



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICA EN INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ÁREA DE BIOFISICOQUÍMICA

“Efecto de la temperatura y composición de solvente en la estructura secundaria de las α -zeínas.”

Tesis que presenta:

Ing. Biólogo César Sánchez Juárez

Para obtener el grado académico de:

Maestro en Ciencias (Química)

Asesores:

Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Dr. Andrés Hernández Arana

Ciudad de México a 26 de Julio de 2021.

INDICE	Pagina
Resumen	1
Capítulo 1: Introducción.	3
1.1.- Proteínas y su estructura.	3
1.2.- Prolaminas: las proteínas de los cereales.	4
1. 3.- Zeínas las prolaminas del maíz.	5
1. 4.- Las α -zeínas	6
1. 5.- Interés industrial, tecnológico y científico en las zeínas.	9
1.6.- Limitantes para las aplicaciones de las α -zeínas.	12
1. 7.- Importancia de los estudios estructurales en las α -zeínas.	12
Capítulo 2: Antecedentes.	14
2. 1.- Estructura tridimensional de las α -zeínas.	14
2.2.- Cambios conformacionales en las α -zeínas.	17
Capítulo 3: Justificación, hipótesis y objetivos.	20
3.1.- Justificación.	20
3.2.- Objetivos.	20
3.2.1.- Objetivo General.	20
3.2.2 Objetivos específicos.	20
3.3.- Hipótesis	21
Capítulo 4: Materiales y métodos	22
4.1.- Método de purificación y aislamiento de Z19 a partir del extracto de α -zeínas	22
4.2.- Diálisis y concentración de proteína.	24

4.3.- Cuantificación de proteína.	25
4.4.- Electroforesis PAGE-SDS.	27
4.5.- Espectrometría de masas.	27
4.6.- Estudios de dicroísmo circular.	27
4.7.- Estudios de fluorescencia	29
4.8.- Predicción del modelo tridimensional de una Z19 consenso.	30
Capítulo 5: <i>Resultados</i>	32
5.1.- Método de purificación.	32
5.2.- Propiedades espectroscópicas de las soluciones enriquecidas en Z19.	39
5.3.- Estudios de Dicroísmo Circular.	41
5.3.1.- Espectros de Dicroísmo Circular a 20 °C: Efecto del contenido del solvente en la estructura secundaria.	41
5.3.1.- Barridos térmicos.	43
5.3.2.- Espectros a 85 °C y re-enfriados a 20 °C: Efecto de la temperatura y reversibilidad.	44
5.4.- Estudios de fluorescencia	49
5.3.- Estructura 3D y predicción del área expuesta al solvente (ASA).	52
Capítulo 6: <i>Discusión.</i>	56
6.1.- Enriquecimiento en Z19.	56
6.2.- Estudios de Dicroísmo Circular	57
6.3.- Estudios de Fluorescencia.	62
6.4.- Predicción del modelo 3D.	64
Capítulo 7: <i>Conclusiones.</i>	66
Referencias	67

Resumen

En la presente tesis se estudió el efecto del contenido de solvente y temperatura sobre la estructura y conformación de α -zeínas en solución, proteínas extraídas del grano de maíz que son ampliamente utilizadas para la fabricación de nanopartículas, recubrimientos y agentes de llenado en la industria alimentaria. Los estudios se realizaron con un extracto comercial proveniente de la empresa Sigma Aldrich, el cual previamente fue sometido a dos procesos de cromatografía de intercambio iónico, en las cuales se removió el pigmento amarillo característico y otras fracciones de zeína de las clases β -, γ - y δ - enriqueciendo la solución final en α -zeínas de 19 kDa (Z19).

Las técnicas empleadas fueron de tipo espectroscópico, siendo la primera una de absorción conocida como Dicroísmo Circular (DC), la cual se operó en la región del UV-lejano (de 190 a 250 nm), zona del espectro electromagnético ampliamente utilizada en el estudio de estructuras secundarias en proteínas. Nuestros resultados mostraron que las α -zeínas sufrían cambios estructurales de α -hélices a laminas- β , inducidas por solvente, ya que las primeras estructuras tendían a disminuir a medida que el contenido de alcohol disminuía, mientras que las segundas aumentaron a medida que el contenido de agua también aumentó, en un comportamiento similar al descrito en péptidos β -amiloide durante la primeras etapas de formación de oligómeros fibrilares. Por otro con esta técnica se observó también que las α -zeínas tienen una importante estabilidad térmica, ya que se presentaron cambios muy graduales durante los barridos de 20 a 90 °C en 204 nm, indicando que el desplegamiento de estas proteínas, es un proceso poco cooperativo.

La segunda técnica empleada en este trabajo fue la de emisión intrínseca de fluorescencia, la cual se logró excitando las soluciones de proteína en 275 nm, teniendo como objetivo las tirosinas y recogiendo la señal de 280 a 400 nm. En estos estudios se observó que el calentamiento provocaba un corrimiento al rojo en el centro de masa espectral de la proteína, un efecto característico de un proceso de desplegamiento, aunque al igual que con los barridos térmicos en DC, este fue pequeño y gradual. Por otro lado la proteína presentó un corrimiento al azul en el centro de masa espectral a medida que aumento el contenido de agua en el solvente, lo nos sugiere que en esas condiciones las α -zeínas podrían adquirir

una conformación más compacta, donde las tirosinas quedaban enclavadas en una región hidrofóbica mas oculta respecto a condiciones con mayor contenido de alcohol.

Por último se evaluó una predicción de estructura 3D, obtenida con la herramienta en línea I-TEASSER. Aunque los parámetros que evalúan la calidad del modelo no se acercaron a los óptimos, observamos características estructurales que coinciden con la evidencia experimental recabada en este escrito y en la literatura publicada. Una de ellas la forma del modelo muy similar al de horquilla ampliamente aceptado en la actualidad, la exposición de tirosinas a solvente, que podrían explicar porque el desplegamiento térmico monitoreado por fluorescencia parece ser pequeño, y un alto contenido en hélices, muy parecido al medido mediante DC en porcentajes altos de alcohol.

Capítulo 1: Introducción.

1.1.- Proteínas y su estructura.

Las proteínas son la base de la vida tal cual la conocemos, ya que desempeñan un papel crucial en casi todos los procesos biológicos: En la catálisis como las enzimas encargadas de dirigir las reacciones químicas que constituyen todas las rutas metabólicas, en la transducción de señales, ya sea como mensajero o como receptor de membrana y como soportes estructurales, como las proteínas fibrosas constituyendo la epidermis^{1,4}. Estos biopolímeros lineales se construyen a partir de 20 bloques elementales ubicuos en los seres vivos, moléculas orgánicas conocidas como L-aminoácidos, las cuales comparten una estructura en común constituida por un carbono alfa (C_α), unido a un grupo carboxilo (COO^-), un amino (NH_2), un hidrógeno (H) y una cadena lateral variable conocida como grupo R que le confiere diferentes características fisicoquímicas a cada uno^{1,2}. Los aminoácidos polimerizan en moléculas más grandes mediante un tipo de enlace llamado peptídico, en el cual el grupo carboxilo de uno se une al grupo amino del otro, liberando una molécula de agua en el proceso^{1,2,3,4}. Dos o más aminoácidos unidos forman un péptido, estos pueden tener diversas longitudes considerándose como proteínas aquellos con 50 o más residuos de aminoácidos. Polímeros de este tipo con menos de 50 residuos son conocidos como polipéptidos. En cambio, si la molécula contiene sólo unos cuantos residuos de aminoácidos se denomina oligopéptido o simplemente péptido².

La función de una proteína está definida por cómo se pliega y adquiere su conformación tridimensional, en una estructura que puede alcanzar hasta 4 niveles^{3,4}. El primero de estos llamado *estructura primaria* consiste en la secuencia específica de residuos de aminoácidos de cada una, la cual se lee iniciando desde el aminoácido con el grupo amino terminal hasta el que contiene el carboxilo terminal^{1,2,3}. Las propiedades fisicoquímicas de cada residuo y la de sus vecinos generan que en ciertas regiones de la cadena se adopten estructuras, bien definidas, regulares y repetitivas, que pueden ser hélices α , laminas plegadas β , giros o bucles, que constituyen la denominada *estructura secundaria*^{1,2}. El plegamiento y disposición tridimensional final de cada elemento secundario y por tanto de todos los átomos en una proteína, constituye su *estructura terciaria* y en el caso de muchas, es este estadio el que determinan su función⁴. Existen solo dos tipos posibles de estructuras terciarias: que son la globular y la fibrilar¹. La primera de ellas es soluble en agua y muy común en proteínas con funciones hormonales o catalíticas. La segunda es usualmente insoluble y con una forma extendida, muy común en proteínas con funciones de soporte¹. La diferencia entre el plegamiento en una u otra opción está definida por el contenido de aminoácidos hidrofóbicos e

hidrofílicos de las cadenas polipéptidas y como se disponen espacialmente e interactúan con el solvente (usualmente agua)^{4,5}. Las proteínas globulares tienden a orientar sus residuos hidrofóbicos hacia un centro o “core” alejados de las moléculas de agua, exponiendo los residuos hidrofílicos que si son capaces de interactuar con ellas, además de sales o iones. El arreglo genera que la proteína sea soluble y adopte su forma de ovillo compacto característica^{1,4,5}. Por otro lado las proteínas fibrosas, tienden a contener mayor proporción de residuos hidrofóbicos respecto a las globulares, dado que tiene una estructura extendida, exponen estos residuos, generando su insolubilidad en agua característica^{2,3}. Finalmente, cierto tipo de proteínas requiere de un cuarto estadio para alcanzar la función biológica deseada, esta **estructura cuaternaria** consiste en la asociación de dos o más cadenas polipéptidas mediante interacciones débiles.

Algunas proteínas contienen también modificaciones o componentes no peptídicos en su estructura. Átomos o iones como hierro, magnesio o zinc, acompañan a algunas proteínas en sus sitios activos si son enzimas o de unión si son proteínas de transporte como la hemoglobina, formando parte fundamental de su función y/o estabilidad^{5,6}.

1.2.- Prolaminas: las proteínas de los cereales.

Las prolaminas son una súper familia de proteínas de almacenamiento presente en los granos de cereales⁷. Su función biológica es la de dar al germen de la planta el nitrógeno y aminoácidos de reserva, en las primeras etapas de crecimiento⁸. Fueron formalmente descritas por primera vez por T.B. Osborn quien entre 1886 y 1928 realizo una serie de estudios, en los cuales logro aislar las prolaminas de varias especies de cereales aprovechando la solubilidad de estas en sistemas binarios alcohol/agua, reconociendo esta característica como la principal del grupo². Su trabajo significo el reconocimiento de una nueva fracción proteica extraída de los granos de cereal, diferente a las albuminas solubles en agua, las glutelinas en soluciones alcalinas y a las globulinas solubles en soluciones salinas, las cuales ya habían sido descritas hasta ese momento⁹. Actualmente, la clasificación en esta súper familia, ya no considera la solubilidad en sistemas etanol/agua como una característica critica para su definición, sin embargo recoge otras también reconocidas por Osborn, como son: las funciones de reserva, alto contenido de prolina y glutamina o ácido glutámico, bajo contenido de nitrógeno y presencia en el endospermo de los granos^{8, 10,12}, complementándolas con análisis filogenéticos a nivel secuencia de ADN. Cada cereal cuenta con su propia prolamina característica, está por ejemplo, la hordenina de la cebada, la avenina de la avena o la secalina del centeno.

1. 3.- Zeínas las prolaminas del maíz.

De todas las prolaminas, las extraídas del maíz son las mejor caracterizadas. Estas son conocidas como zeínas y son un grupo de proteínas con masas moleculares que van de los 10 kDa hasta los 28 kDa¹¹. En el grano se encuentran localizadas en cuerpos proteicos de aproximadamente 1 μm distribuidos uniformemente en el citoplasma de las células del endospermo¹³. Como otras prolaminas las zeínas presentan insolubilidad en agua, requiriendo presencia de alcohol para su solubilización (en porcentajes superiores al 50%), altas concentraciones de urea, fuerte alcalinidad (pH 11 o superior) o detergentes aniónicos¹⁴. La razón de este comportamiento de solubilidad se encuentra en su composición de aminoácidos, ya que son particularmente ricas en leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%), aminoácidos no polares. Pero deficientes tanto en aminoácidos básicos, como ácidos¹². En el grano las zeínas se producen como una mezcla heterogénea de agregados con enlaces disulfuro que tienen una masa molecular promedio de 44 kDa¹⁵.

Las zeínas son clasificadas en 4 tipos, en función de sus características específicas de solubilidad, contenido de residuos, movilidad electroforética y respuesta inmunológica a su consumo. Los cuales son diferenciados por las letras griegas α , β , γ y δ , siendo separados del mismo extracto en alcohol/gua, mediante cambio en el porcentaje alcohol o agregando agentes reductores, permitiendo la separación en 3 pasos, como se describe en la figura 1¹¹.

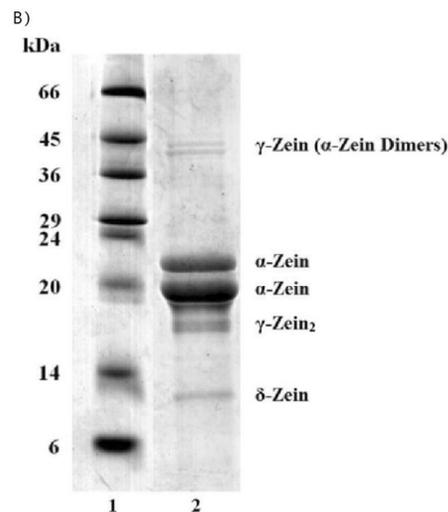
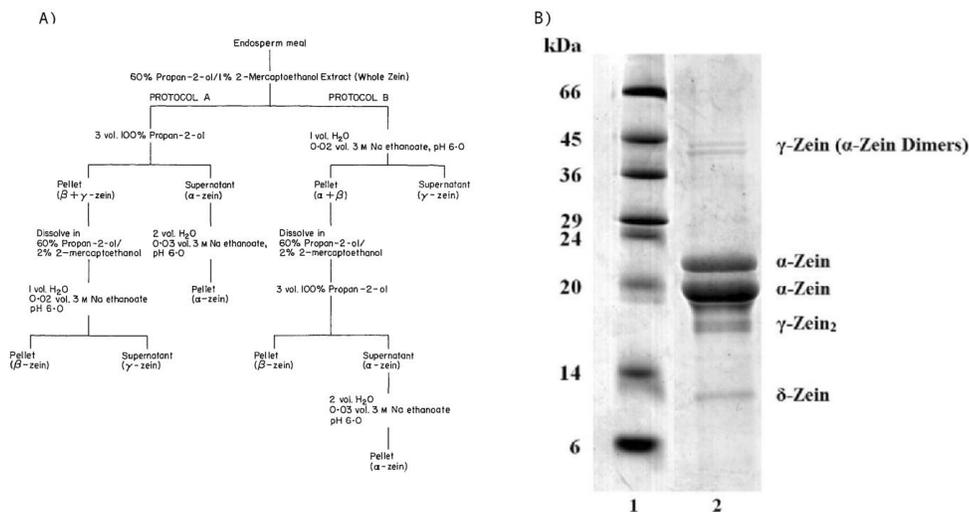


Figura 1.- (A) Procesos de separación de α -, β - y γ - zeínas, a partir del mismo extracto. (B) Gel de separación PAGE-SDS de extracto de zeínas, definición de los 4 tipos debido a su diferente migración electroforética.

1. 4.- Las α -zeínas

Las α -zeínas son las más abundantes de las 4 clases de zeínas conocidas, representando entre el 75 y 85% del total extraídas del grano de maíz¹⁶, también son las únicas solubles en mezclas binarias etanol/agua superiores al 80%¹⁷, razón por la cual pueden separarse fácilmente del resto, simplemente aumentando el porcentaje de etanol en la solución donde se encuentren disueltas. En geles de poliacrilamida-SDS, estas prolaminas resuelven dos bandas con pesos moleculares aparentes de 19 y 22 kDa (figura 2)¹⁸. Cada banda está constituida por varios polipéptidos con longitud y masa molecular similar pero carga diferente, razón por la cual pueden separarse mediante una electroforesis en dos dimensiones en pH ácido (isoelectroenfoque)¹⁹. Estudios de este tipo han logrado revelar entre 50 y 55 polipéptidos de α -zeínas distintos. Esta heterogeneidad de carga es resultado de que estas prolaminas son el producto proteico de una familia multigénica^{20,21,22}, es decir el genoma del maíz cuenta con varios genes que codifican a α -zeínas, ubicados en distintos cromosomas o *loci*, que aunque homólogos no son idénticos, por tanto hay variaciones en las secuencias que generan diferencias en las cargas finales.

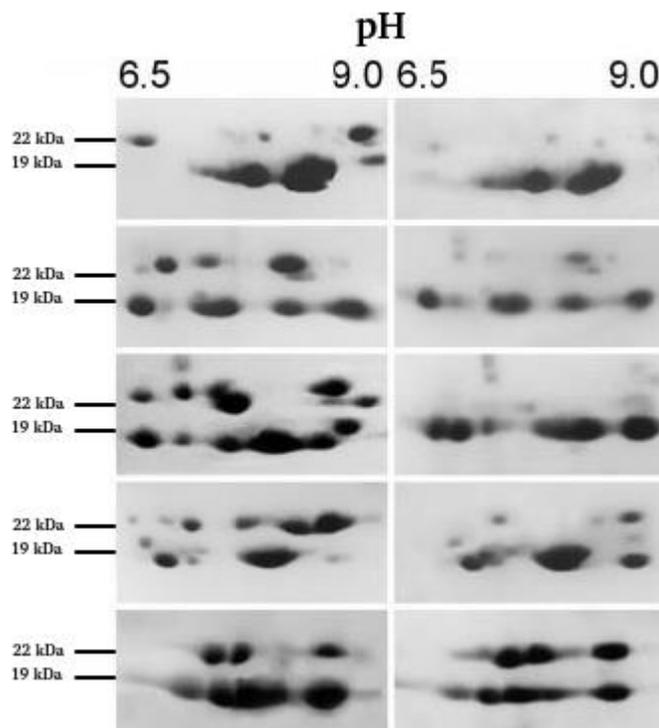


Figura 2.- Gel de electroforesis en dos dimensiones (SDS y IEF), de 5 extractos de α -zeínas, resultados reportados por Ciceri, P. y colaboradores⁹¹. La imagen muestra la heterogeneidad de este tipo de zeínas. Las dos bandas características en 19 kDa y 22 kDa de los geles PAGE-SDSD clásicos (migración vertical), se separan en varias bandas individuales en función de un gradiente de pH 6.5 a 9, establecido de izquierda a derecha (migración horizontal).

Dada la gran variedad de secuencias proteicas identificadas como α -zeínas, es ampliamente aceptado clasificarlas de acuerdo a su migración relativa en dos tipos, las de 19 kDa o Z19 y las de 22 kDa o Z22. Esta clasificación es más acorde aún, si se considera que hay aproximadamente un 90% de homología entre α -zeínas del mismo tipo, pero aproximadamente solo un 60% cuando se compara entre grupos.

Tabla 1.- Composición de aminoácidos en las α -zeínas (Shukla, 2001.)¹⁰.

Aminoácidos	α -zeína (19 kDa)	α -zeína (22 kDa)
Alanina	35	41
Valina	7	15
Leucina	48	51
Isoleucina	11	11
Metionina	3	6
Fenilalanina	13	10
Triptófano	0	0
Prolina	22	21
Glicina	2	3
Serina	19	16
Treonina	8	10
Tirosina	8	7
Asparagina	11	13
Glutamina	43	49
Acido aspártico	1	0
Acido glutámico	1	1
Lisina	1	1
Arginina	3	3
Histidina	1	5
Cisteina	3	1
Total	240	265
Hidrofílicos (%)	47.91	46.41
Hidrofóbicos (%)	52.08	53.20

Análisis de secuencias completas de aminoácidos derivadas de ADNc y genes clonados^{23, 24} han permitido revelar rasgos característicos de las α -zeínas. En primera instancia se lograron establecer longitudes de secuencia de residuos para los dos tipos, siendo de 220 a 240 residuos para las Z19 y de 250 a 260 residuos para las Z22²⁵, lo que corresponde a pesos moleculares verdaderos de 23 a 24 kDa y 26.5 a 27 kDa respectivamente²⁶, valores similares a los determinados por espectroscopia de masas en diversas investigaciones posteriores²⁷. Se encontró también que los dos tipos de α -zeínas tenían en común un bajo contenido de lisinas y carencia de triptófanos, alto contenido tanto de glutamina como prolina, así como de alanina y leucina, con porcentajes casi iguales de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos (ver Tabla 1)¹². Finalmente los alineamientos, mostraron una estructura en común en todas las secuencias estudiadas, con un

dominio N-terminal de 36 a 37 aminoácidos y un dominio C-terminal de 10 aminoácidos, separados por motivos proteicos constituidos por repeticiones en tándem de 14 a 25 residuos, cuya secuencia consenso propuesta es: Q (F/I) LP (F/A) NQL (L/A) (A/V) ANSPAYLQQ. Siendo la presencia de un motivo extra en Z22 (la cual cuenta con 10 en vez de los 9 de Z19) la causa de la diferencia en pesos moleculares y longitudes de secuencia^{28, 29}. Se cree que la diferenciación entre las dos clases se debió a un proceso de duplicación y divergencia genética²⁹.

Las α -zeínas son más hidrofóbicas que otras prolaminas provenientes del maíz o de otros cereales, presentan una fuerte tendencia a la agregación (rasgo característico de polipéptidos usualmente encontrados en cuerpos proteicos en granos) que complica su separación y estudio³⁰. Pese a las complicaciones en su manejo estas prolaminas se han venido usando en la industria o investigación desde hace casi 80 años, usualmente en mezclas complejas con las otras 3 fracciones de zeínas.

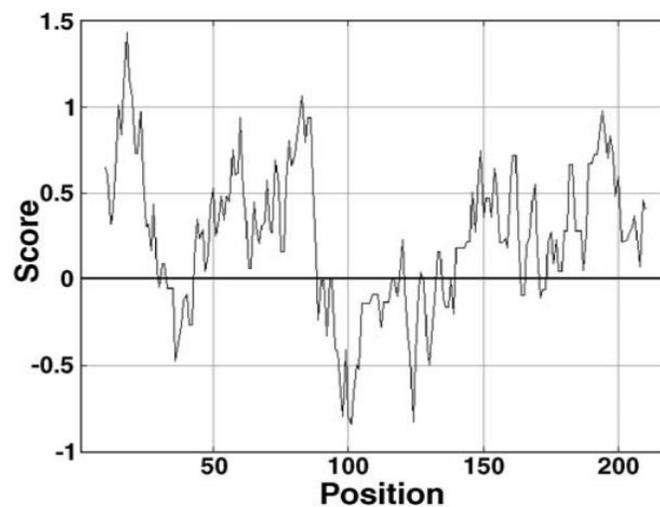


Figura 3.- Perfil de hidrofobicidad de una Z19 calculado con el método Kyte and Doolittle²¹. Los resultados muestran mayor proporción de posiciones (residuos) con scores positivos, es decir en regiones de naturaleza hidrofóbica.

Zein protein	SIGNAL SEQUENCE	Sequence positions
Z22	M A T K I L S L L A L L A L F A S A T N A	1-21
Z19	M A A K I F C L I M L L G I S A S A A T A	1-21
N-TERMINAL TURN		
Z22	S I I P Q C S L A P . S S I I P Q F L P P V T S M A F E H P A V Q A Y R	22-56
Z19	S I F P Q C S Q A P I A S L L P P Y L S P A M S S V C E N P I L L P Y R	22-57
REPEAT SEQUENCES		
Z22	. L Q Q A I A A S V L . . Q Q P I . A Q L Q . . .	57-74
Z22	. . Q Q S L A . . . H L T I Q T I . A T Q Q . . .	75-90
Z22	. Q Q Q F L P A L S H L A M V N P V A Y L Q . . .	91-111
Z22	. . Q Q L L A S N P L A L A N V . V A N Q Q Q Q .	112-132
Z22	Q L Q Q F L P A L S Q L A M V N P A A Y L Q Q Q .	133-156
Z22	Q L L S S S P . . . L A V A N A P . T Y L Q Q E L	157-177
Z22	L Q Q I V P A L T Q L A V A N . P V A Y L Q . . .	178-198
Z22	. . . Q L L P F N Q L T M S N S . V A Y L Q Q R .	199-218
Z22	. Q Q L L N P . . . L A V A N P L V A A F L Q . .	219-237
Z19	. I Q Q A I A A G I L . . . P L S P L F L Q . .	58-75
Z19	. Q S S A L L Q Q L P L V H L L A . Q N I R A Q Q	76-98
Z19	. L Q Q L V L A N L A . A Y S Q Q . .	99-113
Z19	. . Q Q F L P F N Q L A A L N S A . A Y L Q Q . .	114-133
Z19	. . Q Q L L P F S Q L A A . A Y P R . . .	134-148
Z19	. . . Q F L P F N Q L A A L N S H . A Y V Q Q . .	149-167
Z19	. . Q Q L L P F S Q L A A V S P A . A F L T Q . .	168-187
Z19	. . Q Q L L P F Y L H T A P N V G . T L L Q . . .	188-206
Z19	. L Q Q L L P F D Q L A L T N P A . A F Y	207-225
C-TERMINAL TURN		
Z22	Q Q Q L L P Y N R F S L M N P V I S R Q Q P I V G G A I F	238-266
Z19 Q Q P I I G G A L F	226-235

Figura 4.- Comparación de secuencias consenso de Z19 y Z22, con las 4 regiones descritas por Argos y colaboradores (1982). La construcción de estas secuencias se logró mediante la comparación de la traducción de secuencias de nucleótidos de ambos tipos de α -zeínas.

