioprocess Technology*, 10(7), 1265-1280.
- Ogunwolu, S., Henshaw, F., Mock, H., Santos, A., & Awonorin, S. (2009). Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. *Food chemistry*, 115(3), 852-858.
- Patel, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seeds as nutraceutical: a review on status quo and scopes. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6(3), 183-189.
- Peiretti, P., Meineri, G., Gai, F., Longato, E., & Amarowicz, R. (2017). Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural product research*, 31(18), 2178-2182.
- Pérez-Saucedo, M., Ulloa, J. A., Ulloa, P. R., Ramírez-Ramírez, J. C., Silva-Carrillo, Y., & Ulloa, R. (2021). Caracterización tecno-funcional de un concentrado proteínico obtenido de la semilla de mango (*Mangifera indica* L.). *Biotechnia*, 23(1), 120-126.

- Peričin, D., Radulović, L., Trivić, S., & Dimić, E. (2008). Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method. *Journal of Food Engineering*, 84(4), 591-594.
- Pezeshk, S., Rezaei, M., Hosseini, H., & Abdollahi, M. (2021). Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 1-9.
- Pham, T., Tran, T., Ton, N., & Le, V. (2017). Effects of pH and salt concentration on functional properties of pumpkin seed protein fractions. *Journal of food processing and preservation*, e13073.
- Popova, A., & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in plant-based foods: A review. *he Open Biotechnology Journal*, 13(1), 1-10.
- Resendiz-Vazquez, J. A., Ulloa, J. A., Urías-Silvas, J. E., Bautista-Rosales, P. U., Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas-Ulloa, P., & González-Torres, L. (2017). Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 436-444.
- Resendiz-Vazquez, J. A., Urías-Silvas, J. E., Ulloa, J. A., Bautista-Rosales, P. U., & Ramírez-Ramírez, J. C. (2019). Effect of Ultrasound-assisted Enzymolysis on Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Seed Proteins: Structural Characteristics, Technofunctional Properties and the Correlation to Enzymolysis. *J Food Process Technol*, 10(796), 2.
- Rezig, L., Chibani, F., Chouaib, M., Dalgarrondo, M., Hessini, H., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(32), 7715-7721.
- Rezig, L., Riaublanc, A., Chouaibi, M., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2016). Functional properties of protein fractions obtained from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed. *International Journal of Food Properties*, 19(1), 172-186.
- Rodríguez-Miranda, J., Hernández-Santos, B., Herman-Lara, E., Vivar-Vera, M., Carmona-García, R., Gómez-Aldapa, C., & Martínez-Sánchez, C. (2012). Physicochemical and functional properties of whole and defatted meals from Mexican (*Cucurbita pepo*) pumpkin seeds. *International journal of food science & technology*, 47(11), 2297-2303.
- Rojas, V., Marconi, L. F., Guimarães-Inácio, A., Leimann, F. V., Tanamati, A., Gozzo, A., & Gonçalves, H. (2019). Formulation of mayonnaises containing PUFAs by the addition of microencapsulated chia seeds, pumpkin seeds and baru oils. *Food chemistry*, 274, 220-227.
- Romero, I. (2014). Caracterización Físicoquímica de la Semilla de Chicayota (*Cucurbita Argyrosperma Sororia*) y su Empleo en Panificación. *Jovenes en la Ciencia*, 83-90.
- Rössel, D., Ortiz, H., Amante, A., Durán, H., & López, L. (2018). Características físicas y químicas de la semilla de calabaza para mecanización y procesamiento. *Nova scientia*, 10(21), 61-77.