1. 5.- Interés industrial, tecnológico y científico en las zeínas.

La producción comercial de los extractos de zeínas inicio en 1938, con la puesta en marcha de una pequeña planta piloto de Corn Products Refining company³¹. En aquellos años el interés por las zeínas era para su uso en plásticos y recubrimientos³², aplicaciones consideradas debido a su insolubilidad en agua, resistencia a las grasas y apariencia brillante. Algunos años más tarde y como consecuencia del escaseo de la goma laca durante la segunda guerra mundial, la demanda de la zeínas aumentó considerablemente, siendo la industria de las pinturas, barnices y lacas el destino principal de esta prolamina, la cual llego a alcanzar en los años 50s una producción casi constante de 15 millones de libras anuales solo en los Estados Unidos³¹. Durante

los siguientes 20 años se encontraron varios usos más, principalmente en la fabricación de botones, fibras, adhesivos y aglutinantes^{33, 34, 35, 36,37}, en campos que iban desde la industria de la construcción, hasta la cosmética y alimentaria. Usualmente estas aplicaciones requerían una modificación previa de la proteína, para lo cual se utilizaba formaldehído o algún agente reticulante³⁸.

La tendencia creciente del uso de la zeínas como materia prima polimérica cambió a finales de los años 60s y durante la década de los 70s, llegando a caer su producción mundial a menos 14 millones de libras a partir de 1978, cuando los plásticos derivados del petróleo empezaron a sustituirla, debido a que sus propiedades no dependían del método de obtención, su costo de producción menor y mayor resistencia³¹. Pese a esto algunos de sus usos se mantuvieron durante las siguientes décadas, principalmente como agente aglutinante dado su estatus como material de grado alimenticio (GRAS, *Generally Recognized As Safe*)³². En años recientes el interés por estas prolaminas, en especial por las clases α -zeínas, ha crecido nuevamente, retomando la idea de su uso para la fabricación de plásticos, fibras o revestimientos³⁹⁻⁴³, dada la creciente preocupación por el desarrollo de productos ambientalmente responsables. Pero además considerando nuevos usos potenciales principalmente en el área de alimentos y farmacéutica.

Actualmente las dos aplicaciones más estudiadas son el uso de α -zeínas como material de pared para el desarrollo tanto de biopelículas, como de sistemas de liberación coloidal. En el primer caso buscando la fabricación de fibras, o superficies biodegradables con actividad antimicrobiana⁴³⁻⁴⁶, en el segundo la encapsulación de compuestos hidrofóbicos con actividad biológica en nano o micro esferas de zeína, para su posterior inclusión en formulas alimenticias o tratamientos terapéuticos⁴⁶⁻⁵⁰. Ambas aplicaciones fueron consideradas dada la alta anfifilicidad de la proteína (superior a cualquier otras zeínas), característica que le permite atrapar solutos hidrofóbicos cuando precipitan en la misma solución, la nula toxicidad por consumo dado su grado alimenticio (GRAS) y capacidad de generar estructuras laminares debido a cambios en las condiciones del solvente, las cuales pueden agruparse para formar películas o bien nuclearse en nano o micro esferas, dependiendo de las condiciones de auto ensamble utilizadas⁵¹. En ambos casos se han obtenido resultados satisfactorios, lográndose formular biopelículas antimicrobianas de α -zeínas con quitosano y/o goma xanthana adherida⁵²⁻⁵⁵, o bien formadas por la precipitación de micro esferas de la prolamina con antibióticos encapsulados. Por otro lado diversos trabajos han logrado obtener suspensiones coloidales estables de micro y nano esferas de α -zeínas encapsulando solutos como aceites esenciales^{49, 50, 56,57}, potenciales fármacos anti cancerígenos como el resveratrol^{58, 59}, ácidos grasos esenciales^{60, 61}, agentes antioxidantes⁶²⁻⁶⁵, entre otros. Mejorando con el tratamiento la solubilidad en sistemas acuosos y estabilidad

ante posibles efectos nocivos de pH, luz, presencia de moléculas reactivas y/o temperatura, en todos los casos.

El interés por el uso de la α -zeínas como material de pared de nano y micro partículas se debe a la sencillez, accesibilidad y costos de los métodos utilizados para dicho fin, los cuales son principalmente dos: en el primero, conocido como de precipitación anti solvente^{66,67,68}, se titula una solución etanol/agua (con porcentajes que van del 60 al 90% v/v) en la cual se ha solubilizado la prolamina y el agente activo, sobre un solvente polar que puede ser directamente agua des ionizada o bien un buffer. Esta titulación provoca que el porcentaje de etanol en la mezcla final sea de entre el 10 y 20%, muy inferior a 70-90% de la solución inicial donde esta solubilizada la proteína y el compuesto que se desea encapsular. El segundo método parte de una solución de la prolamina en etanol/agua 70-90%, removiéndose el alcohol mediante evaporación, llegando a concentraciones finales de entre el 5 y 10%, esta técnica es conocida como auto ensamble inducido por evaporación de solvente (EISA)^{69,70,71}. La formación de biopelículas se realiza con una metodología similar a la segunda pero generando la evaporación completa del solvente y con concentraciones de α -zeínas de 3 a 4 veces superiores, además de la presencia de algún otro polímero usualmente con propiedades antimicrobianas, que se retícula con la prolamina o genera un proceso de plastificación al interactuar con ella⁷². La finalidad de ambas estrategias es forzar en condiciones controladas un cambio estructural en la proteína, debido a que esta pasa de estar en un solvente predominantemente no polar a uno polar. Estos métodos además pueden optimizarse sin afectar la sencillez característica, con la inclusión de alguna molécula con propiedades de tenso-activo, que establezca las suspensiones coloidales por un aumento en la carga superficial (potencial ζ) o mediante un impedimento estérico⁷³⁻⁷⁵. En ambos casos disminuyendo la tendencia a la agregación y manteniendo en suspensión las esferas.

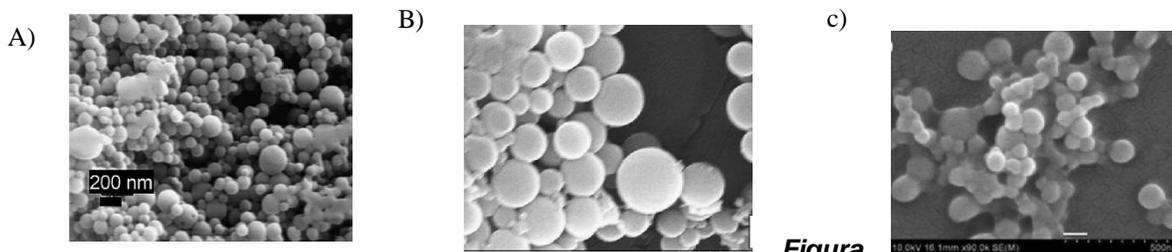


Figura 1.- Imágenes de microscopías electrónicas de nano partículas de zeínas fabricadas en diferentes trabajos de investigación: A) Zhong, Q., & Jin, M. (2009)⁸⁸, B) Wu, Y., Luo, Y., & Wang, Q. (2012)⁸⁹ y C) Luo, Y., Teng, Z., & Wang, Q. (2012)⁹⁰.

1.6.- Limitantes para las aplicaciones de las α -zeínas.

Pese al potencial y resultados positivos, aún hay ciertas limitantes para llevar las aplicaciones actuales y futuras de las α -zeína a una escala industrial. Una de las más importantes es la relacionada a la variabilidad en sus propiedades visco elásticas entre lotes⁷⁶. Se ha encontrado que sutiles diferencias ente zeínas obtenidas incluso con procesos similares, pueden provocar diferencias significativas la propiedades reología de las soluciones y suspensiones de esta proteína²³. Se ha demostrado que una parte del problema, podría relacionarse a la diferencia entre los pesos moleculares de las especies de zeínas. Por tanto aunque los métodos de extracción fueran similares, la posible diferencia entre porcentajes de cada uno de los dos tipos de α -zeínas en las materias primas de la cual se extraen podría provocar dicho efecto. Por otro lado, aun no se ha podido determinar si las diferencias en la reología, podrían estar relacionadas también a variaciones estructurales entra las especies de los lotes. Considerando la heterogeneidad en las secuencias de la proteína, podría ser viable esta explicación, pues diferencias entre residuos específicos podrían provocar también diferencias en las estructuras, generando a su vez que los radios de giros no sean iguales por tanto propiedades como la viscosidad estática o dinámica tampoco²³.

Otra limitante de las α -zeínas es su fuerte tendencia a la oligomerización y formación de agregados de alto peso molecular, característica que provoca una baja resolución analítica⁷⁷, complicando desde la determinación de la concentración debido al efecto de dispersión de los agregados en espectrofotometría UV-VIS^{3,4}, hasta la formación de cristales útiles para la determinación de su estructura mediante dispersión de rayos X⁷⁷. Hasta la fecha no se conoce la teoría exacta del proceso de oligomerización y agregación de las α -zeínas, por lo cual no es posible proponer mutaciones o modificaciones específicas para evitarlo o disminuirlo. Esto es importante si se considera que muchas de las aplicaciones sugeridas para la proteína, consisten en básicamente controlar su agregación, ya sea para formar estructuras como esférica con fines de encapsulación o superficies (películas, recubrimientos agentes de llenado).

1. 7.- Importancia de los estudios estructurales en las α -zeínas.

Como en toda proteína las aplicaciones, funciones, propiedades y características de las α -zeínas, están relacionados con su estructura. Por ejemplo, la facilidad con la que forman oligómeros y agregados, podría relacionarse a su alto contenido en α -hélices en su estructura secundaria, las cuales estarían exponiendo residuos no polares, usualmente involucrados en procesos de agregación proteica⁷⁸. Además, estudios han demostrado que la formación de micro esferas con la prolamina conlleva una ganancia de hebras- β a cambio

de pérdidas de α -hélices y giros ricos en glutamina ^{69, 71, 77,79}. Es decir esta aplicación se basa en la manipulación de cambios en su estructura secundaria, en un efecto provocado por el aumento de polaridad del solvente.

El conocer con mayor detalle las características estructurales de las α -zeínas y sus implicaciones, es un paso necesario para el desarrollo de más aplicaciones, para superar limitantes en su aprovechamiento industrial e incluso para proponer modificaciones a fin de facilitar su manipulación o mejorar sus características sin afectar las de interés. Podríamos por ejemplo, determinar cómo y cuales diferencias estructurales entre α -zeínas de distintos lotes, podrían generar diferencias en la reología, abriendo paso al diseño de un tratamiento que permita revertirlas u homogeneizar los lotes. A la fecha no existe una estructura tridimensional definitiva para esta proteína, ya que no se ha logrado revelar mediante cristalografía de rayos x ^{9, 16,80}. Debido a esto, otras técnicas fisicoquímicas como dicroísmo circular, fluorescencia, ultra centrifugación, calorimetrías, RMN o SAXS, complementadas con estrategias de biología molecular, computacionales y bioinformática (secuenciaciones, alineamiento, modelado *ab initio* etc.), han sido las principales herramientas para tratar de aproximarnos a un modelo estructural de las α -zeínas. Estas técnicas también han sido útiles para estudiar el efecto de las condiciones de solubilidad sobre la conformación de la prolamina, dado que muchas de sus aplicaciones se basan en la manipulación de las mismas.

Capítulo 2:

Antecedentes.

2. 1.- Estructura tridimensional de las α -zeínas.

El primer modelo estructural para una α -zeína fue propuesto en 1982 por Argos y colaboradores²⁸. Fue para la Z19, y se construyó a partir de los alineamientos de secuencias de aminoácidos con Z22, estudios de dicroísmo circular en el UV-lejano (190 a 240 nm) sobre una mezcla de ambas prolaminas en metanol al 70% y un análisis de las características físicas (potencial de hidratación, polaridad y y propensiones a formar espirales y hélices) de los aminoácidos que comprenden la zona con las repeticiones en tándem flanqueadas por glutaminas. Los autores encontraron que la proteína debía tener una estructura predominantemente helicoidal, ya que los espectros de dicroísmo sugirieron un contenido de entre 50 y 60 % α -hélices (20-30% giros, 10% estructuras aleatorias y 10% hebras- β), mientras que el estudio físico sobre los residuos sugirió que la zona de repeticiones en tándem (que representa 2/3 partes de la secuencia total), debía estar estructurada por hélices predominantemente hidrofóbicas flanqueadas por bucles o giros ricos en glutamina. Estos indicios apoyaron un modelo en el cual cada uno de las repeticiones en tándem correspondía a una α -hélices (por lo que Z19 estaría constituida por 9 de estas), las cuales se dispondrían topológicamente de forma anti paralela y adyacente, en una conformación espacial de cilindro ovalado, cuya parte superior e inferior estaría poblado por bucles con un alto contenido de residuos polares de glutamina²⁸. Esta propuesta no solo cumple con la evidencia empírica, también explica satisfactoriamente la fuerte tendencia a la agregación en la prolamina, ya que los residuos polares e hidrófobos distribuidos apropiadamente a lo largo de las superficies helicoidales permiten enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares e interacciones de van der Waals entre hélices vecinas, de modo que las moléculas de α -zeínas en forma de varilla podrían agregarse en planos moleculares que luego se apilarían a través de interacciones de glutamina en las tapas cilíndricas.

Algunos años más tarde en 1993, Garratt y colaboradores²⁵ propusieron un modelo estructural para las Z22 y otras α -prolamina, retomando la idea de que cada motivo repetitivo corresponde a α -hélices, pero reconsiderando como se disponen espacialmente, ya que en su propuesta las hélices de repetición impares yacen paralelas entre sí, pero anti paralelas respecto a las pares, tomando con esto una conformación de

rueda, en la cual una α -hélices podría estar rodeada hasta por seis hélices vecinas y seis agujero intersticiales (ver figura 5).

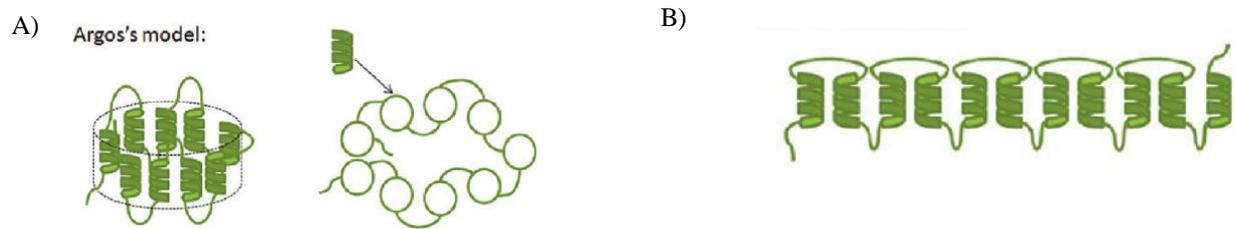


Figura 5.- Comparación de esquemas (Wang, Y., & Padua, G. W.) entre los modelos propuestos por A) Argos y colaboradores en 1982, con el propuesto por B) Matsushima y colaboradores en 1997.

Otro tipo de técnicas han sido empleadas para el análisis de estructura. En 1993 Tatham y colaboradores²⁴, realizaron estudios de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y viscosimetría sobre soluciones de α -zeínas en metanol al 70%²⁴, así como en propano-1-ol y acetona al mismo porcentaje. Sus resultados corroboraron la predominancia helicoidal en estas proteínas, pero sugirieron una conformación asimétrica, pues sus mediciones arrojaron un radio de giro R_g de $4,41 \pm 0,22$ nm y radio de giro de sección transversal R_c de $\sim 0,24 \pm 0,012$, característica que difiere de las conformaciones de rueda y cilindro, las cuales consideran un arreglo simétrico. La característica de asimetría en las α -zeínas, fue observada nuevamente 4 años más tarde por Matsushima y colaboradores⁸¹ quienes también estudiaron por SAXS una mezcla de Z19 y Z22, pero disueltas en etanol 70%. En este trabajo los autores estimaron un radio de giro R_g de 4 nm y un radio de giro para la sección transversal R_c de 1.4 nm, sugiriendo como Tatham ~~A.S.~~ y colaboradores²⁴ que el arreglo de α -hélices no podía ser simétrico. Con sus resultados y utilizando las observaciones de Argos y colaboradores²⁸, sugirieron un arreglo en forma de cinta o prisma alargado con dimensiones de $a = 13$ nm, $b = 1.2$ nm y $c = 3$ nm. En este, los monómeros podrían tener mayor flexibilidad respecto a las disposiciones cilíndricas y en rueda, aunque al igual que el primero los puentes de hidrógeno internos serían la principal fuerza de estabilización. El modelo extendido explica también la fuerte tendencia a agregarse por parte de las α -zeínas, ya que supone una larga superficie hidrofóbica expuesta, que facilitara la interacción entre monómeros de proteína.

Los últimos dos modelos estructurales desarrollado para las α -zeínas, fueron propuestos en 2004 y 2007. El primero de ellos desarrollado por Forato y colaboradores⁸², se construyó con una combinación de FTIR, NMR y SAXS, sobre soluciones de Z19 en etanol al 90%. Primero analizaron la estructura secundaria proteica, encontrado un contenido de 46% α -hélices, 22% laminas- β , 23% giros y 10% restante de otras

estructuras. Mostrando una clara diferencia respecto a las estimaciones de DC reportadas hasta ese momento, en la cuales el contenido de hebras- β , siempre fue menor. Los autores sugirieron que esto podría relacionarse a que Z19 contiene mayor proporción de estas estructuras respecto a Z22, por lo que estudios ópticos rotatorio y de DC, hechos con mezcla de ambas prolaminas arrojaban siempre valores menores. Algo similar se discutió con el cálculo de radio giro realizado, el cual para este trabajo fue de 3.8 nm ligeramente inferior al estimado por Matsushima y colaboradores, indicando que probablemente el monómero de Z19 tiene un radio de giro menor a Z22, por lo que estudios en la mezcla de ambas arrojaban un valor intermedio o promedio. El modelo en general, consistió en una conformación de horquilla abierta, que consta de estructuras helicoidales cortas dispuestas de manera extendida y conectadas por bucles, giros u hojas (Figura 6). Este modelo difiere del propuesto por Matsushima y colaboradores, porque las hélices están en segmentos cortos (respaldados por datos FTIR) y no con un solo giro o bucle en el medio de dos segmentos helicoidales largos. Propusieron también que las hélices se replegarían sobre sí mismas o se extenderían dependiendo del entorno, en lugar de una hélice única como Tatham y colaboradores²⁴. Una de las primeras ventajas de esta propuesta respecto a las anteriores, es que no se ve afectada por la heterogeneidad de la proteína, es decir cualquier α -zeínas de 19 kDa, expresada por cualquier gen de la familia multigénica puede ser compatible con esta. Además también explica eficientemente la agregación en fibras.

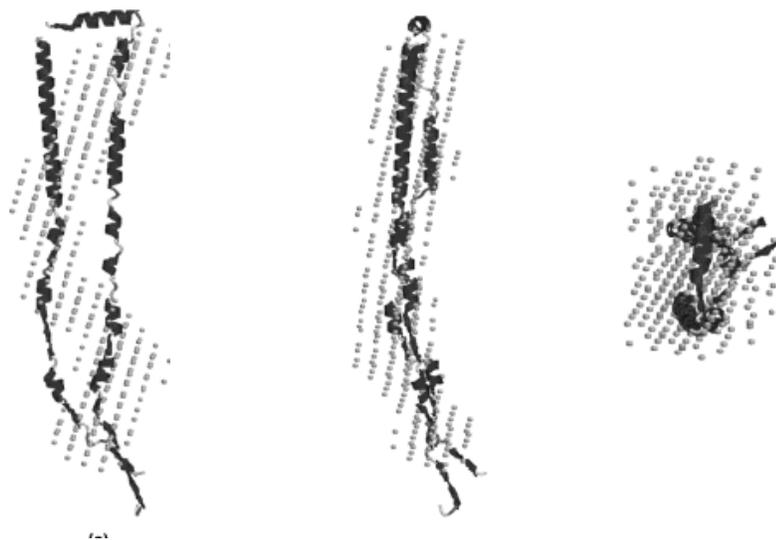


Figura 6. – Modelo de conformación tridimensional de la Z19 propuesto por Forato, L. A. y colaboradores (2004). Visto de frente (izquierda), Lateral (centro) y rotado 90° (derecha).

El último modelo fue propuesto por Momany y colaboradores⁸³, también para las Z19. Al igual que los anteriores se fundamentó en los resultados de técnicas fisicoquímicas, pero complementados con mecánica y dinámica molecular. Ellos sugirieron una conformación en espiral que da como resultado α -hélices con aproximadamente cuatro residuos en las secciones helicoidales centrales con las cadenas laterales de los residuos apolares formando una cara hidrófoba dentro de una superhélice triple. Los nueve segmentos helicoidales de la proteína de 19 kDa, se modelaron en 3 partes con 3 hélices cada una.

2.2.- Cambios conformacionales en las α -zeínas.

La estructura de las α -zeínas ha sido estudiada en función de diversas condiciones y técnicas fisicoquímicas. Entre las observaciones más concluyentes realizadas, se encuentra su cambio estructural al ser sometidas a tratamientos de formación de micro y nano esferas para producir suspensiones coloidales. Evidencia de métodos como dicroísmo circular, microscopía electrónica y SAXS, sugieren que al ser tratadas mediante EISA o precipitación anti solvente, la prolamina tiende a perder α -hélices a cambio de una ganancia de hebras- β ^{23, 77, 79}, las cuales en el estudio realizado por Yi Wang y colaboradores⁵¹, aumentan de 0 a 33%, por la reducción del primer tipo de estructura de 80 a 15%, en pruebas realizadas sobre soluciones con Z19 y Z22. Estos autores, incluso propusieron un posible mecanismo de formación de micro y nano esferas en cuatro pasos: 1) transformación de α -hélices a laminas- β , 2) empaquetamiento de las hebras- β en fibras o rayas, 3) rizado del empaquetado en anillos y 4) formación de esferas por acomodo de los anillos uno sobre otros formando capas.

Otros análisis han buscado observar el efecto de la temperatura, ya sea para optimizar metodologías de formación de suspensiones coloidales^{75, 84} o para analizar el proceso de oligomerización en la proteína^{23, 79, 87}. Entre las observaciones realizadas destaco la importante estabilidad térmica de estas prolaminas, mostrando dos zonas de transición en DSC a 88.54 °C y a 96.35 °C, correspondientes a la desnaturalización de monómeros y ruptura de agregados, respectivamente. Estudios con DC y fluorescencia, indicaron que con la temperatura la proteína tiende a desplegarse, exponiendo tirosinas al solvente, perdiendo α -hélices y generando puentes disulfuro que favorecen el proceso de agregación⁸⁷. El proceso de desnaturalización térmica de las zeínas también mostró ser irreversible y dependiente tanto del tiempo de calentamiento como de la temperatura utilizada.

El pH también afecta tanto la estabilidad como la estructura. Estudios sobre soluciones con mezclas de α -zeínas, han mostrado que valores más alcalinos que el punto isoeléctrico experimental (P.I. 6.8) tienden a favorecer la α -hélices, lo que sugirió que esta conformación se estabiliza con cargas electrostáticas menos positivas^{66,79}. La información también sugirió que la velocidad de desnaturalización térmica era dependiente del pH, disminuyendo con este. Cabra y colaboradores⁷⁹ sugirieron que una explicación de este incremento de velocidad es la hidrólisis de glutamina que se transforma en glutamato a altos valores de pH, introduciendo cargas negativas a la estructura y promoviendo interacciones electrostáticas que la desestabilizan.

El trabajo más extenso realizado sobre el efecto de las condiciones de solubilidad en la estructura de α -zeínas fue el de Selling G.W. y colaboradores²³. Evaluando no solo las condiciones ya descritas, también el efecto del tipo de solvente y la presencia de un agente desnaturalizante en solución. Los resultados mostraron dos cosas: la primera que el solvente orgánico empleado puede favorecer o desfavorecer la estructura helicoidal. La segunda que la proteína presentó cierto grado de resistencia a dos agentes desnaturalizantes usuales, la urea utilizada a una concentración de 1.7 M y el SDS a una concentración de 0.03 M. En ambos caso se observó una reducción en la profundidad de las señales sin embargo esta fue únicamente del 10 y 20% respectivamente. El SDS por otro lado provocó un ligero corrimiento al azul en el mínimo de 208 nm, hecho que los autores sugirieron como un re-acomodo en los aminoácidos con residuos aromáticos.

Un estudio recientemente publicado por Erickson, D.P. y colaboradores⁷⁷, analizó nuevamente el efecto del etanol sobre la estructura de un extracto de α -zeínas, que no se especifica si consiste en un solo tipo o los dos conocidos. Las técnicas fisicoquímicas utilizadas fueron dicroísmo circular y fluorescencia de la tioflavina T, con las cuales volvieron a observar el aumento de las hebras- β con la disminución del porcentaje de etanol en solución disminuye de 75 a 45%. Los giros- β y estructuras aleatorias presentaron la misma tendencia creciente en este análisis. Los resultados experimentales se complementaron con dinámicas moleculares haciendo uso de los dos modelos tridimensionales propuesto para las Z19 más importantes, realizadas por Forato y colaboradores⁸² y Momany y colaboradores⁸³ (modelo de súper hélice). Las simulaciones se hicieron a 75 y 45% etanol, comparando los RMSD resultantes para cada modelo, mostrando que la conformación de horquilla fue la que presentó mayores diferencias con el porcentaje, caso contrario a la superhélice que se mantuvo muy similar en los dos solventes, por lo que esta última no coincide con la evidencia experimental observada. Pese a esto el modelo de horquilla también presenta limitantes debido a que no predice la pérdida de α -hélices a cambio de la ganancia de hebras- β . Además, la

inspección visual de la conformación de la proteína después de la simulación mostró un inesperado desheredamiento de la horquilla en ambos sistemas de solventes²⁰. La mayoría de estos estudios han sido realizados sobre mezclas de los dos tipos de α -zeínas, que si bien usualmente en las aplicaciones se utilizan así, limita la comprensión teórica de los efectos puntuales. Como vimos en la sección anterior es probable que las diferencias en estructura entre Z19 y Z22, no se limite únicamente a la presencia de un motivo repetido más (por tanto una α -hélices mas), pues algunos indicios han sugerido que la α -zeínas de menor tamaño podría contener mayor proporción de hebras- β , respecto a la otra.

Capítulo 3: Justificación, hipótesis y objetivos.

3.1.- Justificación.

El estudio del efecto de las condiciones de solubilidad sobre una sola especie o tipo de α -zeínas, permitirá conocer a mayor detalle el comportamiento de la estructura de la proteína, abriendo paso al desarrollo de diagramas de fases de estructuras y una comprensión teórica más completa que permita proponer mecanismos de optimización en la mayoría de las aplicaciones tecnológicas conocidas para estas proteínas.

3.2.- Objetivos.

3.2.1.- Objetivo General.

Analizar el efecto de la polaridad del solvente y la temperatura de mezclas binarias etanol/agua sobre la estructura secundaria de la α -zeínas y la posible estabilización de conformaciones alternativas.

3.2.2 Objetivos específicos.

- Purificar α -zeínas de 19 kDa por medio de métodos cromatográficos.
- Determinar y analizar del efecto del porcentaje de etanol en mezclas binarias con agua sobre la estructura secundaria de la zeínas.
- Determinar y analizar la influencia de la temperatura en la estructura secundaria de la proteína en diferentes mezclas de etanol/agua.
- Determinar el número de especies moleculares presentes en diferentes condiciones de composición agua-etanol y temperatura.
- Estimar la fracción de cada especie molecular de zeínas en distintas mezclas etanol-agua y temperaturas.
- Comparar las condiciones de solvente que promueven cambios en la estructura secundaria de las α -zeínas con el diagrama de fases reportado y construido mediante estudios de solubilidad de la proteína

3.3.- Hipótesis

La solubilidad de la α -zeínas de 19 kDa en mezclas binarias alcohol/agua, varia con la composición (tipo y porcentaje de alcohol) debido a cambios en la estructura secundaria de la proteína en solución.

Capítulo 4: Materiales y métodos

4.1.- Método de purificación y aislamiento de Z19 a partir del extracto de α -zeínas.

Para este trabajo se empleó un extracto comercial en polvo de α -zeínas, adquirido con la empresa Sigma Aldrich (CAS Number: 9010-66-6, Z3625). El reactivo es una mezcla de los dos tipos conocidos de esta prolamina (Z19 y Z22), con presencia además de un pigmento amarillo, por lo cual está constituido por al menos 3 especies. Debido a lo anterior, se consideró un paso de purificación a fin de remover el pigmento y aislar o enriquecer un solo tipo de α -zeína, específicamente la de 19 kDa (Z19). Para ello se realizó una adaptación del protocolo utilizado por Cabra y colaboradores¹⁶, en el cual se logró separar una Z19 de un extracto obtenido del grano de maíz en el mismo trabajo.

Tabla 2.- Especificaciones del proveedor Sigma Aldrich®, sobre la resina de intercambio iónico DOWEX 50WX4-200.

Característica	Valor o respuesta
Tipo de resina	De intercambio catiónico de ácido fuerte
Grupo funcional	Ácido sulfónico (R-SO ³⁻)
Matriz	Estireno-divinilbenceno (gel)
Tamaño de cama	100-200
Forma iónica	H ⁺
% de entrecruzamiento	4
Intervalo de pH de operación	0-14
Temperatura máxima de operación	150 °C
Capacidad total de intercambio	1.1 meq/mL o 4.6 meq/g
% de humedad	68

El método de purificación consistió en cromatografías de intercambio catiónico, realizadas en equipo FPLC ÄKTA prime plus (Fast Protein Liquid Chromatography) con una columna empacada con la resina DOWEX 50WX4-200 de intercambio catiónico de ácido fuerte, elaborada por la empresa Sigma Aldrich®, con especificaciones descritas en la tabla 2. La fase móvil utilizada durante las cromatografías

fue una solución amortiguadora de citratos 20 mM ajustada a pH 3.5, en etanol/agua al 70% y como amortiguador de elución, el mismo con NaCl 0.7 M. En la primera etapa se inyectaron 25 mL de una solución de extracto de α -zeínas con concentración de 0.3 mg/mL, con la fase móvil como solvente. Previo a la inyección al cromatógrafo la solución fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μ m de tamaño de poro. Para la elución de las proteínas se programó en el equipo un gradiente salino de 0 a 7 mM con 10 mL de volumen, correspondiente a un aumento progresivo 0 a 1% del buffer con NaCl 0.7 M. El último porcentaje se mantuvo durante 30 mL. Posteriormente se realizó un segundo gradiente de 7 a 14 mM, con 10 mL de volumen (1 a 2% de buffer de elución), manteniendo el porcentaje por 20 mL. Se finalizó la elución de las proteínas con un salto hasta 0.7 M de NaCl, es decir pasando el 100% del segundo buffer, durante 40 mL. En la segunda etapa cromatográfica se inyectaron fracciones recuperadas de la primera, la cuales fueron previamente dializadas contra la fase móvil, removiendo así la sal de la primera etapa, en total se inyectaron 10 mL de una solución a 0.321 mg/mL. El programa utilizado en el cromatógrafo fue similar al ya descrito a excepción del gradiente de 1 a 2% de buffer con NaCl 0.7 M, el cual fue removido y sustituido por un salto entre los mismos porcentajes. Las cromatografías fueron operadas a un flujo volumétrico de 2 mL/min y monitoreadas siguiendo la señal de la lámpara UV a 280 nm, la cuales fueron graficadas en tiempo real en un equipo de cómputo acoplado al cromatógrafo.

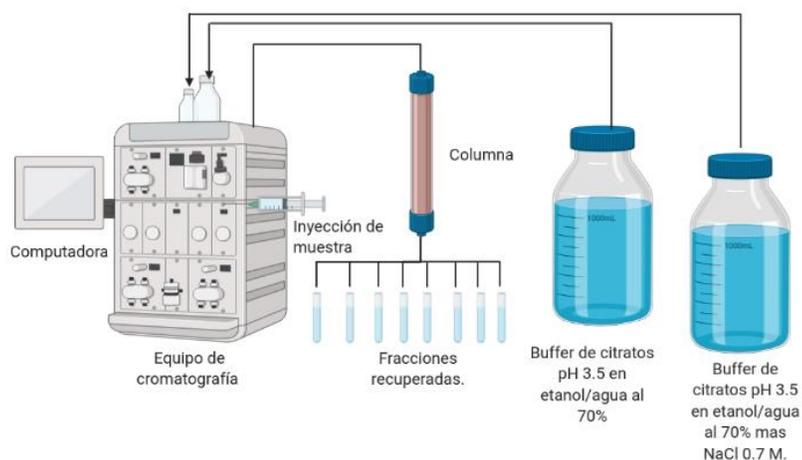


Figura 7.- Representación del montaje básico de las cromatografías de intercambio catiónico empleadas para el descoloramiento y enriquecimiento en la Z19, del extracto de α -zeína comercial.

4.2.- Diálisis y concentración de proteína.

Las fracciones recuperadas de las cromatografías de intercambio catiónico, fueron dializadas mediante una celda Amicon® de 10 mL con agitación. Estas diálisis se realizaron contra la fase móvil (regulador de citratos 20 mM pH 3.5 sin NaCl) para aquellas que fueron re-inyectadas en la segunda etapa de purificación o bien contra soluciones alcohol/agua 70% (metanol o etanol) para las utilizadas en las pruebas de dicroísmo y fluorescencia. El proceso de diálisis en este sistema consistió primero en un paso de concentración reduciendo el volumen de las fracciones seleccionadas hasta 3 mL. Para posteriormente realizar de 3 a 4 lavados contra el solvente en el cual se desea tener solubilizada a la proteína. Para el funcionamiento del sistema se hizo pasar nitrógeno a una presión de entre 25 y 50 psi, a fin de impulsar el paso de la solución a través de una membrana de 10 kDa, previamente depositada en el fondo de la celda.

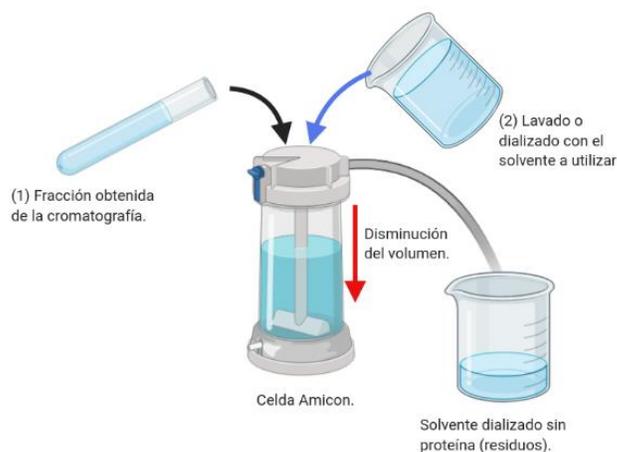


Figura 8.- Esquema de la celda Amicon® de 10 mL, para la diálisis y concentración de muestras. El volumen de las soluciones vertidas en el sistema disminuye debido a que el solvente y las sales son capaces de pasar a través de la membrana de 10 kDa depositada al fondo de la celda. Por otro lado aquellos solutos con tamaños superiores a ese corte molecular son retenidos, aumentando su concentración durante el proceso (las α -zeínas tienen un peso molecular entre los 20 y 27 kDa).

Las concentraciones finales de las soluciones se aumentaron mediante tubos de ultra filtración de 10 kDa de corte molecular, con 15 y 0.5 mL de volúmenes máximos de operación. Estos se centrifugaron a una velocidad de 9,000 rpm durante 10 y 5 minutos respectivamente. Las concentraciones finales se manejaron entre 0.2 y 0.3 mg/mL de proteína total.

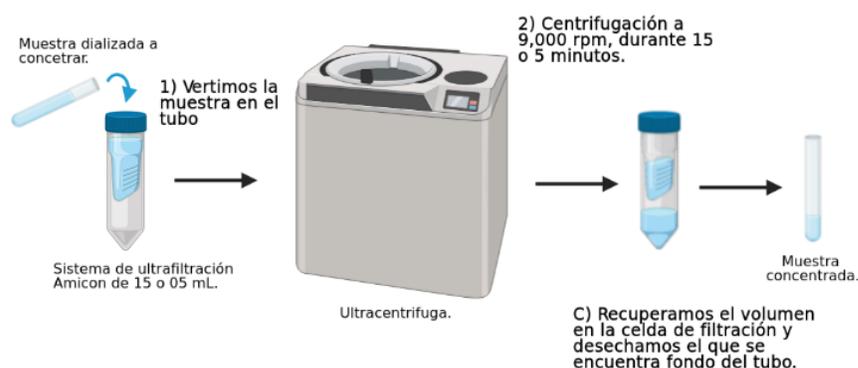


Figura 9.- Esquema del proceso de concentración en tubos de ultra filtración Amicon. En este sistema es la fuerza centrífuga la que impulsa el paso de la solución a través de la membrana de 10 kDa de corte, al fondo de la primera cápsula en el tubo. Al finalizar el proceso el volumen al fondo del tubo es descartado ya que contiene poca o nula proteína, mientras que el restante en la primera cápsula es recuperado pues contiene la solución concentrada.

4.3.- Cuantificación de proteína.

Tabla 3.- Diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) utilizadas para las curvas patrón en la estimación de la concentración de proteína por el método colorimétrico de detección con ácido bicinónico. Todas las diluciones provienen de una solución estándar de BSA a 2.00 mg/mL, la cual está integrada en los reactivos del kit.

Vial	Volumen de agua mili Q (μL)	Volumen y fuente de BSA (μL)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A	0	300 de stock.	2000
B	125	375 de stock	1500
C	325	325 de stock	1000
D	175	175 vial B	750
E	325	325 vial C	500
F	325	325 vial E	250
G	325	325 vial F	125
H	400	100 vial G	25
I	400	100 vial H	5
J	500	0	0

La concentración de proteína de las muestras utilizadas en este trabajo, fue estimada mediante el método colorimétrico de detección con ácido bicinconínico, utilizando el kit BCA Pierce™ de Sigma Aldrich. En esta presentación comercial se utiliza la albumina de suero bovino (BSA) como proteína estándar, construyéndose una curva patrón a partir de 8 diluciones de un stock con concentración conocida de 2.00 mg/mL, como se describe en la tabla 3. Este método colorimétrico, combina la reacción de Biuret, es decir la reducción de iones Cu^{2+} a Cu^{1+} en medio alcalino, como efecto de los enlaces peptídicos en las proteínas. Con la detección selectiva del catión reducido con ácido bicinconínico, molécula orgánica con la cual se acompleja cambiando la coloración de la solución de verde a morada y generando un máximo característico en 562 nm⁹².

El procedimiento instrumental empleado para la cuantificación esta descrito en la figura 10. Este presenta una ligera variación respecto al original sugerido en el manual del kit, pues en nuestro caso el volumen del reactivo de trabajo BCA empleado fue de 1 mL, mientras que el de muestra con proteína fue de 50 μL , es decir la mitad de los sugeridos por el proveedor.

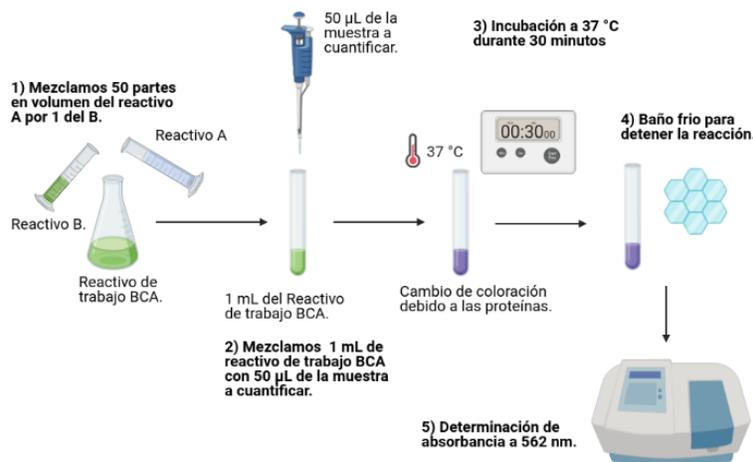


Figura 10.- Protocolo del método de cuantificación de proteína con BCA. La imagen describe el paso a paso para determinar la absorbancia a 562 nm, misma que luego se usa para construir la curva patrón cuando las soluciones medidas son las diluciones de BSA y para determinar la concentración cuando son las muestras de interés.

Para la estimación numérica se construye una gráfica de Absorbancia (Y) vs Concentración de proteína en $\mu\text{g}/\text{mL}$ (X), con las diluciones de BSA de concentración conocida previamente elaboradas. Un ajuste lineal sobre estos datos otorga una ecuación de la recta mediante la cual es posible interpolar las absorbancias de las muestras de interés y calcular la concentración en solución. Como criterio se consideró como válidas solo aquellas curvas patrón cuya regresión lineal tuviera un valor de $R^2 > 0.97$.

4.4.- Electroforesis PAGE-SDS

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 15% y SDS 1%, con 0.75 mm de grosor. Las muestras cuantificadas se mezclaron con el buffer de carga (0.125 Tris-Cl, 4% SDS, 20% glicerol, 10% BME, 0.01% bromofenol, pH 6.8) a una relación tal que se garantizara cargar entre 2 y 3 µg de proteína total. Se realizó un paso de desnaturalización dejando las muestras en un baño maría con agua hirviendo, durante 10 minutos. Los voltajes de corrida fueron de entre 120 y 150 V, realizando la tinción con solución azul de coomasie, ácido acético y metanol. Los carriles se cargaron con las muestras, los marcadores de peso molecular y BSA como proteína estándar con concentración conocida de 0.5 mg/mL.

4.5.- Espectrometría de masas

Se estimaron las masas de los componentes de tres soluciones mediante espectroscopia de masas. Las muestras fueron: una solución del extracto sin purificar ni despigmentar en etanol/agua 70%, otra de las fracciones eluida en 0.7 M de NaCl, previamente dializadas contra etanol/agua y por último la correspondiente a la fracción recuperada en la segunda etapa cromatográfica para estudios posteriores.

Estos experimentos se realizaron en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas (LDEM) empleando la técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) en un espectrómetro marca Bruker, modelo AutoFlex Speed TOF/TOF. La Matriz empleada fue: ácido sinapínico (SA) 20 mg/ mL en 50% Acetonitrilo, 0.1% TFA (ácido trifluoroacético), y agua. Para la co-cristalización muestra/matriz: Se colocó 1 uL de matriz (SA) en cada pozo de la placa de acero inoxidable. Sobre la matriz ya cristalizada (seca), se añadieron 2 µL de cada muestra. Una vez secas las disoluciones de muestras, se añadió sobre ellas 1 uL adicional de matriz (SA) y se esperó hasta secarse completamente. El modo de adquisición utilizado en el instrumento durante la medición fue Lineal Positivo (LP) con un rango de detección de masas de 10-50 KDa. Por lo tanto todas las moléculas con masas fuera de este rango no fueron registradas.

4.6.- Estudios de dicroísmo circular.

El efecto de la temperatura, el porcentaje y tipo de alcohol en la estructura secundaria de zeínas de 19 kDa en soluciones acuosas binarias, se estudió mediante la obtención de los espectros de dicroísmo

circular (DC) en la región del UV lejano (250 a 190 nm) con un equipo Jasco J715 y celda de 1 mm de paso óptico. Esta técnica espectroscópica consiste en la absorción diferencial de luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda en longitudes de onda específicas, como consecuencia de la disposición espacial de los cromóforos o grupos funcionales absorbentes⁹³. En proteínas la absorción (actividad óptica) es debida a los enlaces peptídicos en el ultravioleta (UV) lejano (180 – 250 nm) y por la asimetría en la densidad electrónica alrededor de los aminoácidos aromáticos en el UV cercano (250 –300 nm)⁹⁴.

El estudio se realizó con soluciones binarias alcohol/agua enriquecidas en Z19 en concentraciones de 0.025 y 0.035 mg/mL, con porcentajes de alcohol (metanol y etanol) de 30 a 90%, a intervalos de 10%. En la primera de 4 mediciones, se tomaron los espectros a 20 °C de las soluciones y sus blanco, para analizar del efecto del solvente en las estructuras secundarias de la proteína. En el siguiente paso se fijó la longitud de onda en 204 nm y se midió el cambio en la señal debido a un calentamiento de 20 a 90 °C, tratando de observar posibles transiciones térmicas. Concluido el barrido se registró el espectro de la proteína a 85 °C, para analizar el efecto del calentamiento y la composición del solvente. Por último la proteína fue re-enfriada a 20 °C y medido su espectro. Si bien se sabe que el proceso no es reversible²³, aún no se ha determinado si la respuesta es la misma en cualquier alcohol o porcentaje de este.

A los datos obtenidos les fue restado el blanco (espectro del solvente sin proteína) y convertidos a unidades de elipticidad por residuo medio $[\Theta]_{MRW}$ haciendo uso de la ecuación 1, para luego ser analizados en el servidor de Dicroweb¹³⁴, utilizando el programa CONTIN y el set de datos #7 de 190-250 nm.

Ecuación 1)
$$[\theta_{MRW}] = \frac{MRW * \theta}{10 * d * c}$$

Ecuación 2)
$$MRW = \frac{Mw}{n-1}$$

Donde:

Mw = Peso molecular en g/mol (Da = 1 g/mol)

n = Numero de enlaces peptídicos.

MRW = Peso de residuo medio.

Θ = Elipticidad observada (en grados)

d = Longitud del paso ópticos, en este caso 1 mm.

C = Concentración en g/mL.

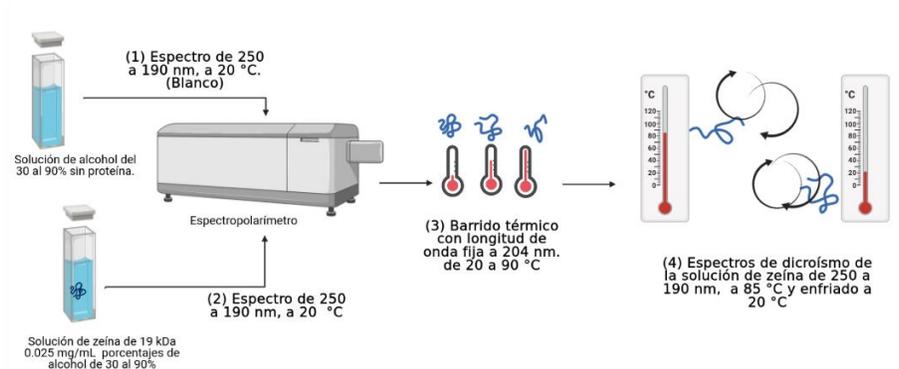


Figura 11.- Representación gráfica del proceso de mediciones de dicroísmo circular en equipo J715 marca Jasco. La región utilizada fue el UV lejano de 250 a 190 nm, concentraciones de proteína de 0.025 mg/mL y 0.035 mg/mL.

El porcentaje de cambio debido a la temperatura, en cada solución alcohol/agua, se calculó haciendo la diferencia entre la fracción de cada estructura secundaria a 20° y 85°C, para luego dividir por el valor a 20 °C y multiplicar por 100, como se especifica en la ecuación 3.

Ecuación 3)
$$\% \text{ decambioES} = \left(\frac{ES_{85^{\circ}\text{C}} - ES_{20^{\circ}\text{C}}}{ES_{20^{\circ}\text{C}}} \right) * 100$$

4.7.- Estudios de fluorescencia

Primero se corroboró la emisión de fluorescencia en la proteína al excitar tirosinas, dada la falta de triptófanos en la secuencia de las α -zeínas. Para ello se realizó una dilución a concentración 0.030 mg/mL en etanol/agua 70%, enriquecida en Z19. Esta dilución fue excitada a 275 nm, longitud de onda de excitación característica de las tirosinas, registrando la emisión de 280 nm a 340 nm.

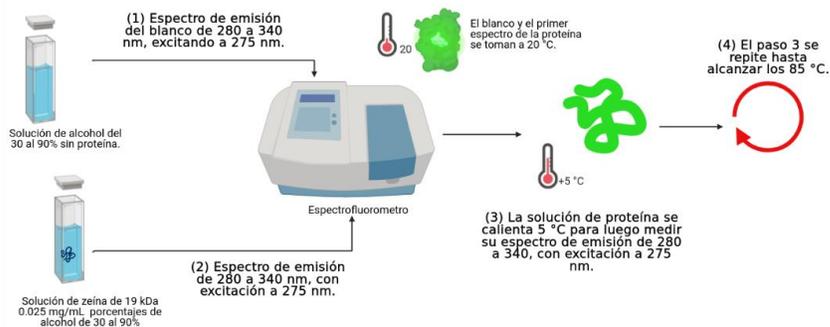


Figura 12.- Representación gráfica del proceso de mediciones de espectros de emisión de fluorescencia de 280 a 340 nm, excitando en 275 nm. De soluciones enriquecidas en Z19, concentración de 0.025 y 0.035 mg/mL.

Los estudios finales se realizaron con las mismas soluciones utilizadas en difracción circular. Utilizando las mismas longitudes de onda del párrafo anterior. Se tomaron espectros de 20 a 90°C en intervalos de 5 °C. Los datos fueron tratados restando el blanco y graficando el valor de emisión resultante contra la longitud de onda. Para el análisis, se calcularon los centros de masa espectral con la ecuación 4 graficándose contra el porcentaje de etanol en el análisis a 20 °C y contra la temperatura en los estudios térmicos. Todas las mediciones se realizaron en un fluorómetro ISS K2.

Ecuación 4)
$$CME = \frac{\sum(I_F * \lambda)}{\sum I_F}$$

Donde:

I_F = Intensidad de fluorescencia.

λ = Longitud de onda en nanómetros (nm)

4.8.- Predicción del modelo tridimensional de una Z19 consenso.

Para la predicción del modelo tridimensional se utilizó la secuencia P04027 extraída de la base de datos UniProt. Esta corresponde a una Z19 *wild type* y fue empleada por Erickson y colaboradores en su trabajo de 2020⁷⁷, donde recrearon los modelos de: horquilla propuesto por Forato y colaboradores⁸² y superhélice propuesto por Momany y colaboradores⁸³. El modelo se predijo con la herramienta bioinformática I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*), esta realiza la construcción mediante 4 pasos generales los cuales son: 1) Identificación de los templados, 2) Simulación iterativa del ensamblaje de la estructura, 3) Selección del modelo y refinamiento y 4) Anotaciones de función basada en la estructura. En este método la secuencia de interés es analizada mediante el meta servidor LOMETS, el cual se encarga de realizar alineamiento con secuencias con estructura 3D revelada y elegir los templados y las regiones donde se utilizarán para la construcción del modelo. Aquellas regiones que no presentaron alineamientos útiles son modeladas desde cero mediante metodologías *ab initio*. Los fragmentos resultantes son ensamblados y plegados mediante simulaciones de Monte Carlo de intercambio de réplicas. Las conformaciones con menor energía libre son seleccionadas y refinadas con pasos de minimización, eliminando choques estéricos y optimizando la topología final. La exactitud del modelo global se evalúa mediante la puntuación de confianza C-score y el TM-score, de los cuales hablaremos más adelante⁹⁵. El modelo se visualizó con las herramientas pymol, VMD y Chimera, comparándose con otros propuestos para las Z19.