- Saini, C. S., Sharma, H. K., & Sharma, L. (2018). Thermal, structural and rheological characterization of protein isolate from sesame meal. *Food Measure*, *12*, 426-432.
- Salehi, F., & Kashaninejad, M. (2015). Effect of drying methods on rheological and textural properties, and color changes of wild sage seed gum. *Journal of food science and technology*, 7361-7368.
- Sharan, S., Zanghelini, G., Zotzel, J., Bonerz, D., Aschoff, J., Saint-Eve, A., & Maillard, M.-N. (2020). Fava bean (*Vicia faba* L.) for food applications: From seed to ingredient processing and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 401-408.
- Shen, L., Li, J., Lv, L., Zhang, L., Bai, R., Zheng, T., & Zhang, Q. (2021). Comparison of functional and structural properties of ginkgo seed protein dried by spray and freeze process. *Journal of Food Science and Technology*, *Journal of Food Science and Technology*, 175-185.
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, *43*, 679-689.
- Shrestha, S., van't Hag, L., Haritos, V., & Dhital, S. (2021). Lupin proteins: Structure, isolation and application. *Trends in Food Science & Technology*, *116*, 929-939.
- Siddeeg, A., Xu, Y., Jiang, Q., & Xia, W. (2015). In vitro antioxidant activity of protein fractions extracted from seintat (*Cucumis melo* var. *tibish*) seeds. *CyTA - Journal of Food*, *13*(3), 472-481.
- Sosa, E. I., Chaves, M. G., Quiroga, A. V., & Avanza, M. V. (2021). Comparative Study of Structural and Physicochemical Properties of Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.) Protein Isolates and its Major Protein Fractions. *Plant Foods for Human Nutrition*, *76*(1), 37-45.
- Srbinoska, M., Hrabovski, N., Rafajlovska, V., & Sinadinović-Fišer, S. (2012). Characterization of the seed and seed extracts of the pumpkins *Cucurbita maxima* D. and *Cucurbita pepo* L. from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, *31*(1), 65-78.
- Steffolani, M. E., Villacorta, P., Morales-Soriano, E. R., Repo-Carrasco, R., León, A. E., & Pérez, G. T. (2016). Physico-chemical and functional characterization of protein isolated from different quinoa varieties (*Chenopodium quinoa* Willd). *Cereal Chemistry Journal*, *93*(3), 275-281.
- Tang, S., Du, Q. H., & Fu, Z. (2021). Ultrasonic treatment on physicochemical properties of water-soluble protein from *Moringa oleifera* seed. *Ultrasonics sonochemistry*, *71*, 1-7.
- Timilsena, Y., Adhikari, R., Barrow, C., & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food chemistry*, *212*, 648-656.

- Toews, R., & Wang, N. (2013). Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food Research International*, 52, 445-451.
- Torres, J., Chen, Y., Rodrigo-Garcia, J., & Jaczynski, J. (2007). Recovery of by-products from seafood processing streams. *Maximising the value of marine by-products*, 65-90.
- Ulloa, J. A., Villalobos, B. M., Resendiz-Vazquez, J. A., Ulloa, P. R., Ramírez-Ramírez, J. C., Silva-Carrillo, Y., & González-Torres, L. (2017). Production, physico-chemical and functional characterization of a protein isolate from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. *CYTA – JOURNAL OF FOOD*, 1-11.
- Ulloa, J., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J., & Ulloa, R. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *CONACYT*, 1-11.
- Uyama, H., & Kobayashi, S. (2002). Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19, 117-127.
- Vilg, J., & Undeland, I. (2017). pH-driven solubilization and isoelectric precipitation of proteins from the brown seaweed *Saccharina latissima*—effects of osmotic shock, water volume and temperature. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 585-593.
- Vinayashree, S., & Vasu, P. (2021). Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. Kashi Harit) seeds. *Food Chemistry*, 340, 1-9.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., del Mar, M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52, 127-131.
- Wang, L., Liu, F., Wang, A., Yu, Z., Xu, Y., & Yang, Y. (2017). Purification, characterization and bioactivity determination of a novel polysaccharide from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds. *Food Hydrocolloids*, 66, 357-364.
- Wani, A., Sogi, D., Singh, P., & Shivhare, U. (2011). Characterization and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed protein isolates and salt assisted protein concentrates. *Food science and biotechnology*, 20(44), 877.
- Weng, Y., Shi, A., Ravelombola, W., Yang, W., Qin, J., & Motes, D. (2017). A rapid method for measuring seed protein content in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *American Journal of Plant Sciences*, 8(10), 2387.
- Wu, H., Wang, Q., Ma, T., & Ren, J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42(3), 343-348.
- Yada, R. (2004). *Proteins in Food Processing*. Florida: Boca Raton.
- Zayas, J. F. (1997). Foaming Properties of Proteins. *In Functionality of proteins in food*, 260-309.