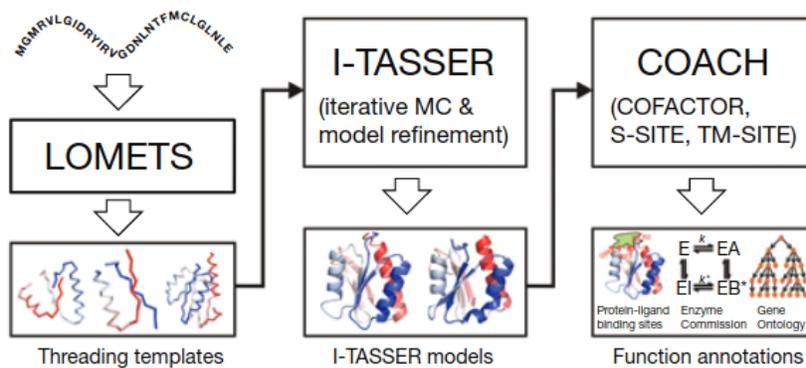


Figura 13.- Representación gráfica del proceso de construcción de un modelo tridimensional de una proteína a partir de su secuencia, utilizando la herramienta bioinformática I-TASSER. Imagen extraída de “The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nature Methods”⁹⁵.

Capítulo 5:

Resultados

5.1.- Método de purificación.

Las soluciones enriquecidas en Z19 se obtuvieron mediante dos etapas cromatográficas. En la primera se inyectó la solución del extracto de α -zeínas disuelto en la fase móvil, la figura 14 reporta el cromatograma obtenido.

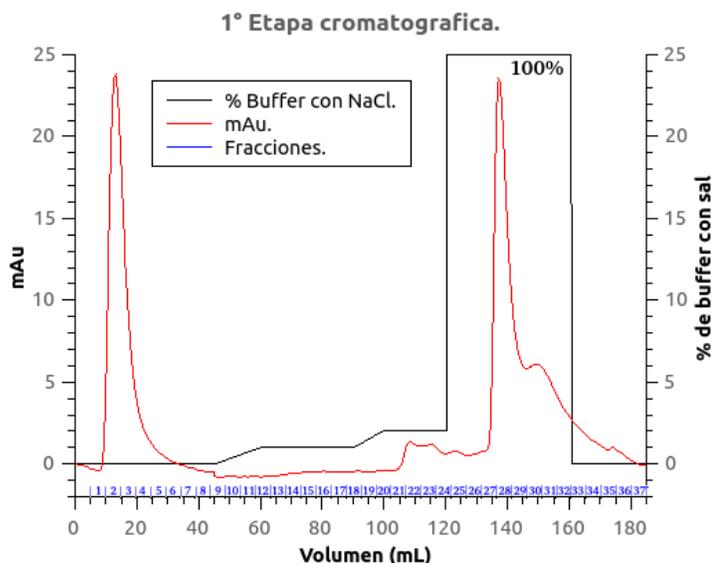


Figura 14.- Primera cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de una Z19, del extracto comercial que se inyectó a una concentración de 0.3 mg/mL. Se especifica que de los 120 a los 160 mL, se hizo pasar el 100% del buffer con NaCl.

Tabla 4.- Especificaciones de las muestras recuperadas de la cromatografía de la figura 14 y analizadas mediante PAGE-SDS: fracciones eluidas en cada muestra, la concentración interpolada con la regresión lineal de la figura 15, el volumen de la muestra y la proteína total.

Muestra	Fracciones	[mg/mL]	Volumen (mL)	Proteína total (mg)
Inyección	1 a 5	0.05	1.5	0.07
M1	9 a 11	0.13	1.0	0.13
M2	12 a 14	0.14	2.5	0.34
M3	15 a 17	0.10	1.5	0.15
M4	18 a 20	0.28	2.0	0.55
M5	21 a 25	0.19	2.5	0.48
M6	27 a 33	0.58	8.0	4.65
M7	35 a 37	0.10	1.5	0.15

Las fracciones cromatográficas se analizaron mediante la técnica PAGE-SDS, para lo cual se mezclaron de acuerdo a la Tabla 4, generando un total de 8 muestras para análisis. Cada una de ella fue dializada contra etanol/agua 70% y posteriormente concentrada, llevándola a un volumen final de entre 1.0 y 1.5 mL, como se describe en el apartado 4.2. Las muestras fueron cuantificadas con BCA, interpolando las absorbancias medidas con la ecuación de la regresión lineal en la figura 15. Los resultados de la cuantificación de proteína y fracciones correspondientes a cada muestra se presentan en la tabla 4.

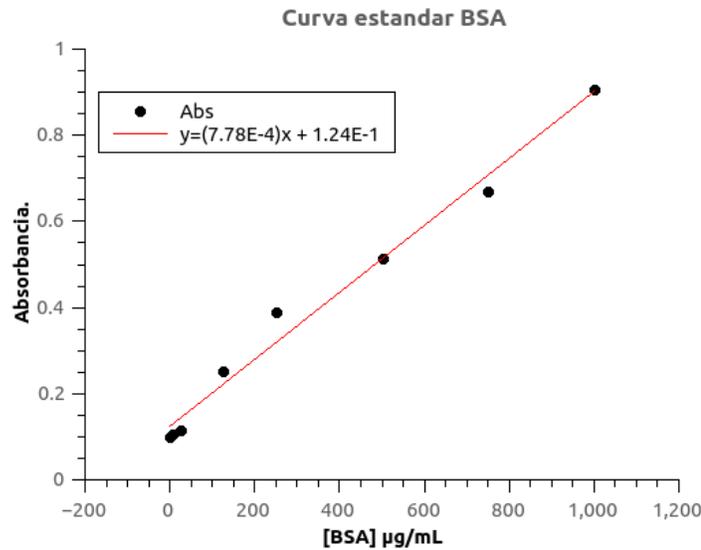


Figura 15.- Curva patrón de BSA utilizada para la interpolación de la concentración de las muestras de interés. La regresión lineal presento un $R^2 = 0.985$.

La figura 16 presenta los geles de electroforesis de las fracciones cromatográficas de la figura 14, preparadas de acuerdo a la Tabla 4. Los resultados sugieren un enriquecimiento en la Z19, en las muestras 1 a 5, correspondiente a los gradientes del 0 al 14 mM de NaCl. Esto es visible debido a la clara diferencia entre la intensidad de las bandas inferior y superior en los carriles con estas muestras, siendo la inferior la mejor definida en todos los casos. Algo que contrasta tanto con las fracciones eluidas con 0.7 M de NaCl (M6 y M7) como con la muestra sin purificar (Zeína sp), donde ambas bandas se definen con intensidades parecidas. Los resultados sugieren que las fracciones 9 a 24 pueden utilizarse para reinyectar a la columna y disminuir o eliminar el resto de Z22 aun en solución.

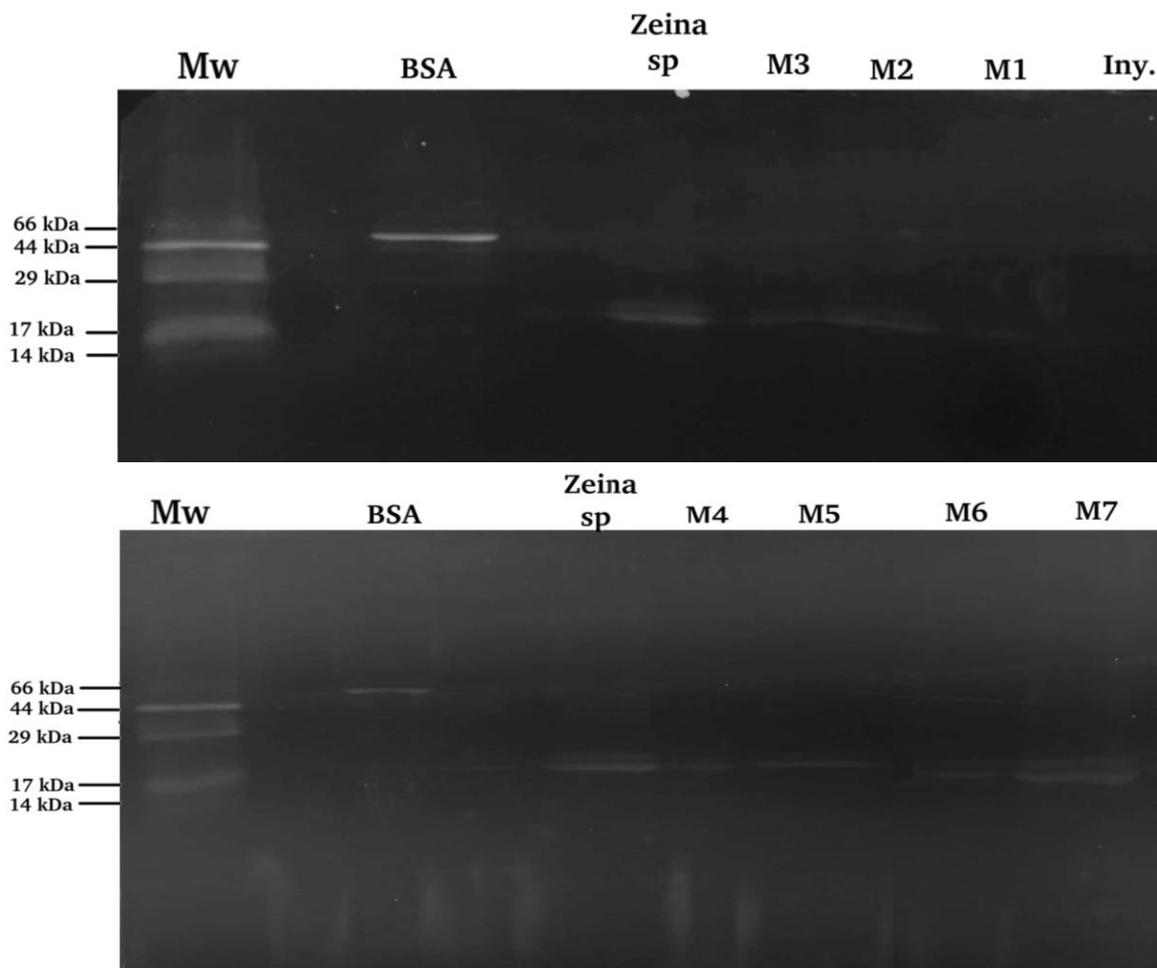


Figura 16.- Resultados geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los carriles fueron cargado con volúmenes de muestra tales que se garantizaran entre 2.5 y 3.0 μg de proteína total y una relación 2:1 de buffer de carga con β -mercaptoetanol.

En la segunda etapa se re-inyectaron las fracciones recuperadas en los gradientes de 0 a 14 mM de NaCl, tanto de la cromatografía previamente descrita, como de otra realizada en las mismas condiciones. Todas las fracciones se mezclaron y dializaron contra la fase móvil, obteniendo una solución final con 0.321 mg/mL de concentración y en un volumen de 10 mL. La figura 17 muestra el cromatograma obtenido en la segunda etapa cromatográfica, en él se observa la presencia de 4 picos, que eluyen en zonas similares a los reportados en la figura 14, pero con algunas diferencias: En los casos del primero, tercero y cuarto pico los máximos son significativamente inferiores respecto a los vistos en la primera etapa, mientras que el segundo presenta una mejor definición. En esta cromatografía se programó un salto de 7 a 14 mM, y no un gradiente como en la primera, esta podría ser la razón de la mejor definición de la segunda señal, la cual previamente había mostrado la forma de una meseta.

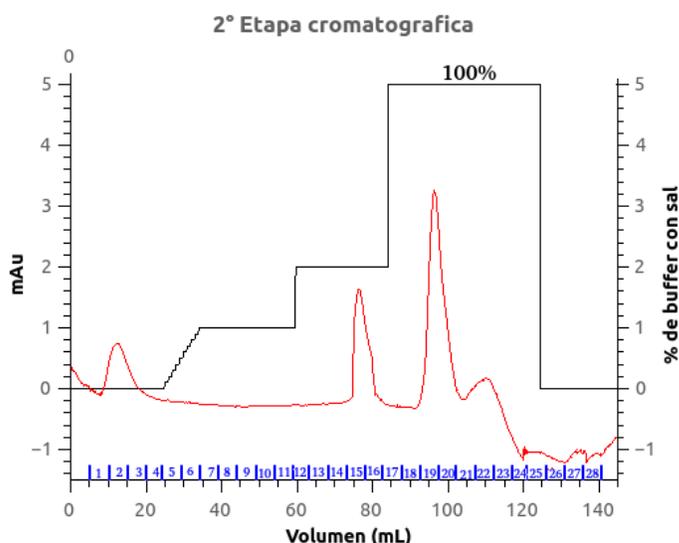


Figura 17.-Segunda cromatografía de intercambio catiónico con las fracciones recuperadas de la primera etapa. Las señales mostraron una disminución en sus valores de absorbancia respecto a lo visto en la cromatografía anterior, siendo la de la inyección y la de la proteína que eluye al 100% de buffer con NaCl, las que presentaron disminuciones más drásticas.

Tabla 5.- Especificaciones de las muestras recuperadas en la segunda etapa cromatográfica. Las columnas especifican las fracciones representadas en cada muestra, la absorbancia a 562 nm luego de incubación de 30 minutos a 37 °C con el reactivo BCA, la concentración estimada, el volumen de muestra y la proteína total.

Muestra	Fracciones	[mg/mL]	Volumen	Proteína total (mg)
Inyección	1 a 4	0.01	1	0.01
F1	6 a 17	0.28	3	0.72
NaCl 100%	19 a 28	0.64	3.5	2.25

Las muestras fueron dializadas contra etanol/agua 70% y posteriormente concentradas. La curva patrón y su ecuación de ajuste para la cuantificación de proteína de las muestras recuperadas en la segunda etapa se muestran en la figura 18. Los resultados y fracciones por muestra se describen en la tabla 5.

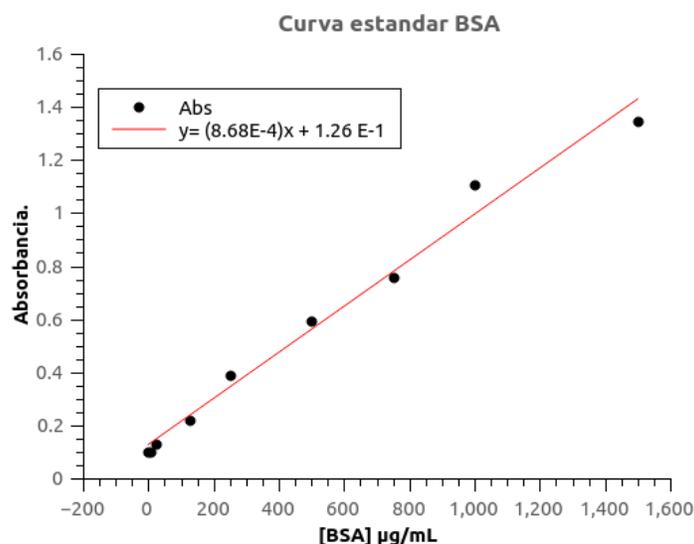


Figura 18.- Curva patrón de BSA utilizada para la interpolación de las muestras recolectadas de la segunda etapa cromatográfica. La regresión lineal presento un $R^2 = 0.985$.

Las fracciones recuperadas en el gradiente de 0 a 7 mM y en el salto de 7 a 14 mM (F1), se cargaron en un gel de electroforesis, junto a una solución del extracto, una muestra de la inyección y un marcador de peso molecular, los resultados se presentan en la figura 19. En esta observamos que como en la figura 16, se definieron dos bandas en el carril del extracto, correspondientes a las Z19 y Z22. En el carril de la inyección se observa menor definición en la banda superior, mostrando que en la primera etapa hay una disminución en el contenido de Z22. La muestra final F1 en medio del gel, define una sola banda en la altura de las Z19, esta es más delgada respecto a la vista en el extracto y más intensa respecto a las otras dos muestras, aun cuando se cargaron cantidades de proteína iguales.

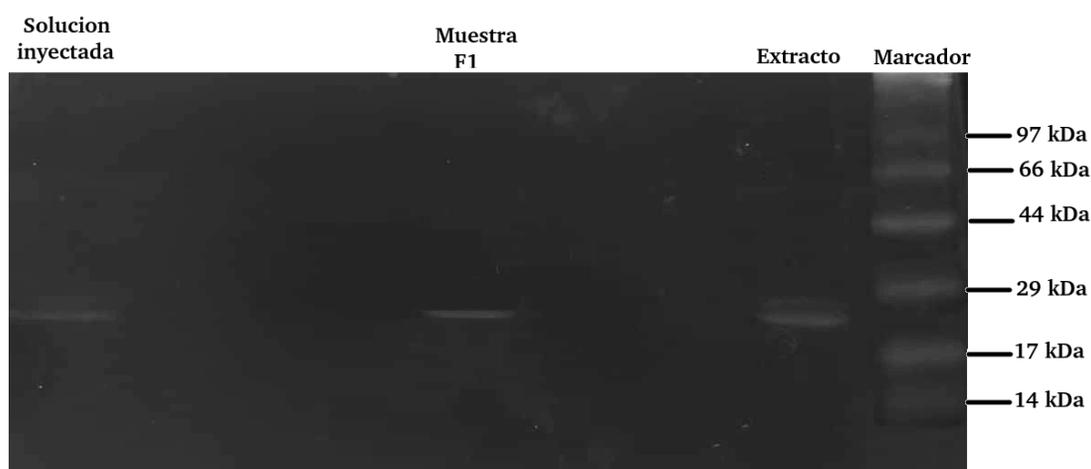


Figura 19.- Resultados PAGE-SDS con fracciones enriquecidas en Z19 recuperadas de la segunda cromatografía (centro), muestra con el extracto solubilizado en etanol/agua 70% (derecha) y muestra de la inyección (izquierda) en el mismo solvente.

La muestra F1, la solución del extracto sin tratar (zeína SP) y la muestra M7 (zeína SC) de la primera cromatografía, se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Esto con la finalidad de observar el efecto de las cromatografías, los resultados se muestran en la figura 20. En ellos observamos la presencia de 4 señales muy parecidas entre los 10 y 15 kDa, en las 3 soluciones. En F1 dos de estas señales predominan sobre el resto, una en masas moleculares similares a las de los picos en 11.61 kDa en M7 y 11.62 kDa en el extracto. La segunda señal presenta un pico en 11.97 kDa con el máximo de intensidad más alto en ese espectro, en el extracto la señal en esas masa moleculares presenta un máximo 10 veces menor, mientras que en M7 es apenas perceptible. Estas dos señales descritas en los 3 espectros de masas parecen corresponder a los iones de doble carga de las especies con pesos moleculares entre 23.20 y 23.99 kDa, que también aparecen en las 3 soluciones y que además presentan una tendencia similar de un aumento en la señal más pesada en F1 respecto al extracto y a M7. Otras dos señales presentes en los 3 espectros son una que aparece entre 13.36 y 13.87 kDa, que parece ser el ion de doble carga de la segunda entre 26.74 y 26.80 kDa. Tanto el extracto como M7 presentan 2 señales más que F1 no, en 14.46 y 20.27 kDa. Una última especie presente solo en la solución sin tratamiento otorga un pico en 17.32 kDa con algunas decenas de u.a.

Por último se realizó la sobre posición de los 3 espectros en la zona de 20 a 30 kDa, en la figura 21. La imagen muestra como la señal cercana a 24 kDa aumenta en F1 respecto a las otras dos muestras y en sentido contrario la señal cercana más pequeña disminuye para esa solución, siendo M7 la que presentó las intensidades más grandes. Por otro lado aunque los 3 espectros presentaron la especie con masa de alrededor de 26.73 kDa, en F1 esta señal disminuye a casi la mitad de las intensidades reportadas tanto para el extracto como para M7, muestras que presentaron valores similares.

En resumen las dos etapas cromatográficas logran reducir considerablemente el contenido de Z22, en alrededor de un 50%, si se considera la diferencia de intensidades entre la señal en el extracto y en la muestra F1 en la figura 21. Si bien no se obtuvo un espectro de masas de las fracciones recuperadas en la primera etapa y posteriormente inyectadas en la segunda, los resultados de electroforesis, muestran que aún hay una definición visible de la banda correspondiente a Z22 en estas fracciones (figura 19, solución inyectada), mientras que en las recuperadas de la segunda etapa, esa banda ya no es visible o al menos no claramente, por lo que tenemos una solución más enriquecida en Z19.

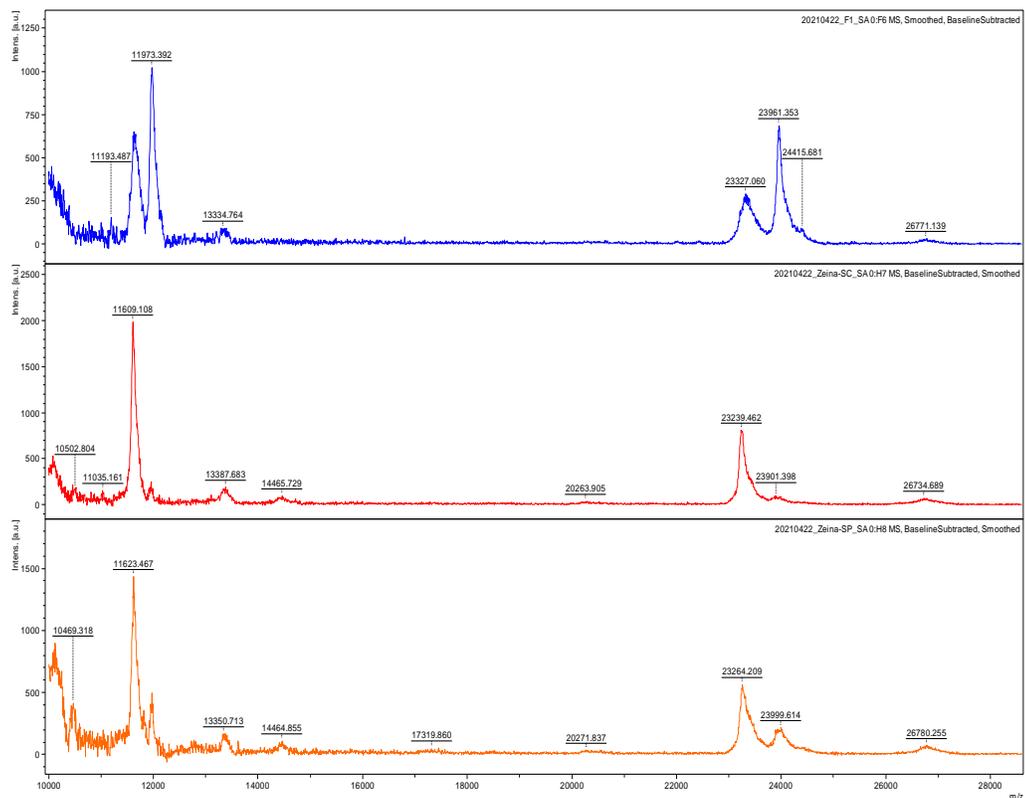


Figura 20.- Espectros de masas de 3 soluciones con α -zeínas: Solución del extracto sin tratamiento en etanol/agua 70% en naranja (zeína SP), Muestra M7 dializada contra etanol/agua 70% (zeína SC) en rojo y Muestra F1 dializada contra etanol/agua 70% en azul.

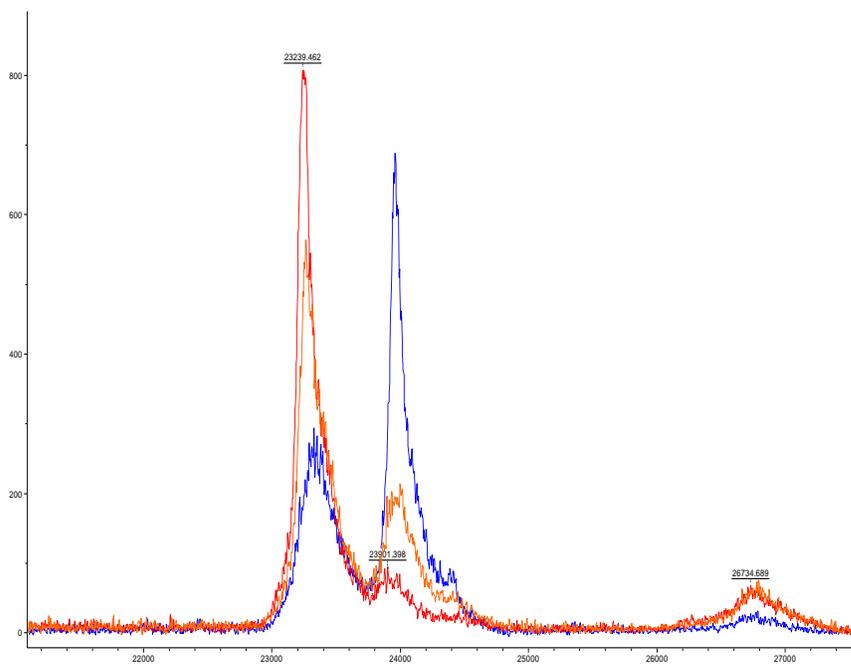


Figura 21.- Sobre posición de los 3 espectros en la zona de 20 kDa a 28 kDa: solución del extracto sin tratamiento en etanol/agua 70% en naranja (zeína SP), Muestra M7 dializada contra etanol/agua 70% (zeína SC) rojo y Muestra F1 dializada contra etanol/agua 70% azul.

5.2.- Propiedades espectroscópicas de las soluciones enriquecidas en Z19.

Las propiedades fluorescentes y de dicroísmo circular de las α -zeínas, ya han sido comprobadas y utilizadas por autores en diversos trabajos^{23, 24, 51, 47,83}. Se sabe que las tirosinas en sus secuencias de aminoácidos permiten obtener espectros de emisión de fluorescencia al excitar soluciones con esta proteína a 275 o 280 nm⁴⁷. También se sabe que los espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano (190 a 250 nm) otorgan la forma característica de proteínas ricas en estructuras secundarias de hélices con los mínimos en 222 y 208 nm, además del máximo en 194-196 nm⁸³.

Partiendo de estas referencias se comprobó que las soluciones enriquecidas en Z19 presentaran las propiedades ya descritas y por tanto fueran viables para los estudios posteriores. La figura 22, muestra el espectro de emisión de fluorescencia de una solución preparada con la muestra F1 recuperada de la segunda cromatografía. La concentración utilizada fue de 0.1 mg/mL en un volumen de 2 mL en etanol/agua 90%, esta solución se excitó a 275 nm, recogiendo la señal de 280 a 400 nm. Los resultados muestran un máximo que corrobora las propiedades fluorescentes en la solución, alcanzando un valor cercano a las 1.4×10^6 en alrededor de 300 nm.

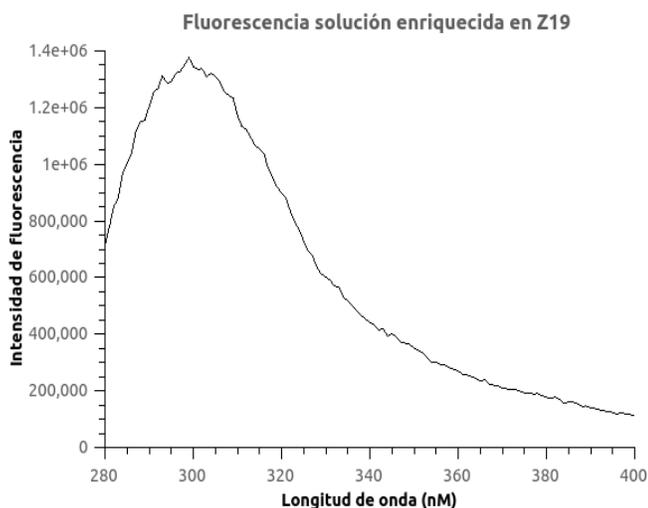


Figura 22.- Espectro de emisión de fluorescencia de 280 a 400 nm, de solución de α -zeína enriquecida en Z19, excitada a 275 nm. La concentración de la muestra fue de 0.025 mg/mL, los resultados muestran un máximo bien definido en alrededor de 300 nm.

Se midió también el espectro de dicroísmo circular a la misma muestra F1, preparando una solución en 90% etanol/agua con concentración de 0.025 mg/mL. Los resultados se compararon con los obtenidos con dos soluciones preparadas a partir de la muestra M7 de la primera cromatografía con concentración

de 0.05 mg/mL en etanol/agua 90% y del extracto de zeína en el mismo solvente y con la misma concentración. La finalidad fue observar las diferencias en los espectros entre el extracto sin tratar, una solución despigmentada con presencia de ambos tipos de zeína (muestra M7) y la que se utilizó para el resto de experimentos, los resultados se muestran en la figura 23. En ellos observamos que los 3 espectros presentan la misma forma, con los mínimos en 208 y 222 nm, un máximo local entre ellos y uno global entre 194 y 196 nm, lo que sugiere que las 3 soluciones tienen hélices como estructura secundaria predominante. Las diferencias principales entre los resultados fueron las profundidades de los mínimos, siendo la solución enriquecida con Z19 la de valores más negativos, seguida por la despigmentada y finalmente la del extracto sin tratar. En el caso del máximo cercano a 194 nm, fue también mayor para la solución elaborada con F1, respecto a las otras dos que presentaron valores muy parecidos. Además esta muestra es la única con resultados válidos en todo el intervalo de longitudes de onda ya que M7 y el extracto mostraron voltajes de dinodo HT (V) superiores a 600 V en $\lambda < 192$ nm, por lo que el ruido en esas mediciones es considerable. Esto podría deberse a las diferencias de concentración, ya que tanto la solución preparada con la muestra M7 como la del extracto de α -zeínas sin tratar tuvieron el doble de proteína.

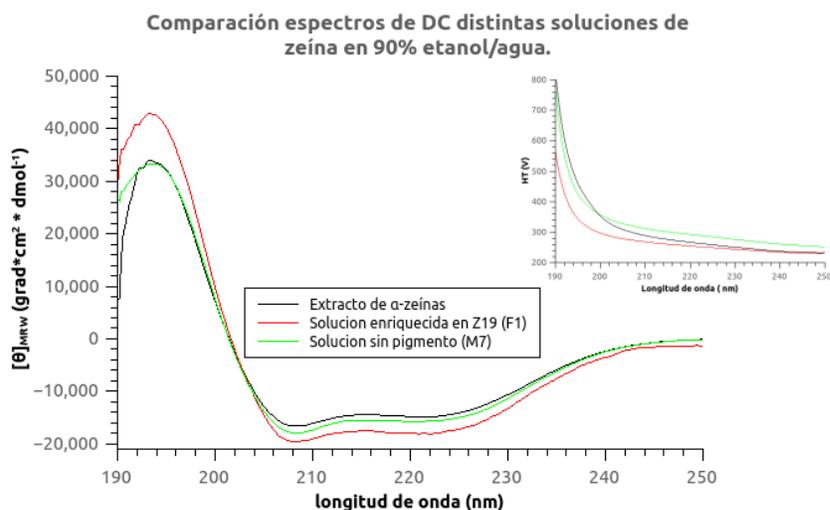


Figura 23. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de 3 soluciones de zeína: Una de la extracción si tratar con los dos tipos de α -zeínas y pigmento, otra sin pigmento (M7) y la enriquecida en Z19, despigmentada (F1).

5.3.- Estudios de Dicroísmo Circular.

Los estudios de dicroísmo circular se hicieron sobre la muestra F1 enriquecida en Z19. Por lo cual una vez concluidos los experimentos en etanol/agua, el volumen restante fue dializado contra metanol/agua 70% y posteriormente cuantificado mediante BCA, obteniéndose una solución con concentración 0.33 mg/mL en 1.65 mL.

5.3.1.- Espectros de Dicroísmo Circular a 20 °C: Efecto del contenido del solvente en la estructura secundaria.

Los resultados de los espectros a 20 °C se graficaron en la figura 24 en dos conjuntos de resultados de acuerdo al tipo de alcohol utilizado. En los dos casos se obtuvieron HT (V) inferiores a los 600 V en todas las longitudes de onda y soluciones, lo que sugiere que el ruido de las mediciones es bajo y por tanto los datos son útiles para la estimación de estructura secundaria. En estos espectros observamos que los mínimos en 208 y 222 nm, tienden a disminuir con el decrecimiento del porcentaje de alcohol en el solvente. Esta tendencia es similar en el máximo entre 190 y 195 nm, que también decae y presenta un corrimiento al rojo hasta 197-198 nm en los porcentajes más bajos. Los espectros de dicroísmo presentaron la forma característica de una proteína rica en α -hélices, hasta 40% alcohol/agua, perdiendo esta forma en las dos soluciones al 30%.

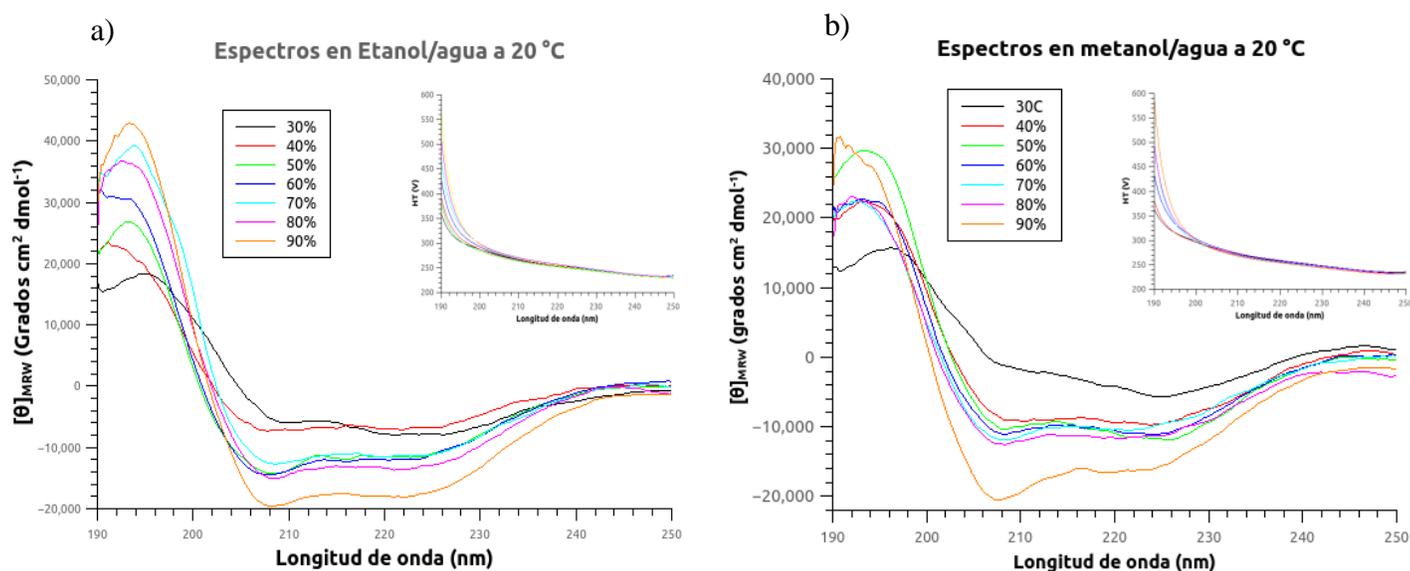


Figura 24.- Resultados de mediciones de espectros de dicroísmo circular 20 °C de soluciones enriquecidas en Z19 con 0.025 mg/mL de concentración. En mezclas binarias etanol/agua (a) y metanol/agua (b). Los porcentajes de alcohol empleados fueron de 90 a 30%.

Los espectros se utilizaron para estimar la estructura secundaria por solución, con la herramienta en línea Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>). Con los resultados se construyeron las gráficas de la figura 25, de la fracción de estructura secundaria contra el porcentaje de alcohol. Las estimaciones muestran que la estructura secundaria en hélices se ve favorecida por el aumento del contenido de alcohol en el solvente, pues tanto en metanol como en etanol 90%, se obtuvieron las fracciones más altas, mientras que a 30% se presentaron las más bajas. Por el contrario, el resto de las estructuras se ven favorecidas con el aumento en la presencia de agua, siendo más evidente el efecto en las láminas, las cuales duplicaron las fracciones de hélices en metanol 30% y se igualaron en etanol al mismo porcentaje. Aunque el efecto general es similar también observamos algunas diferencias notables entre alcoholes. Por ejemplo, el etanol presenta contenidos de estructuras en hélices más altos que el metanol en casi todos los porcentajes. En las soluciones con el primer alcohol la tendencia es siempre creciente, mientras que con el segundo hay lo que parece una zona de estabilización de 50 a 80%, en la cual las variaciones no presentan aumentos significativos, con cambios menores a 0.05 entre cada punto. De hecho, el contenido de láminas y estructuras desordenadas, también parecen estabilizarse en esos porcentajes de metanol. Tanto en estos resultados como en los espectros en la figura 24, observamos que los cambios de en la estructura secundaria de la proteína son más drásticos de 90 a 80%, pues la pendiente de la recta que une esos puntos se vuelve más vertical tanto en etanol como en metanol. Además la tendencia también cambia en los porcentajes más bajos de 40 a 30%, las hélices decae con mayor intensidad mientras que las láminas presentan aumentos más fuertes.

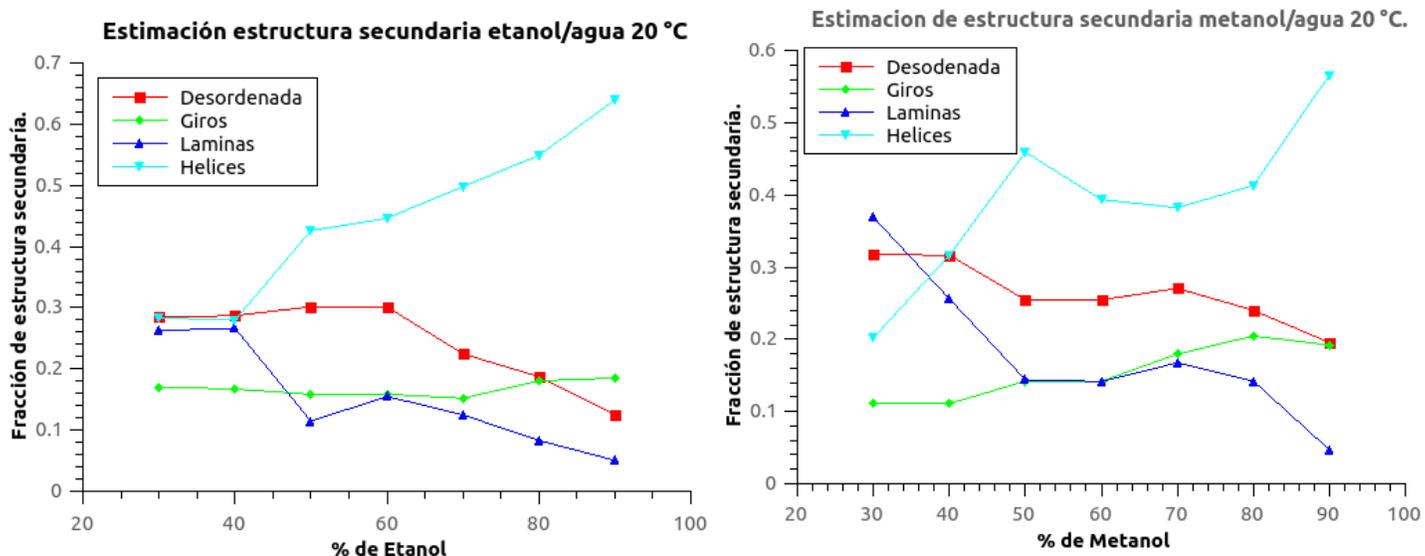


Figura 25.- Estimaciones del contenido de estructura secundaria de soluciones enriquecidas en Z19 en distintos porcentajes y tipos de alcohol. Las estimaciones se realizaron con la herramienta en línea DicroWeb, programa CONTIN y set de datos 7 de 190 a 260 nm.

5.3.1.- Barridos térmicos.

Las figuras 26 reportan los resultados de los barridos térmicos tanto en solvente con etanol como con metanol. En la primera de estas (a) observamos una caída en la señal en los 7 porcentajes de etanol/agua tratados, pero no se observa una transición térmica como tal, ya que la caída es siempre constante en todos los casos y no se tiene una forma sigmoidea definida. El efecto general, es un aumento en la negatividad de la señal con la temperatura, teniendo en 4 de los porcentajes (40, 70, 60 y 50%) lo que parece un hombro que sube y luego baja una vez superados los 85 °C. Los barridos mostraron valores más negativos conforme la presencia de etanol aumentaba en el solvente, esto es algo esperado ya que 204 nm, está cerca del mínimo de 208 nm, el cual se acentuó con el aumento en este alcohol. A 90% la señal tiene un fuerte crecimiento desde los 84 °C y hasta terminar el barrido, en un efecto que podría estar relacionado a la formación de agregados o evaporación de solvente.

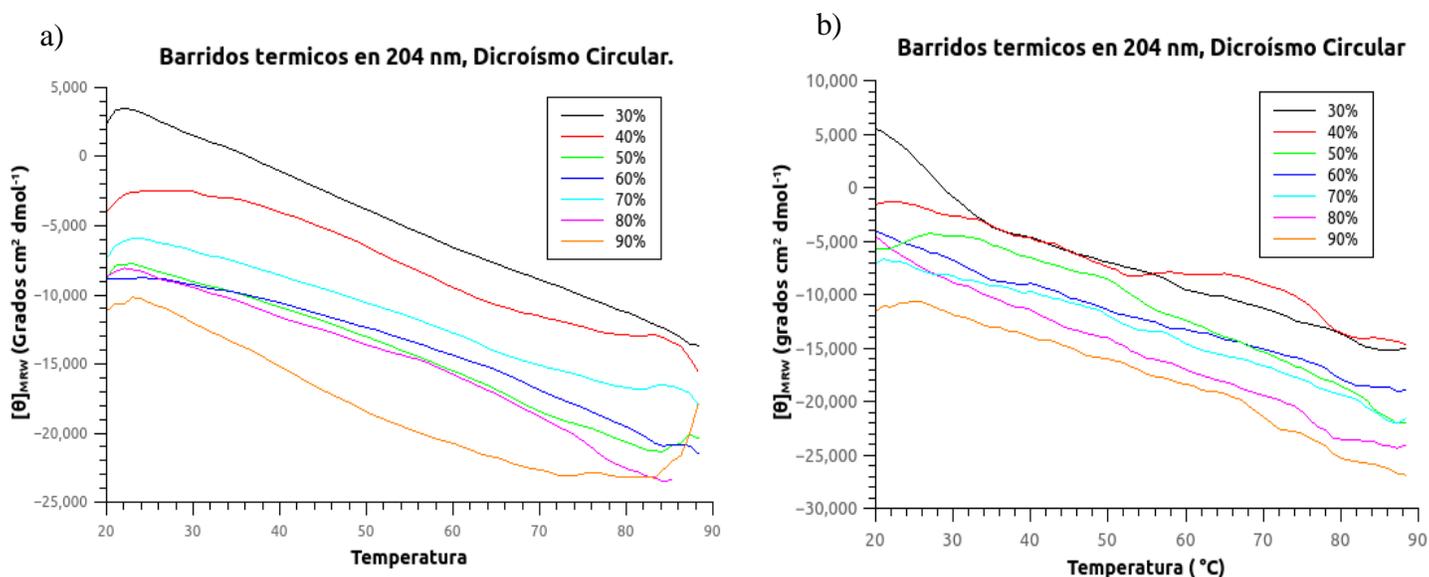


Figura 26.- Barridos térmicos de 20 a 90°C, con longitud de onda fija a 204 nm., correspondientes a soluciones de 90 a 30% etanol/agua (a) y metanol/agua(b). En ninguna de las mediciones el HT supero los 300 V.

Los resultados de las soluciones en metanol/agua muestran que de 90 a 50% se tiene un comportamiento similar al observado en las de etanol/agua, a excepción de que con este alcohol no está la pequeña señal que sube y baja pasados los 84 °C. Nuevamente aunque observamos una señal que cambia, no hay una

transición térmica ya que la caída es constante. En 40 % se presenta una zona con una señal que sube y baja de los 55 a los 78 °C, con máximo en alrededor de 70 °C, siguiendo posteriormente la tendencia decreciente vista de 20 a 54 °C. Finalmente en 30 % observamos una caída pronunciada desde los 20 a los 32 °C, temperatura a partir de la cual la señal decae con una pendiente menos negativa, con tendencia similar al resto de porcentajes. Respecto a los HT (V) estos nunca superan los 300 V.

5.3.2.- Espectros a 85 °C y re-enfriados a 20 °C: Efecto de la temperatura y reversibilidad.

Los resultados de los espectros a 85 °C de las soluciones en etanol/agua se muestran en la figura 27. Como observamos en ningún caso se logró obtener un HT inferior a 600 V entre 190 y 192 nm, la tendencia general parece sugerir que cuanto mayor es el porcentaje de etanol, mayor es la longitud de onda límite a la cual el HT supera los 600 V. Respecto a los espectros, observamos que a excepción de 90% donde aún se define tenuemente, los mínimos en 222 nm se pierden, la señal presenta una tendencia de caída constante desde alrededor de los 240 hasta los 212 nm. En el caso del segundo mínimo en 208 nm, obtenemos valores siempre más negativos que los vistos en los espectros en 90% alcohol/agua a 20 °C, los cuales presentaron los mínimos más profundos en esas mediciones. También se observó que en los porcentajes de alcohol menor al 60% el mínimo en 208 nm se corre a la izquierda entre los 206 y 205 nm.

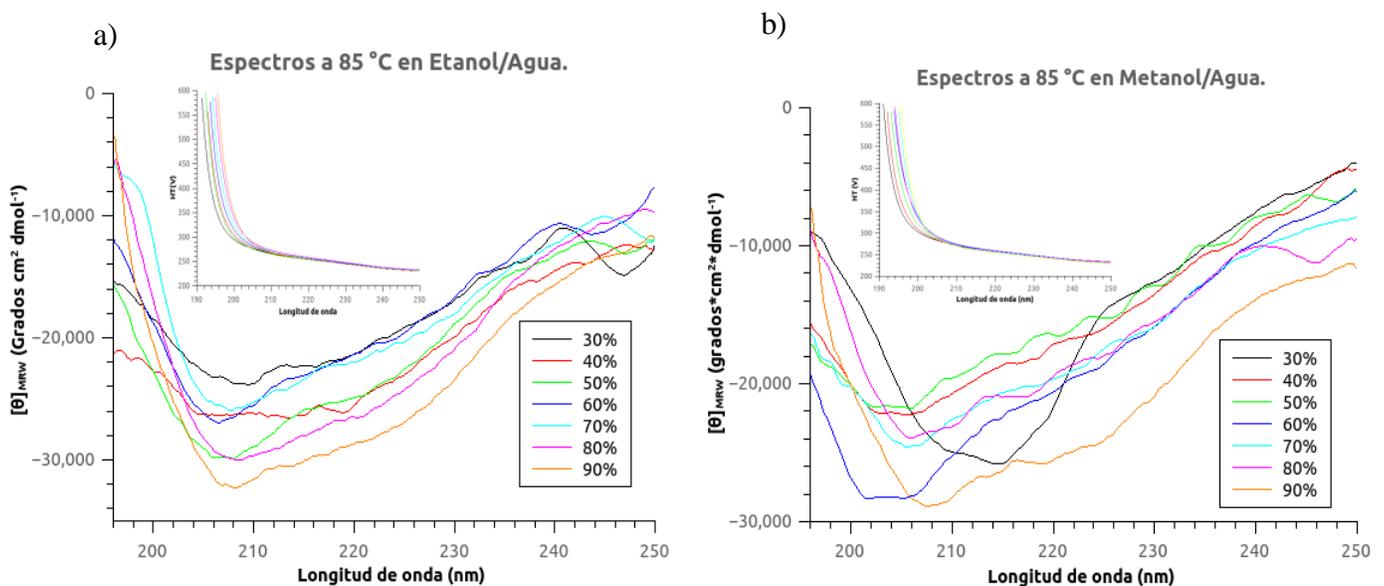


Figura 27.- Espectros de dicroísmo circular a 85 °C de soluciones enriquecidas en Z19 con concentración de 0.025 mg/mL en distintos porcentajes de: etanol/agua (a) y metanol/agua (b).

Los HT (V) aumentan drásticamente a partir de los 200 nm, lo que provoca que aumente el ruido en las mediciones, especialmente aquellas con longitudes de onda menores a 196 nm.

En los espectros de 85 °C reportados no se presentaron los datos inferiores a 192 nm debido a los HT (V), sin embargo si se consideraron para la estimación el contenido de estructura secundaria, ya que el programa CONTIN solo acepta conjuntos de datos completos de 190 a 250 nm. Para disminuir la variabilidad en esa zona se realizó un suavizado de los espectros con el software open source QtiPlot los resultados del cálculo se muestran en la figura 28. Si bien es difícil hacer un análisis detallado de los cambios estructurales, nuestros resultados muestran que en general en metanol las estructuras desordenadas son favorecidas con el calentamiento, mientras que en etanol las hélices aun predominan como estructura secundaria principal. Estos indicios sugerirían que en el segundo alcohol las hélices serían más estables que en el primero.