- Zayasb, J. (1997). Water holding capacity of proteins. In *Functionality of proteins in food*. Springer, 76-133.
- Zhao, Q., Wang, L., Hong, X., Liu, Y., & Li., J. (2021). Structural and functional properties of perilla protein isolate extracted from oilseed residues and its utilization in Pickering emulsions. *Food Hydrocolloids*, 113, 106412.
- Zhao, X., Zhang, X., Liu, H., Zhang, G., & Ao, Q. (2018). Functional, nutritional and flavor characteristic of soybean proteins obtained through reverse micelles. *Food Hydrocolloids*, 74, 358-366.
- Zhao, X., Zhang, X., Liu, H., Zhang, G., & Ao, Q. (2018). Functional, nutritional and flavor characteristic of soybean proteins obtained through reverse micelles. *Food Hydrocolloids*, 74, 358-366.
- Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A. E., Zhang, Y., Ma., H., & Otu, P. N. (2017). Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT*, 77, 488-496.

ANEXO I. Curva de Calibración de BSA para cuantificación por el método de Bradford

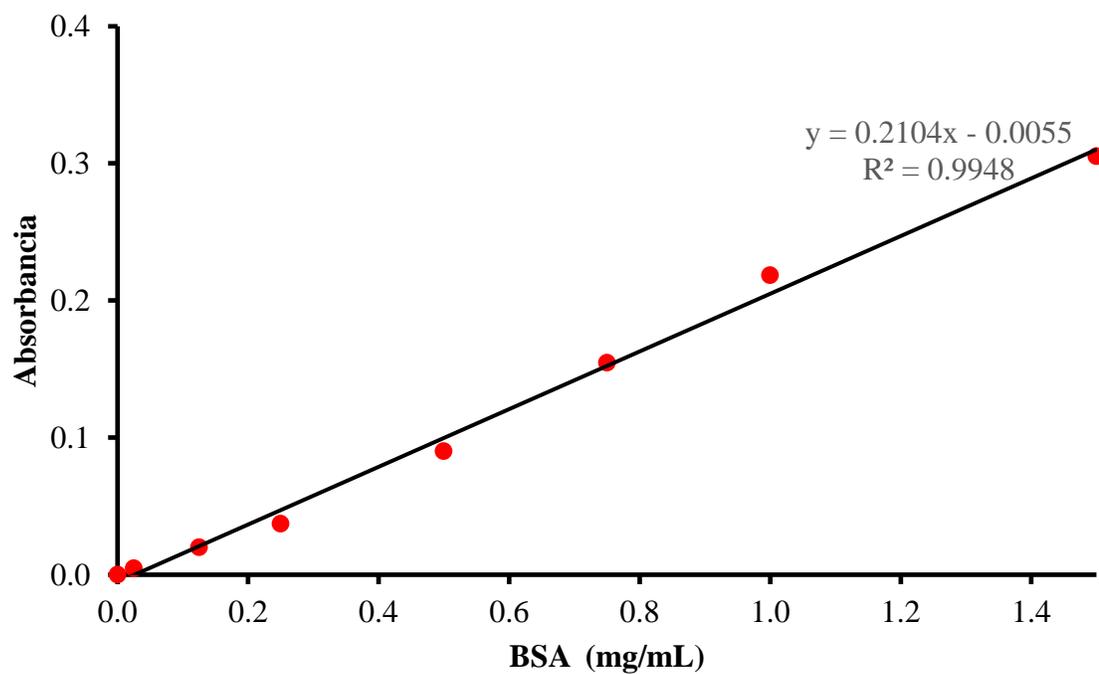


Figura 1. Curva estándar para la determinación de proteínas por el método de Bradford utilizando como referencia albúmina sérica bovina (BSA)