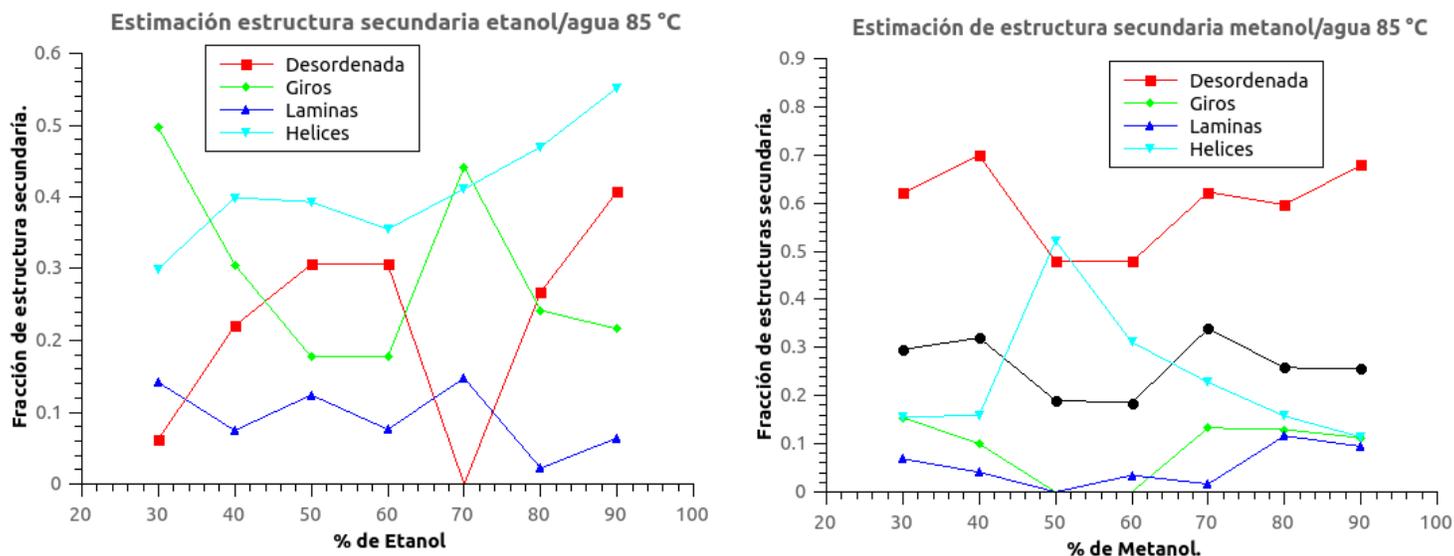


Figura 28.- Estimaciones del contenido de estructura secundaria de soluciones enriquecidas en Z19 en distintos porcentajes y tipos de alcohol. Las estimaciones se realizaron con la herramienta en línea DicroWeb, programa CONTIN y set de datos 7 de 190 a 260 nm.

Se compararon las mediciones a 20 y 85 °C, calculando el porcentaje en el cambio de abundancias de cada estructura secundaria con la ecuación 3, los resultados se muestran en la figura 29. En ellos se observa mejor el mantenimiento de las estructuras en hélices en las soluciones en etanol/agua, con disminuciones siempre inferiores al 30% y con valores muy similares desde 50 y hasta el 90%. En contra parte las soluciones en metanol/agua muestran una caída en las hélices desde el 50% alcanzando

disminuciones en la abundancia de casi el 80% en el porcentaje más alto. A cambio de esta caída el metanol favoreció las estructuras desordenadas, las cuales al menos se duplicaron en los casos con menor aumento. Este alcohol también favoreció el aumento en las láminas a partir del 70%, caso contrario etanol donde no hay una tendencia definida.

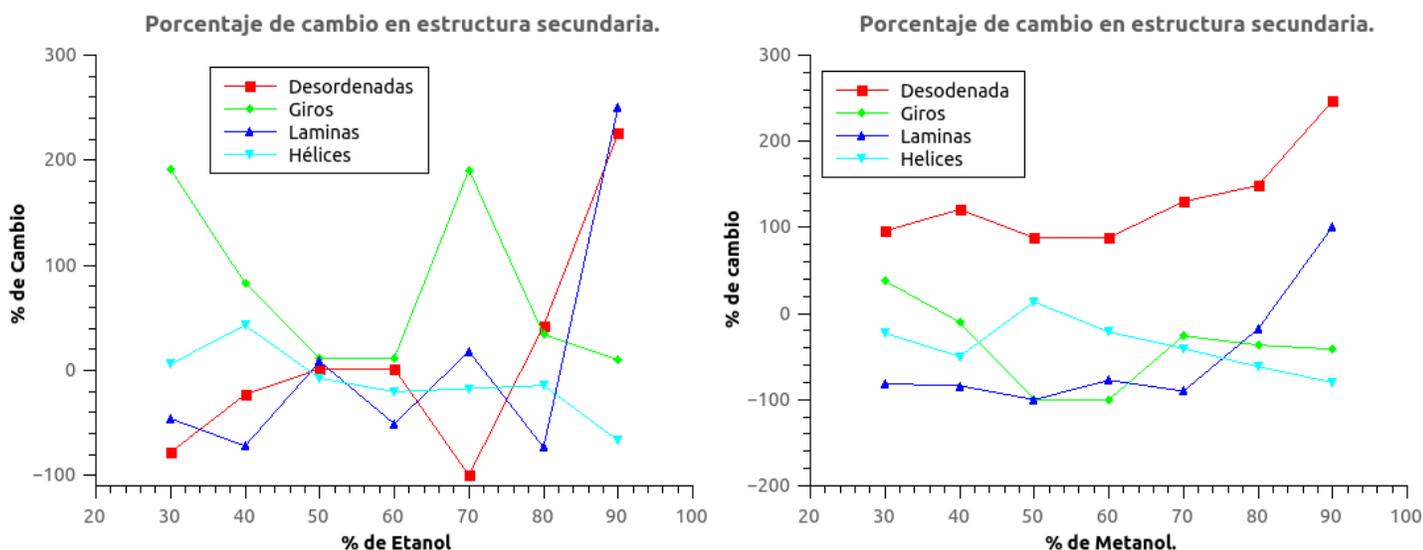


Figura 29.- Análisis del cambio en la abundancia de las estructuras secundarias debido al calentamiento de la proteína.

Las soluciones fueron re-enfriadas a 20 °C y medido su espectro de dicroísmo, los resultados se muestran en la figura 30. En ella observamos que de 90 a 60% alcohol la proteína recupera el espectro característico. Mientras que en los porcentajes más bajos no, pues el mínimo en 208 nm tiende a disminuir o desaparecer, el de 222 nm a correrse a longitudes de onda más largas y el máximo en 194 a disminuir y correrse también al rojo. La calidad de los espectros mejoro respecto a las mediciones a 85 °C, ya que los HT (V) nunca superaron los 600V.

La estimación de estructura secundaria se reporta en la figura 31, en ella observamos que las soluciones etanol/agua 40 a 90%, son las hélices las más abundantes, seguidas por los giros, que tienden a decaer a medida que el contenido de este alcohol aumenta, mismo comportamiento que las láminas. En metanol/agua las estructuras desordenadas son las más abundantes, duplicando el contenido de las hélices, en este alcohol los giros parecen cambiar poco en todo los porcentajes. Los resultados muestran nuevamente que el etanol tiende a favorecer contenidos de hélices mayores respecto a metanol.

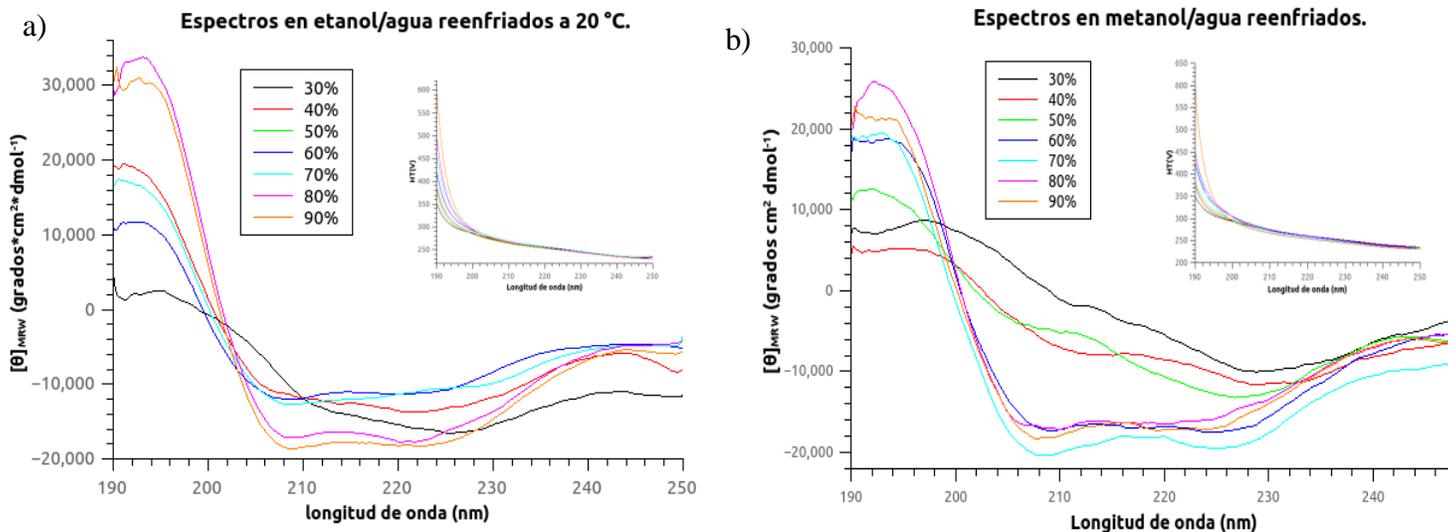


Figura 30.- Comparación de espectros de soluciones re enfriadas enriquecidas en Z19 en distintos porcentajes de: etanol/agua (a) y metanol/agua (b). Los HT (V) son inferiores a 600 V en todo el intervalo de longitudes de onda y para todas las soluciones.

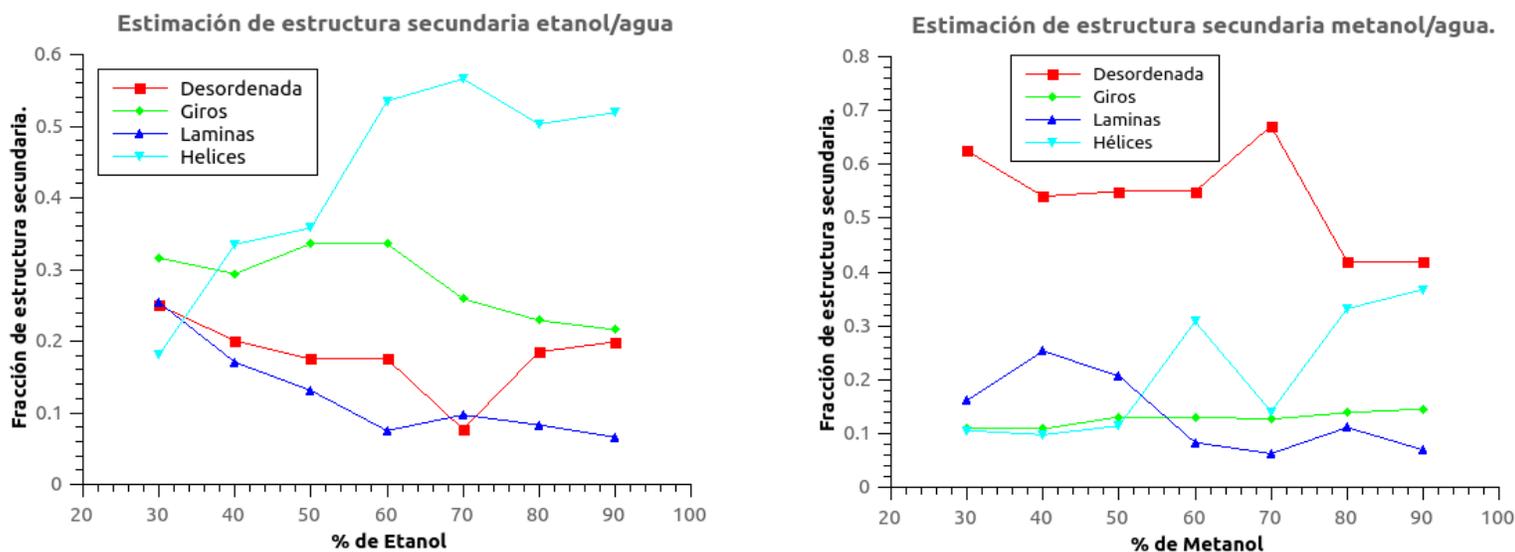


Figura 31.- Estructura secundaria estimada de soluciones re enfriadas a 20 °C. De zeína 0.025 mg/mL en distintos porcentajes de metanol/agua

Los porcentajes de cambios entre los resultados de contenido de las estructuras secundarias a 20 °C al inicio de los experimentos y el re-enfriado a la misma temperatura fueron calculados con la ecuación 3 y se muestran en la figura 32. En ella observamos que mientras en las soluciones etanol/agua los giros tienden a ser la estructura con mayor cambio de 30 a 80% (a 90% es superada por las desordenadas), en

metanol/agua, apenas cambian, otorgando valores de disminución no mayores al 10% de 60 a 90%. En este segundo alcohol son las estructuras desordenadas las que aumentaron, al menos duplicándose en todos los porcentajes. Las hélices muestran una tendencia oscilante en las soluciones con etanol/agua, presentando porcentajes de cambio entre el 15 y -35%, hasta el 60% etanol, porcentaje a partir del cual se presenta una disminución en la abundancia de esta estructura. En metanol, las hélices siempre presentaron porcentajes de cambio negativos es decir de pérdida que alcanzaron el -70% en 50% metanol/agua, la tendencia decreciente tiende a atenuarse con el aumento del alcohol en la solución. En cuanto a las láminas, estas parecen ganar abundancia en las soluciones re-enfriadas, en los porcentajes con mayor contenido de alcohol, presentando cambios tanto positivos como negativos (incluso nulos en algunos casos) previo al 60% etanol/agua y al 70% metanol/agua. Los resultados muestran que en etanol las hélices tienden a perderse menos debido al calentamiento, respecto al metanol, esta tendencia fue vista en todos los resultados de dicroísmo circular.

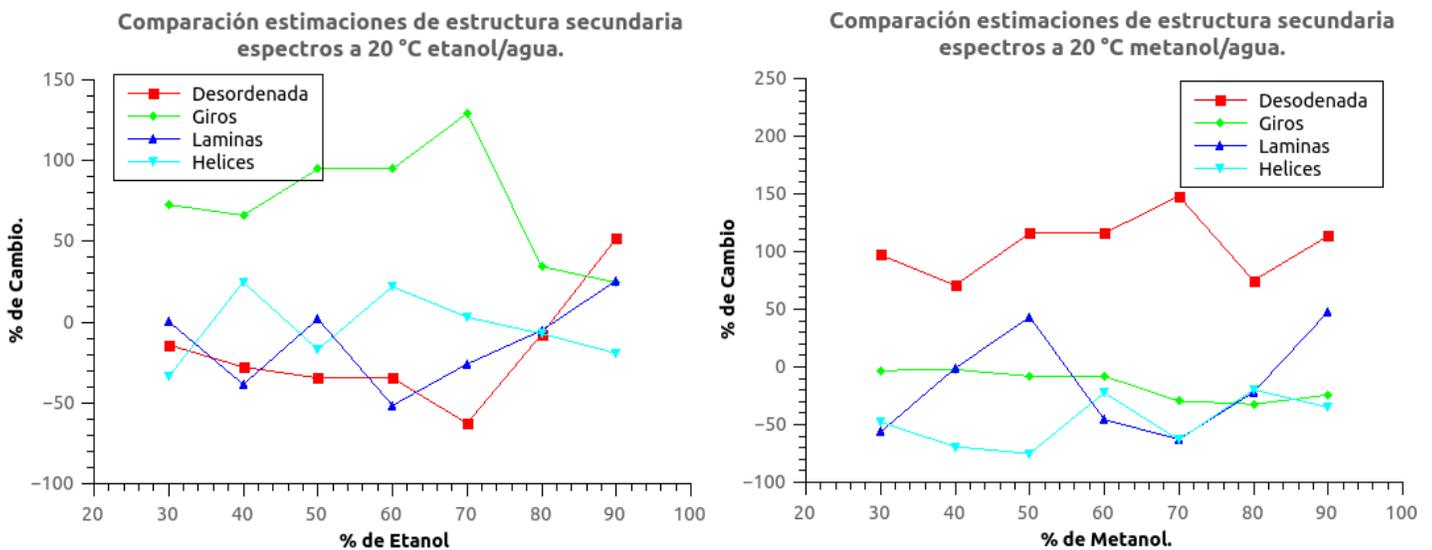


Figura 32.-Porcentaje de cambio entre espectros a 20 °C sin calentamiento y re-enfriados a la misma temperatura. Entre menor sea el porcentaje de cambio mayor es la reversibilidad en la estructura analizada debido al enfriamiento.

5.4.- Estudios de fluorescencia

La figura 33 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de soluciones enriquecidas en Z19 en distintos porcentajes de etanol (izquierda) y metanol (derecha). Los resultados presentan un apagamiento en la intensidad de fluorescencia con el aumento del porcentaje de agua en el solvente, a excepción de

metanol/agua 30%, solución que mostró una señal mayor respecto a los 3 porcentajes previos, en un efecto que está relacionado a la concentración, ya que esta fue la única solución con concentración de proteína de 0.035 mg/mL. En los porcentajes más bajos de alcohol los espectros presentan una señal muy intensa en longitudes de onda menores a 295 nm. Este efecto fue visible en etanol/agua de 40 a 30% y en metanol/agua desde el 50 al 30%.

Con los espectros se calcularon los centros de masa espectrales (CME) por solución, estos se reportan en la figura 34. Los resultados sugieren un corrimiento al azul en el CME con la disminución del porcentaje de alcohol en el solvente. Este desplazamiento es pequeño en los porcentajes de 90 a 50%, en etanol, donde la variación entre porcentajes no supera los 2 nm, teniendo el cambio más significativo de 60 a 50%. En metanol la zona se extiende de 90 a 40%, teniendo el cambio más significativo de 70 al 60%, con una diferencia ligeramente inferior a los 2 nm entre uno y otro. En porcentajes menores de alcohol, la disminución en el CME se acentúa, mostrando una caída desde 300 hasta 294 nm de 50 a 30% etanol y de 298 a 293 nm en metanol de 40 a 30%.

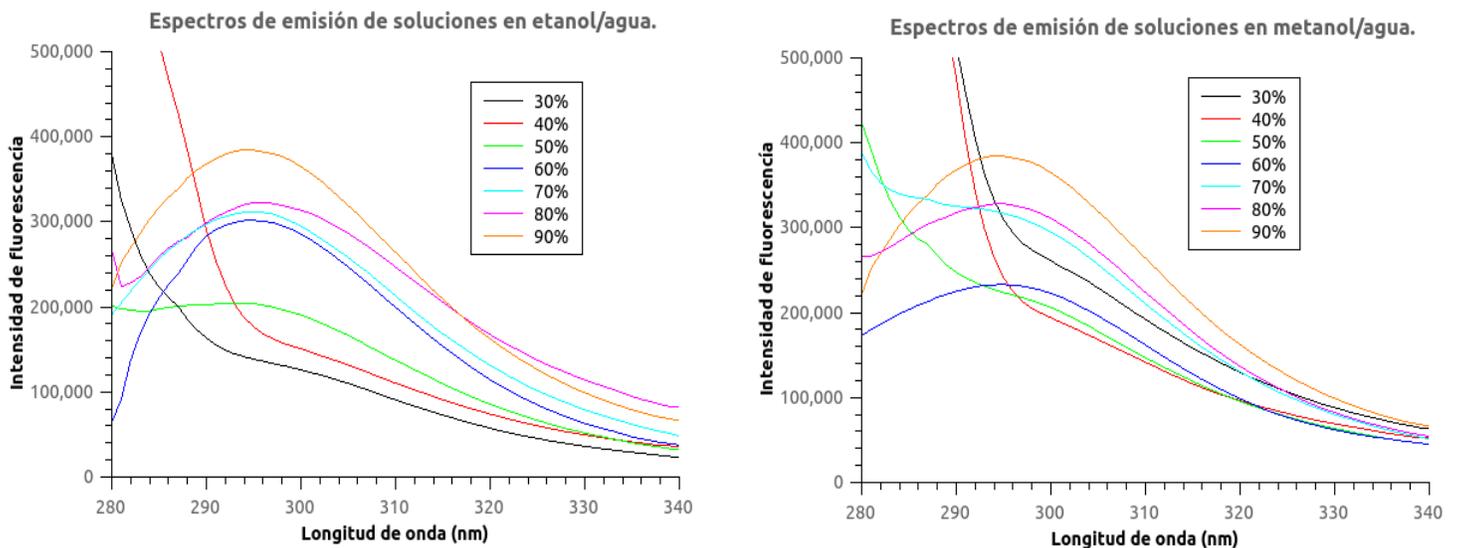


Figura 33.- Espectros de emisión de fluorescencia a 20 °C de soluciones enriquecidas en Z19, 0.025 mg/mL de concentración (a excepción de metanol/agua 30% que se midió a 0.035 mg/mL), en distintos porcentajes de etanol y metanol/agua. La excitación se realizó a 275 nm, teniendo como objetivo las tirosinas.

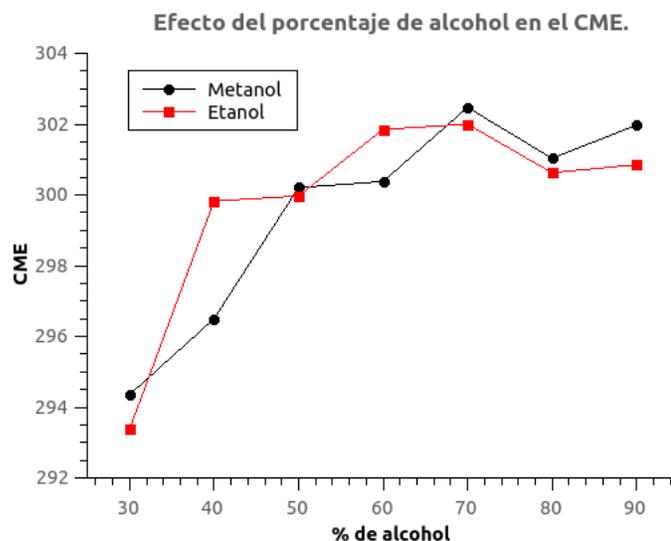


Figura 34.- Centros de masa espectral a 20 °C de soluciones enriquecidas en Z19, en distintos porcentajes de etanol y metanol/agua. El cálculo se realizó con las mediciones de 280 a 340 nm.

Las soluciones fueron también sometidas a calentamiento, tomando un espectro de emisión cada 5 °C, desde los 20 °C hasta los 85 °C. La figura 35 muestra los resultados de 90 y 30% etanol/agua, los cuales describen el efecto de apagamiento con la temperatura visto en todos los porcentajes con este alcohol. En el primero de los espectros presentados como muestra, la intensidad de la señal se reduce en un 50% de 20 a 85°C, mientras que en el segundo porcentaje la señal se reduce alrededor de 4 veces en el mismo intervalo de temperatura. Por otro lado las soluciones en metanol/agua, presentaron un comportamiento similar, pero más acentuado. En 90% la señal cae casi en un 60%, desde 20 a 75 °C, valor superior al visto en el primer alcohol, aun cuando la temperatura final fue 10 °C menor. En el segundo porcentaje la emisión se redujo poco más de 3 veces la señal de 20 a 85 °C.

Con los espectros de los 7 porcentajes en cada alcohol se estimaron los CME, los cuales se graficaron contra la temperatura en la figura 37. En ella observamos lo que parece un corrimiento al rojo con el aumento de la temperatura, un efecto característico de proteínas que se desnaturalizan térmicamente, ya que el cromóforo pasa de un ambiente menos polar en el arreglo espacial interno de la proteína a uno más polar exponiéndose al solvente¹¹⁵. Como sabemos, la molécula de agua es polar y es de hecho la característica que la vuelve el solvente por excelencia de sales y moléculas cargadas. Pero además, tanto el etanol como el metanol presentan cierto grado de polaridad debido a sus grupos OH. Si bien el desplazamiento a la derecha de los CME es claro, no supera los 6 nm en ninguna de las mediciones de 20 a 85 °C. Las mediciones muestran también valores inferiores en los CME con el aumento del porcentaje en el agua, sin embargo las diferencias no son iguales entre porcentajes, pues se observa una

disminución más significativa de 90 a 80%, seguido por una zona de cambios menos intensos de 80 a 40% en etanol/agua y de 80 a 50% en metanol/agua. Concluyendo con una segunda zona de cambio importante de 40 a 30% en el primer alcohol y de 50 a 40% en el segundo.

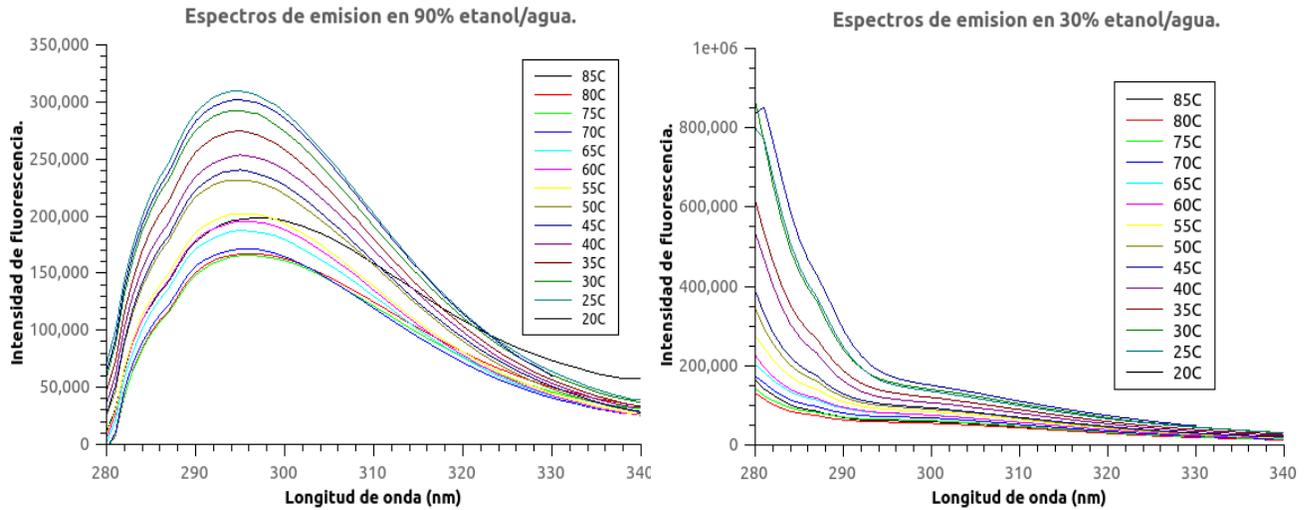


Figura 35.- Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones enriquecidas en etanol/agua 90% (izquierda) y 30% (derecha), ambas con concentración de 0.025 mg/mL. Los resultados muestran el apagamiento debido a la temperatura.

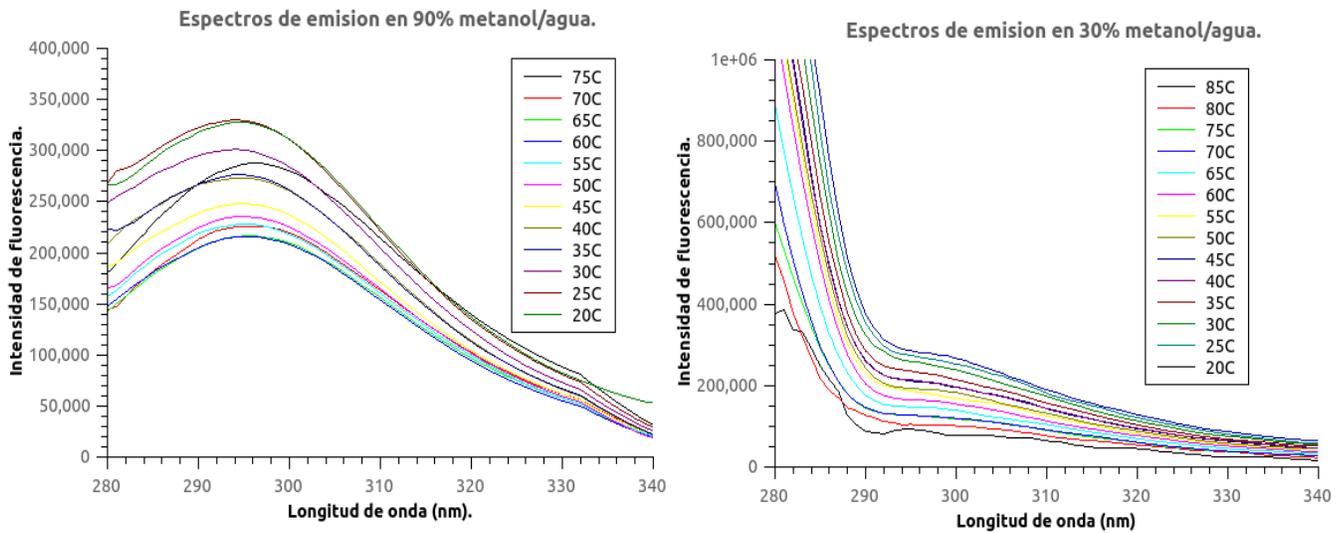


Figura 36.- Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones enriquecidas en metanol/agua 90 (izquierda) y 30% (derecha), con concentración de 0.025 y 0.035 mg/mL respectivamente.

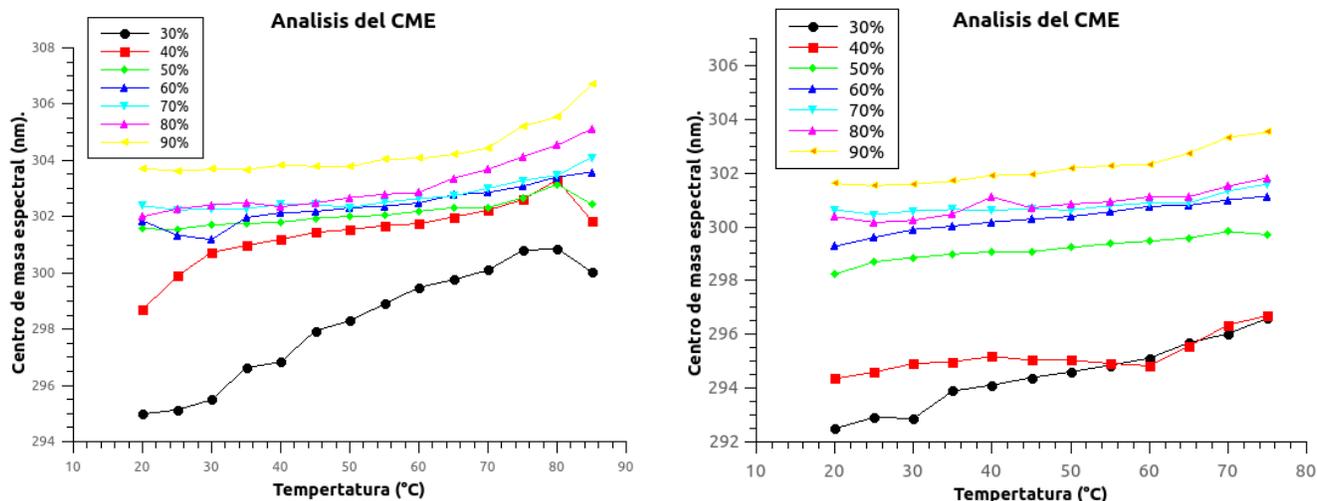


Figura 37.- Centros de masa espectral de soluciones enriquecidas en Z19, en etanol/agua (izquierda) y metanol/agua (derecha).

5.3.- Estructura 3D y predicción del área expuesta al solvente (ASA).

Tabla 6.- Parámetros estimados a partir de las secuencia P04027 en ProtParam de ExPASy.

Parámetro	Valor
Punto isoeléctrico.	7.63
Peso molecular estimado (Da)	24,060.89
Estimación del coeficiente de extinción molar en agua ($M^{-1} cm^{-1}$)	12,045

Previo a la predicción del modelo se estimaron alguna propiedades a partir de la secuencia P04702 de la Z19 wild type, con la herramienta ProtParam, los resultados se muestran en la tabla 6. Estos sugieren que esta proteína tendría una carga positiva en el pH utilizado durante la purificación por lo que podría interaccionar con la resina empleada. Además su tamaño difiere entre 700 y 50 Da, respecto a las dos señales principales en la espectrometría de masas de 23.33 y 23.96 kDa. Por otro lado el coeficiente de extinción molar en agua estimado por la herramienta es muy parecido al reportado para una Z19 pura en metanol/agua al 70% por Cabra y colaboradores¹⁶ de $12,415.49 M^{-1} cm^{-1}$.

Tabla 7.- Resultados de predicción de modelo tridimensional de Z19 con secuencia P04702.

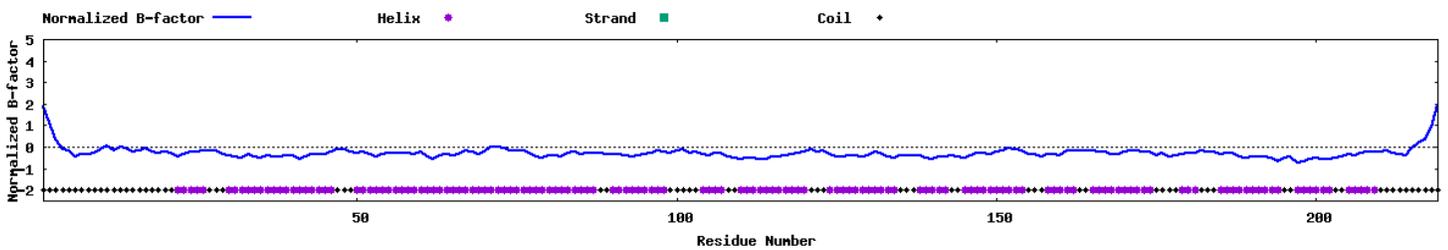
Parámetro	Valor
C-Score	-3.01
Tm-Score	0.37 ± 0.13

Una de las predicciones realizadas por I-TASSER son los factores B normalizados, estos son considerados como un indicador del movimiento vibracional relativo de los átomos en una proteína. Es ampliamente aceptado considerar que valores bajos de este parámetro usualmente pertenecen a sitios bien ordenados y valores más altos son parte de residuos o regiones más flexibles⁹⁶. Los resultados en la figura 38.a, muestran los factores B graficados contra la posición o número de residuo, en ellos observamos que los valores más altos aparecieron en los extremos de la secuencia en los primeros 4 residuos y en los últimos 6. En la zona intermedia los valores oscilaron entre 0 y -1. La predicción de estructura secundaria también es presentada en función de la posición o residuos por la herramienta como se muestra en la figura 38.b, en ella observamos 15 regiones ordenadas en hélices, con longitudes variables entre 3 y 28 residuos, el resto de residuos presentaron una estructura en espiral o enroscada, usualmente relacionadas con zonas desordenadas. Finalmente los parámetros C- y Tm-score, estimados por I-Tasser se presentan en la tabla 7. El primer parámetro es una medida de la confiabilidad del modelo predicho, sus valores oscilan entre -5 y 2, considerando que aquellos C-score más altos corresponden a modelo con mayor confiabilidad. En el segundo caso es una medida de la similitud entre el modelo y la posible conformación nativa real de la proteína, usualmente los TM-score arrojan valores entre 0 y 1, considerándose que cuando $TM\text{-score} > 0.5$ el modelo tiene una topología correcta y cuando $Tm < 0.17$ la similitud es aleatoria.

El modelo tridimensional se presenta en la figura 39.a, y se compara con el modelo propuesto por Forato y colaboradores en 2004⁸², de estructura de horquilla, presentando en 39.e. La predicción mostró 15 zonas con α -hélices, con longitudes de 5 a 35 residuos cada una, con un promedio ponderado de 10 aminoácidos de extensión. Por otro lado las mediciones realizadas en el visualizador molecular *open source* Pymol en 39.c, otorgaron medidas de 12 a 15 Å en la sección transversal y de alrededor de 158 Å de longitud. Además, la estructura presenta regiones y caras hidrofóbica e hidrofílicas intercaladas,

que se orientan tanto al interior del arreglo como al exterior (expuestas a solvente), como puede observarse en la figura 39.d.

a)



b)

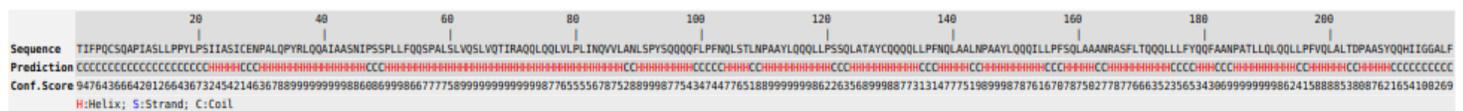


Figura 38.- Resultados de predicción de estructura con la herramienta I-TASSER: a) Factores B normalizados y b) Predicción de estructura secundaria, ambos casos graficados contra la posición o residuo.

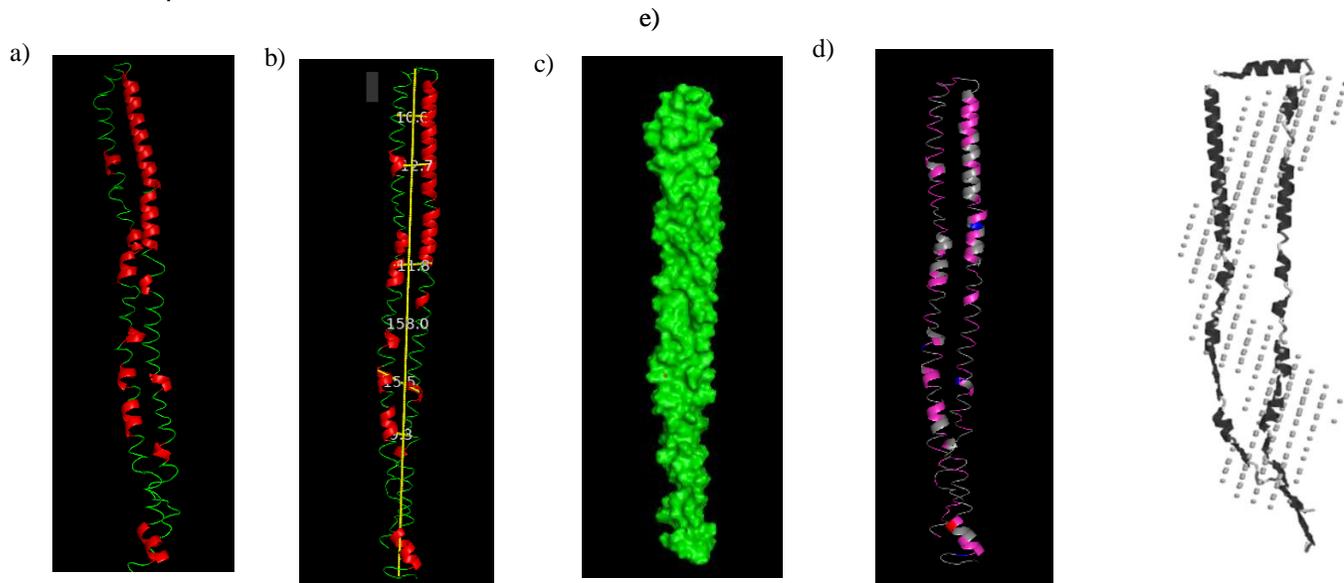


Figura 39.- Predicción de estructura 3D de la secuencia P04702 de una Z19 con la herramienta en línea ITASSER (a), mediciones de la longitud y sección transversal del modelo con el visualizador Pymol (b), Volumen y superficie del modelo (c), Resalte de zonas hidrofóbicas en gris, polares hidrofílicas en magenta, cargadas positivamente en azul y con carga negativa en rojo (d). Modelo de horquilla propuesto por Forato y colaboradores (e)⁸².

Tabla 8.- Comparación de resultados de DC de solución enriquecida en Z19 90% etanol/agua y modelo tridimensional predicho en I-TASSER.

Modelo	% α -hélices	% Laminas- β	% de Giros y estructuras desordenadas.
Resultados DC	64.0	5.0	30.0
ITASSER	67.6	0.0	32.4

La tabla 8 muestra una comparación con el contenido y porcentaje de estructuras secundarias de la predicción de estructura 3D y Las estimaciones con los resultados de DC de una solución de zeína en etanol/agua 90%. En ella observamos valores de hélices muy similares, difiriendo entre el experimental y el modelo en un 5% aproximadamente. Los giros y estructuras desordenadas también presentaron valores muy parecidos con diferencias ligeramente menores al 10%. Por otro lado el modelo no presento estructuras en láminas, a diferencia de las estimaciones experimentales que sugieren un contenido del 5% en estas estructuras.

Tabla 9.- Resultados de estimación de área superficial accesible a solvente, para el modelo 3D predicho mediante la herramienta I-TASSER (seq. P04072).

Estimación ASA del modelo predicho en I-TASSER		
Numero de residuo	Área superficial expuesta (Å ²)	Exposición relativa (%)
18	62.6	25.9
35	129.2	53.5
93	87.5	36.2
113	122.6	50.8
128	54.4	22.5
148	112.7	46.7
178	105.4	43.6
209	101.0	41.8

Por último se realizó la estimación del área superficial accesible a solvente (ASA) con la herramienta en línea *Accessible Surface Area and Accessibility Calculation for Protein (ver. 1.2)*. Del resultado se escogieron los correspondientes a las tirosinas, presentándose en la tabla 9. En ella podemos observar que estos residuos presentan cierto grado de exposición en todos los casos, ya que la exposición relativa que compara el valor calculado con la exposición máxima posible en la tirosinas de 241.54 Å², nunca fue inferior a 22%.

Capítulo 6:

Discusión.

6.1.- Enriquecimiento en Z19.

Los resultados de espectrometría de masas muestran que la fracción F1 recuperada luego de las dos etapas cromatográficas está enriquecida principalmente en dos especies con masas molares de 23.33 y 23.96 kDa. Ambas se encuentran dentro del intervalo de masas reportado en la literatura para las α -zeínas Z19, de 23.35 a 25.6 kDa^{16, 87,97-99}. Por tanto se considera que estas dos señales deben corresponder a dos isoformas de esta subclase de zeína. La comparación con los espectros del extracto inicial y la fracción M7, mostró que las dos etapas cromatográficas enriquecen F1 principalmente en la especie de 23.96 kDa. Por lo anterior podemos plantear que las especies de Z19 con pico en 23.96 kDa eluyen principalmente en los gradientes de 0 a 14 mM de NaCl, y por tanto que las fracciones recuperadas en la zona de 0.7 M de NaCl (representadas en M7) tienen menor contenido en esta especie. La muestra F1 presentó una tercer especie con masa molar de 26.77 kDa, correspondiente a una Z22, ya que está en el intervalo de masas descrito en la literatura para este tipo de α -zeínas de 26.26 a 27.13 kDa⁹⁸. La comparación de intensidad de las señales análogas en M7 y el extracto muestran una reducción de alrededor del 50% en F1, por lo que aunque el método de purificación no elimina totalmente las Z22, si las reduce.

Si bien no se logró tener una solución únicamente con zeínas de la subclase Z19, las cromatografías lograron despigmentar y remover 3 señales pequeñas obtenidas en el extracto comercial con masas molares de 14.46, 17.32 y 20.27 kDa. De estas la segunda y la tercera también aparecen en los resultados de M7, por tanto de las 3 muestras probadas, F1 resultó ser la menos compleja. Respecto a las 3 especies, las masas no corresponden a ningún tipo de α -zeína reportada pero si para una δ -zeína (dz10) con peso molecular de 14.41 kDa, para una β -zeína (bz15) con peso molecular de 17.45 kDa y para una γ -zeína (gz27) de 21.2 kDa⁹⁸.

Pruebas de dicroísmo circular y fluorescencia, mostraron que las dos etapas cromatográficas no provocan la pérdida del espectro característico de una proteína rica en hélices y ni la pérdida de la emisión de fluorescencia al excitarla a 275 nm, teniendo como objetivo las tirosinas. Por tanto esta solución enriquecida en Z19 podía ser utilizada para los estudios de dicroísmo y fluorescencia siguientes.

6.2.- Estudios de Dicroísmo Circular

Los resultados de los espectros de DC a 20 °C mostraron una pérdida en estructuras secundarias de hélices a cambio de una ganancia en hebras, cuando las soluciones enriquecidas en Z19 disminuyen su porcentaje de alcohol. Este efecto ya había sido reportado en dos trabajos previos: el más reciente de Erickson y colaboradores en 2020⁷⁷ y otro publicado 8 años antes por Wang y Pardia⁵¹, descritos en el apartado 2.2.

Estas transiciones no se dieron de forma gradual en todo el intervalo de porcentajes, ya que las soluciones de 80 a 50% presentaron menores diferencias tanto en sus espectros como en sus contenidos de estructuras secundarias respecto a lo visto en 90 a 80% y de 50 a 40%. Este intervalo de porcentajes coincide con el de mayor solubilidad, según lo visto en el diagrama ternario de solubilidad construido por Shukla y Sheryan¹⁰ presentado en la figura 40.a. En esa misma imagen observamos que a partir de 90% etanol la solubilidad se reduce drásticamente y en 40% tenemos fenómenos de coacervación, los autores describen que en soluciones de zeína con etanol >90% y < 40% se presentan dos fases, una con la proteína en solución y otra con precipitados dispersos, por lo que se consideran porcentajes de transición entre la solubilización y precipitación completa. La comparación con nuestros resultado sugiere que en condiciones de insolubilidad las α -zeínas podrían tener un exceso de estructuras secundarias helicoidales o de hebra, las primeras favorecidas por el alcohol las segundas por el agua. El gráfico de la proporción α -hélices: hebra- β contra el porcentaje de alcohol que se presenta en la figura 40.b muestra que en los porcentajes donde la proteína es soluble se tiene primero una tendencia de reducción en la proporción: en etanol de 50 a 60% con un valor mínimo cercano a 3:1 y en metanol del 50 al 70% con un valor mínimo cercano a 2:1. Para luego presentar una tendencia creciente que se dispara de 80 a 90%, donde pasa de 6:1 en etanol y 3:1 en metanol hasta 12:1 en ambos alcoholes. Esto sugiere que las mejores condiciones de solubilidad son aquellas donde la proteína tiene una proporción de α -hélices: hebra- β entre 2:1 y 3:1, reduciéndose drásticamente si esta disminuye del primer valor o aumenta de 6:1.

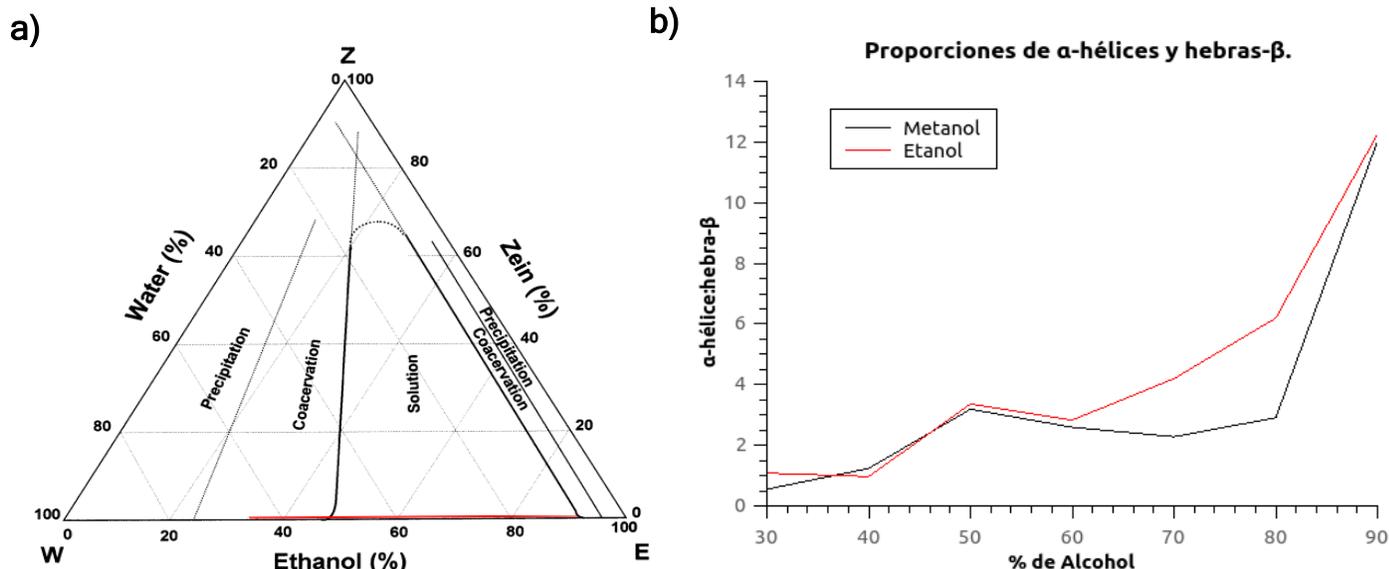


Figura 40.- Diagrama de fase ternaria para la solubilidad de la zeína, extraído del trabajo de shukla y sheryan 2001¹⁰ en rojo se resalta la región de concentraciones de zeína y alcohol utilizadas en los estudios realizados en este trabajo (a). Gráfico de proporciones contra el porcentaje de alcohol, construido con nuestros resultados de las mediciones de dicroísmo circular a 20 °C (b).

Wang y Pardia propusieron que en las soluciones de zeína en etanol, la formación de una estructura de hebra- β energicamente favorable, durante el ensamblado de dos monómeros con plegado laminar, podría favorecer las transiciones de α -hélices originales a hebra- β , a medida que el solvente se vuelve más hidrofílico⁵¹. Esta propuesta toma como base el trabajo de Mutter y Hersperger, quien utilizaron péptidos diseñados para presentar transiciones de este tipo, inducidas por solvente¹⁰⁰. Estudios de la formación de oligómeros y agregados fibrilares a partir de péptidos β -amiloide, han sugerido que las láminas- β son estructuras estabilizadas por interacciones intermoleculares¹⁰¹, por lo cual son favorecidas durante los procesos de ensamblado molecular. Si se considera el alto contenido de α -hélices en las Z19 y Z22, además de una probable conformación extendida como ha sido sugerido en diversos trabajos^{24, 81-82}, se podría plantear que al aumentar el contenido de agua en el solvente, las estructuras secundarias helicoidales podrían colapsar, ya que las interacciones intramoleculares que las estabilizan (puentes de hidrógeno intramoleculares) tienden a ser desfavorecidas por ese solvente¹⁰⁰. Dado que las primeras hélices en romperse serían las más externas, estaríamos en un escenario donde zonas desordenadas expondrían a solvente residuos de todo tipo, entre ellos hidrofóbicos, que en estas proteínas representan alrededor del 52% del total en las secuencias¹⁰. Esto podría favorecer la interacción entre monómeros u oligómeros de proteína a partir de estos residuos expuestos, en un efecto que provocaría la expulsión de agua del interior de la asociación. Ya que la interacción se daría entre estructuras con una conformación

extendida, sería viable considerar que las moléculas se ensamblaran longitudinalmente, en un arreglo similar a dos hebras o cintas unidas. Esta interacción estaría orientada sobre un eje (en dirección de la longitud), por lo que como sucede en la formación de fibrillas β -amiloide, se podría favorecer que las zonas desordenadas que promovieron la asociación por efecto hidrofóbico, ahora adquieran un plegamiento laminar, con varias hebras- β dispuestas anti paralelamente^{51, 102-104}. Por tanto las transiciones de una estructura a otra, dependerían del grado de ensamblado en solución, que a su vez estaría en función de la cantidad de agua en la misma. En las condiciones donde el solvente es predominantemente hidrofílico (<40% alcohol), las estructuras laminares ensambladas podrían interactuar unas con otras generando un arreglo de capas que seguiría el mecanismo de auto-ensamble de zeínas propuesto en la referencia citada al inicio del párrafo. Esto provocaría la formación de agregados más grandes que podrían precipitar, generando la insolubilidad reportada en el diagrama en esos porcentajes de etanol/agua.

Estudios con péptidos como la melitina¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ y proteínas como la β -lactoglobulina¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, han mostrado que el alcohol en la solución tiende a favorecer la formación de α -hélices, estabilizándolas mediante dos mecanismos: primero permitiendo interacciones intramoleculares de puentes de hidrógeno¹⁰⁰ y segundo mediante la interacción de las zonas hidrofóbicas extendidas en el arreglo helicoidal y los grupos no polares en el alcohol¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Dado que la zeína tiene casi igual proporción de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos¹⁰, el aumento del alcohol favorecería la formación de hélices por los dos mecanismos, ya que los primeros formarían más puentes de hidrógenos intermoleculares al disminuir el contenido de moléculas de agua con las cuales formarlos, mientras que los segundos podrían acomodarse expuestos en la hélice estabilizados por la interacción con el solvente principal. Lo anterior explicaría porque el contenido de α -hélices tiende a aumentar con el alcohol,

En el diagrama de fases ternario en la figura 40.a, observamos que la zeína presenta una pérdida progresiva de su solubilidad desde 60-70% etanol/agua, hasta volverse insoluble en porcentajes >90%. Pese a esto, las hélices siguen aumentando con el incremento del alcohol, tanto en los resultados de este trabajo, como en los reportados en otros^{23, 70, 71, 77,132}. Hirota y colaboradores¹⁰⁶ en sus estudios de formación de α -hélice inducida por alcohol en melitina, sugirieron que estas estructuras secundarias también podrían ser estabilizadas por interacciones intermoleculares hidrofóbicas. Ellos proponen que en las condiciones de solubilidad (concentraciones de proteína, sal, acidez y alcalinidad altas) en las cuales la melitina forma tetrámeros tipo micela, las interacciones intermoleculares entre residuos no polares en hélices de distintos monómeros podrían sustituir las interacciones con el alcohol, estabilizando estas estructuras. Kim y Xiu¹⁰⁸ han reportado que en soluciones de zeína en etanol/agua >90%, la proteína

tiende a formar oligómeros esféricos, considerados como posibles micelas inversas por los autores. Si el alcohol favorece las estructuras de α -hélices en la zeína, podría llegarse a un punto en el cual los residuos hidrofóbicos expuestos en esos arreglos, sean tantos que las moléculas de alcohol no sean suficientes para interactuar con todos, limitando así uno de los dos mecanismos de estabilización de estas estructuras¹⁰⁶. En ese escenario y como sucede con la melitina, las interacciones hidrofóbicas intermoleculares entre hélices en distintos monómeros podría ser una alternativa de estabilización, promoviendo con ello un proceso de oligomerización que disminuiría la solubilidad de la proteína y que podría generar un arreglo esférico tipo micela.

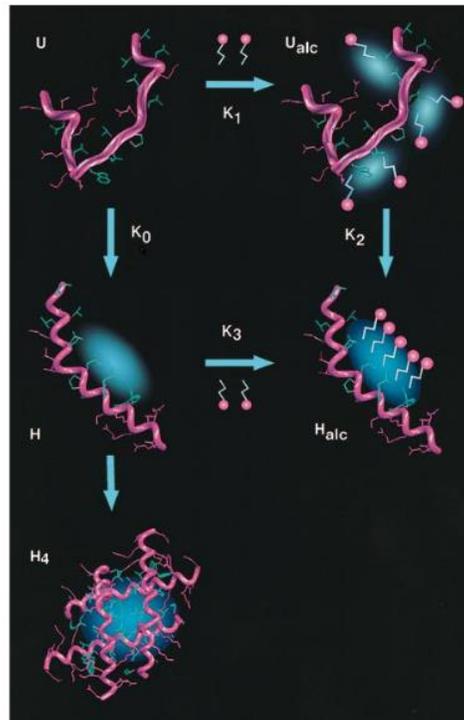


Figura 41.- Modelo de formación de α -hélice inducidas por solvente, en el péptido melitina, extraído del trabajo de Hirota y colaboradores¹⁰⁶. En la imagen las cadena laterales, grupos funcionales y regiones en azul simbolizan zonas hidrofóbicas y en magenta a hidrofílicas. Las K son las constantes de equilibrio entre distintos estados, las H a monómeros helicoidales y H_{alc} un monómero helicoidal con n moléculas de alcohol, U a un monómero desplegado, U_{alc} a un monómero desplegado interactuando con n moléculas de alcohol y H_4 a un tetrámero con arreglo tipo micela. El modelo presenta dos “rutas” para estabilización de hélices, una monomérica y otra oligomérica, en el primer caso las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos interactúan con las zonas de la misma naturaleza en las moléculas de alcohol, ayudando a los puentes de hidrógeno intramoleculares a estabilizar la estructura. En el segundo caso interacciones intermoleculares con las cadenas laterales hidrofóbicas de otros monómeros permiten estabilizar las hélices en el oligómero.

Uzun y colaboradores¹⁰⁹, analizaron mediante USAXS (Ultra-small-angle x-ray scattering) una serie de soluciones de zeína en mezclas binarias de etanol/agua del 70 al 90%, con concentraciones de proteína de 30, 40 y 60%, encontrando que en estas se tenían 3 regiones distintivas, cada una correspondiente a diferentes estructuras coexistentes que tienen una organización jerárquica. La primera región consistió en estructuras bidimensionales con forma de varilla, consideradas por los autores como monómeros de zeína, la segunda región constituida por estructuras con formas laminares, que se sugirieron se trataba de ensambles, mientras que en la tercera se observaron lo que se considera son agregados con superficie rugosa y morfología esférica. Si bien en este escrito de tesis las concentraciones empleadas fueron inferiores al 1%, es posible encontrar algunas coincidencias entre lo discutido hasta este punto y lo observado por los autores antes citados. Por ejemplo, los ensambles laminares coinciden en descripción con los que se ha planteado podrían promover las transiciones de α -hélices a hebras- β y que según la evidencia se forman incluso en condiciones de proteína diluida, por lo que en concentraciones mayores como es el caso de la referencia, la presencia de estos ensambles debe ser más abundante (o en estructuras de mayor tamaño), debido a la dependencia de la oligomerización respecto a la concentración de zeína^{86, 109, 113}. Por otro lado las estructuras esféricas rugosas, podrían corresponder a agregados de los oligómeros tipo micela que se ha sugerido se forman cuando la zeína esta disuelta en altas concentraciones de alcohol¹⁰⁸, y que como fue discutido en el párrafo previo podrían ser consecuencia de interacciones hidrofóbicas entre hélices de diferentes monómeros en esas condiciones de solubilidad. Considerando todo esto, se podría sugerir que en la región de solubilidad las zeínas tienden a coexistir en 2 o hasta 3 estados estructurales, de los cuales el monomérico podría ser el principal y el resto serían lo suficientemente estables como para no promover la formación de agregados más grandes. El resultado de esta coexistencia serían las proporciones α -h: h- β que han sido descritas.

En lo relacionado a los estudios térmicos no se observaron transiciones en los barridos en 204 nm de 20 a 85-90 °C, sin embargo los espectros tomados en 85 °C, si mostraron diferencias respecto a los medidos al inicio de los experimentos (20 °C). Una de estas diferencias que podría ser un indicio de un proceso de desplegamiento, es el corrimiento del mínimo en 208 nm a 204 -205 nm, en porcentajes de alcohol >60%, un efecto que ya ha sido observado en estudios similares con otras proteínas como la β -lactoglobulina¹¹⁰ y la lisozima de huevo¹¹¹. Los resultados en este trabajo sin embargo no sugieren la presencia de un punto isodicroico en esa longitud de onda, entre los espectros con y sin calentamiento (como si lo hizo la segunda referencia), esto es visible sin necesidad de hacer un gráfico comparativo, ya que los valores de elipticidad en los espectros a mayor temperatura son significativamente más negativos que los de menor temperatura. El que los cambios durante los barridos fueran tan graduales muestra que

la proteína se desnatura en un intervalo de temperaturas largo, sugiriendo con esto que el desplegamiento es poco cooperativo, lo cual es reflejo de cambios entálpicos pequeños [referencia]. En otras palabras, este comportamiento podría indicar que se necesitan romper varias interacciones no covalentes para provocar la pérdida total de la estructura tridimensional de las zeínas.

Los calentamientos y enfriamientos, muestran comportamientos diferentes entre alcoholes, ya que el etanol tiende a favorecer el mantenimiento de las estructuras secundarias en α -hélices, mientras que en metanol estas cayeron significativamente a cambio de una ganancia en estructuras de hebra- β y desordenadas, estas últimas las principales tanto en 85 °C como en el re enfriado a 20 °C. Cabra y colaboradores⁷⁹ en sus estudios del efecto de los grupos sulfhidrilo en la agregación sugirieron que el desplegamiento térmico de las α -zeínas era irreversible, nuestros resultados por otro lado muestran que si hay cierto grado de reversibilidad, sobre todo en solventes con 50 a 90% alcohol, donde los espectros recuperan una parte de sus características al enfriarse la solución.

El que el etanol tienda a favorecer contenidos de hélices mayores a partir de porcentajes >60% y que estas sean más estables ante el calentamiento respecto a metanol, podría estar relacionado a las diferencias en las constantes dieléctricas, que a 20 °C son de 24.5 para el primero y 32.7 para el segundo. Cuanto mayor es esta constante mayor es la polaridad del solvente, por lo que este podría solvatar moléculas hidrofílicas más fácilmente¹⁻³, desfavoreciendo la formación de los puentes de hidrógeno intramoleculares que estabilizan a la α -hélice. Esto podría explicar también porque se ha logrado solubilizar zeína en porcentajes de metanol superiores al 95%, algo que no es posible al utilizar etanol en el solvente. Probablemente debido a que los monómeros de zeína tienen menor contenido de hélices y por tanto verían menos favorecida la oligomerización o bien podrían estabilizarse en agregados lo suficientemente estables como para permanecer en suspensión y no precipitar.

6.3.- Estudios de Fluorescencia.

Los resultados de fluorescencia a 20 °C sugieren que las tirosinas pasan a un micro ambiente más hidrofóbico a medida que aumenta el agua en solución, ya que el CME presenta un desplazamiento a longitudes de onda inferiores¹¹⁵. Por otro lado, la disminución del porcentaje de alcohol genera un apagamiento en la intensidad de fluorescencia, un proceso relacionado con procesos de interacción entre moléculas (de solvente o ligandos)¹¹⁷⁻¹²². Ambos efectos podrían estar sugiriendo una posible interacción hidrofóbica muy cercana a las tirosinas, o bien en la que participan. Erickson y colaboradores⁷⁷, en sus

estudios en soluciones de α -zeínas con el marcador fluorescente Tioflavina T (ThT), ampliamente utilizado para la detección de estructuras de hebra- β en fibrilla β -amiloides¹²³, encontraron que al aumentar el contenido de agua, no solo se favoreció un aumento en la intensidad de fluorescencia, también un corrimiento en el máximo de emisión a longitudes de onda más bajas. El aumento en la intensidad de emisión en este fluoróforo extrínseco se debe a su unión con regiones ricas en láminas- β en la proteína, mientras que el desplazamiento al azul, es consecuencia de que estas estructuras se forman en ambientes cada vez más hidrofóbicos. Los autores del trabajo sugirieron un proceso de auto-ensamble como el origen de las observaciones⁷⁷.

Remitiéndonos al mecanismo de transiciones de α -hélices a hebra- β , discutido en la sección anterior y con lo expuesto en el párrafo previo. Es probable que una o más tirosinas en la proteína se encuentren con cierto grado de exposición a solvente, en los porcentajes de alcohol más altos, ya que este aminoácido es apolar^{2,3} por lo que podría interactuar con las regiones no polares en las moléculas de estos solventes. Incluso sería favorable su posicionamiento en alguna estructura de α -hélice o giro¹⁰⁰. A medida que el solvente aumenta su contenido en agua, estos residuos podrían perder su conformación helicoidal y participar en el ensamble molecular, donde las interacciones hidrofóbicas juegan el papel principal, provocando que las tirosinas queden enclavadas en un micro-ambiente más hidrofóbico, ya que aunque los alcoholes son en general solventes de baja polaridad, aun la tienen gracias a sus grupos OH. Esto explicaría el desplazamiento al azul observado^{117, 118} y el apagamiento en la fluorescencia debido a la participación en la interacción¹²².

Los estudios en distintas temperaturas, mostraron el comportamiento característico de un proceso de desplegamiento térmico, con el apagamiento de la intensidad de emisión y el corrimiento al rojo del CME¹²⁴⁻¹²⁶. Este último presentó desplazamientos que no superaron los 2 nm, de 90 a 60% alcohol, un cambio pequeño si se compara con los resultados reportados para otras proteínas como la β -lactoglobulina donde el desplazamiento total fue de alrededor de 8 nm¹²⁷. Esto podría ser consecuencia de la posible conformación extendida de las α -zeínas, ya que en este escenario las tirosinas ya presentarían una importante exposición incluso antes de someterse a calentamiento. Una disposición elongada explicaría también la estabilidad térmica en porcentajes altos de alcohol, vista en nuestros resultados y los de Cabra y colaboradores⁸⁷ quienes reportaron un Tm de 88.2 °C, temperatura que no se alcanza en ninguna de nuestras mediciones. A partir de 50% el efecto es mayor, especialmente en etanol donde observamos un desplazamiento al rojo de casi 6 nm en 30% alcohol, lo que nos sugiere que en estos porcentajes las α -zeínas, las tirosinas podrían estar escondidas en una región hidrofóbica formada en estas condiciones de solvente, por lo que al aumentar la temperatura el efecto de exposición sería

mayor. Estas observaciones parecen coincidir con el planteamiento de un ensamblado molecular con un interior hidrófobo, en el cual se ubicarían estos residuos.

Finalmente, si comparamos los resultados de los CME contra la temperatura, observamos que en metanol siempre fueron alrededor de 2 nm más pequeños respecto a etanol. Sugiriendo que en las mezcla binarias metanol/agua una o más tirosinas pierden exposición respecto a las de etanol/agua. Si se mantuviera la misma exposición el efecto debería ser contrario debido a las constantes dieléctricas de las soluciones con el primer alcohol serían menores respecto a las del segundo, por lo que se favorecería el corrimiento al rojo¹¹⁵. Que suceda un desplazamiento al azul debe ser consecuencia de la orientación en alguna región hidrofóbica, probablemente dentro de una láminas- β , que en metanol tuvieron mayor presencia.

6.4.- Predicción del modelo 3D.

El modelo predicho presenta valores de C-Score y Tm-Score inferiores a los óptimos de 2 y 0.5, respectivamente. Esto sugiere que la confianza en la predicción es baja y la topología está en un intermedio de la correcta y una aleatoria⁹⁶.

Pese a estos primeros resultados el modelo predice muy bien una conformación extendida, bidimensional y muy rica en α -hélices^{81-82, 129,130}. Aunque no estima estructuras de hebra- β , principal diferencia respecto al resultado de DC discutidos en este trabajo. Algunos autores si han reportado zeína sin contenido de estructuras laminares^{24, 131-133}. La forma de esta predicción es similar a la del modelo de horquilla propuesto por Forato y colaboradores⁸², ya que tiene dos hebras unidas por un loop. Las mediciones de la longitud y de la sección transversal en el modelo fueron de 15.8 y 1-1.6 nm respectivamente, muy cercanos a los valores medidos por SAXS que van de los 12 a los 14 nm y de 1 a 4 nm, en todos los estudios reportados a la fecha^{81-83,133}. La predicción estimó 15 α -hélices en todo el arreglo, 6 más que las 9 sugeridas por Argos y colaboradores para una Z19²⁸, característica que se ha considerado en todos los modelos propuestos. La longitud de estas hélices va de 4 a 35 aminoácidos, con una longitud media ponderada de 10 residuos, la mitad de los 20 residuos promedio por hélice sugeridos en la literatura⁸¹⁻⁸³. Esto indica que las α -hélice de la predicción tienden a estar en segmentos más cortos que lo que la evidencia experimental sugiere, 11 de los 15 fragmentos tuvieron una longitud de 10 o menos aminoácidos.

El cálculo de área superficial expuesta a solvente (ASA), mostró que 5 de las 8 tirosinas tienen una exposición superior al 40%. Esta parece representar muy bien lo observado en fluorescencia, de 90 a 60% etanol, ya que por los desplazamientos al rojo tan cortos se sugirió que las tirosinas podrían tener un importante grado de exposición a solvente previo al calentamiento. Otra característica importante en la estructura es la presencia de caras hidrofóbicas expuestas al solvente, las cuales podrían modelar muy bien un posible proceso de oligomerización por interacciones hidrofóbicas de hélices en diferentes monómeros, e incluso corresponder a un posible mecanismo de formación de los oligómeros tipo micela descritos por Kim y Xiu¹⁰⁸ y discutidos en el apartado anterior.

Capítulo 7:

Conclusiones.

Con el método de purificación se logró disminuir el contenido de la Z22 en la solución, remover el pigmento y otras tres proteínas que por sus masas molares parecen corresponder a otro tipo de zeínas (δ , β y γ). La solución final presento como componentes principales dos Z19, con masas de 23.33 kDa y otra de 23.96 kDa, esta última con un incremento significativo en contenido durante las cromatografías.

Los estudios y su comparación con el diagrama de fases ternario, mostraron que en los porcentajes de alcohol/agua donde la zeína es menos soluble, la α -hélices o el hebras- β tienden a aumentar significativamente una respecto a la otra. En los porcentajes más bajos de alcohol (<40%), las hebras- β tienden a igualar el contenido de hélices o a predominar, presentando proporciones de α -h:h- β de hasta 1:2 en metanol 30%. Por otro lado en los más altos (>90%) se alcanzan valores >12:1. Los resultados también sugirieron que las proporciones α -h: h- β , en las condiciones de mayor solubilidad se encuentra entre 2:1 y 3:1.

Se considera que el agua favorece las transiciones α -hélices a hebra- β , debido a que induce un proceso de auto-ensamble, muy similar al reportado en la formación de fibrillas β -amiloide. Por otro lado el alcohol favorece las estructuras en α -hélice, gracias a que permite la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares y también la extensión de los residuos hidrofóbicos en el arreglo, debido a que pueden interactuar con las moléculas de estos solventes.

Los resultados de fluorescencia, sugieren que la proteína podría tener una conformación extendida en concentraciones de alcohol altas. Mientras que en contenidos de agua altos, se estarían formando zonas hidrofóbicas, ocultas de este solvente. La comparación de resultados entre alcoholes, mostró que el etanol tiende a favorecer más las estructuras en α -hélices respecto al metanol. Mientras que el segundo alcohol presentó CME en longitudes de onda ligeramente inferiores. Esto puede ser resultado de las diferencias entre la polaridad de uno y otro.

Los métodos de predicción de estructura tridimensional, como el utilizado en la plataforma I-TASSER, permitieron modelar algunas de las características observadas experimentalmente mediante técnicas fisicoquímicas, como son: la disposición extendida, contenido alto de estructuras secundarias de α -hélices y cierto grado de exposición de las tirosinas en la estructura.

Referencias.

- [1] Stryer, L., 1998. *Bioquímica*. 7th ed. Barcelona: Reverté, pp.25-98.
- [2] Lehninger, A. L., Nelson D. L. y Cox M. M. (2005) *Principios de Bioquímica*, cuarta edición, Ed. Omega, Barcelona, España.
- [3] Christopher K. Mathews, K. E. Van Holde, Dean R. Appling y Spencer J. Anthony-Cahill. (2013). *Bioquímica*. Cuarta edición, Ed. PEARSON EDUCACIÓN.
- [4] Voet, D., Voet, J. and Pratt, C., (2016). *Fundamentos de bioquímica*. 3rd ed. México, D.F.: Médica Panamericana.
- [5] Harper, H., Murray, R., Granner, D., Rodwell, V. and Pastrana R, V., (2007). *Bioquímica ilustrada [de] Harper*. 30th ed. México: Editorial El Manual Moderno.
- [6] Feduchi Canosa, E., (2021). *Bioquímica*. 30th ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- [7] Shewry, P. R., D'Ovidio, R., Lafandra, D., Jenkins, J. A., Mills, E. C., & Békés, F. (2009). *Wheat grain proteins. Wheat: chemistry and technology*, (Ed. 4), 223-298.
- [8] Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1999). The characteristics, structures and evolutionary relationships of prolamins. In *Seed Proteins* (pp. 11-33). Springer, Dordrecht.
- [9] Kreis, M., Forde, B. G., Rahman, S., Mifflin, B. J., & Shewry, P. R. (1985). *Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat*. *Journal of molecular biology*, 183(3), 499-502.
- [10] Shukla, R., & Cheryan, M. (2001). *Zein: the industrial protein from corn*. *Industrial crops and products*, 13(3), 171-192.
- [11] Esen, A. (1987). *A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (Zea mays L.)*. *Journal of Cereal Science*, 5(2), 117-128.
- [12] Coleman, C. E., & Larkins, B. A. (1999). *The prolamins of maize*. In *Seed proteins* (pp. 109-139). Springer, Dordrecht.
- [13] Duvick, D. N. (1961). *Protein granules of maize endosperm cells*. *Cereal Chem.* 38:374-385.
- [14] Evans, C. D., and Manley, R. H. (1941). *Solvents for zein—Primary solvents*. *Ind. Eng. Chem.* 33:1416-1417.
- [15] Pomes, A. F. (1971). *Zein*. In: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. H. F. Mark and N. G. Gaylord, eds. Wiley and Sons: New York.
- [16] Cabra, V., Arreguin, R., Galvez, A., Quirasco, M., Vazquez-duhalt, R. and Farres, A., (2005). *Characterization of a 19 kDa α -Zein of High Purity*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), pp.725-729.
- [17] Shukla, R. and Cheryan, M., (2001). *Zein: the industrial protein from corn*. *Industrial Crops and Products*, 13(3), pp.171-192.
- [18] B.R. Hamaker, A.A. Mohamed, J.E. Habben, C.P. Huang, B. Larkins (1995), *Anefficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method*, *CerealChem.* 72 583–588.
- [19] Wall, J. S., Fey, D. A., Paulis, J. W., & Landry, J. (1984). *Improved two-dimensional electrophoretic separation of zein proteins: application to study of zein inheritance in corn genotypes*.
- [20] Wilson, D. R., & Larkins, B. A. (1984). *Zein gene organization in maize and related grasses*. *Journal of molecular evolution*, 20(3-4), 330-340.

- [21] **Hartings, H., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Di Fonzo, N., Motto, M., Salamini, F., and Thompson, R.D.** (1989) The *oz* gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *BAIBO Journal* 8, 2795-801.
- [22] **Schmidt, R.J., Burr, F.A., Aukennan, M.J., and Burr, B.** (1990) Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. *Proceedings of the National Academy of the Sciences U.S.A.* 87,46-50.
- [23] **Selling, G. W., Hamaker, S. A., & Sessa, D. J.** (2007). Effect of solvent and temperature on secondary and tertiary structure of zein by circular dichroism. *Cereal chemistry*, 84(3), 265-270.
- [24] **Tatham, A. S., Field, J. M., Morris, V. J., I'Anson, K. J., Cardle, L., Dufton, M., & Shewry, P. R.** (1993). Solution conformational analysis of the alpha-zein proteins of maize. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26253-26259.
- [25] **Garratt, R., Oliva, G., Caracelli, I., Leite, A., & Arruda, P.** (1993). Studies of the zein-like α -prolamins based on an analysis of amino acid sequences: Implications for their evolution and three-dimensional structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 15(1), 88-99.
- [26] **Yin, H., Lu, T., Liu, L., & Lu, C.** (2015). Preparation, characterization and application of a novel biodegradable macromolecule: Carboxymethyl zein. *International journal of biological macromolecules*, 72, 480-486.
- [27] **Wang, J. F., Geil, P. H., Kolling, D. R., & Padua, G. W.** (2003). Analysis of zein by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(20), 5849-5854.
- [28] **Argos, P., Pedersen, K., Marks, M. D., & Larkins, B. A.** (1982). A structural model for maize zein proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 257(17), 9984-9990.
- [29] **Nover, L.**, (1994). *Plant Promoters and Transcription Factors*. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg, pp.209-226.
- [30] **Lending, C. R., & Larkins, B. A.** (1989). Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell*, 1(10), 1011-1023.
- [31] **Lawton, J. W.** (2002). Zein: A history of processing and use. *Cereal Chemistry*, 79(1), 1-18.
- [32] **Anderson, T. J., & Lamsal, B. P.** (2011). Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. *Cereal Chemistry*, 88(2), 159-173.
- [33] **Zhang, M., Reitmeier, C. A., Hammond, E. G., & Myers, D. J.** (1997). Production of textile fibers from zein and a soy Protein-Zein blend. *Cereal chemistry*, 74(5), 594-598.
- [34] **Selling, G. W., Maness, A., Bean, S., & Smith, B.** (2013). Impact of thiocyanate salts on physical, thermal, and rheological properties of zein films. *Cereal Chemistry*, 90(3), 204-210.
- [35] **Swallen, L. C.** (1939.) Zein filaments. U.S. patent 2,156,929.
- [36] **Coleman, R. E.** (1941.) Ink. US patent 2,236,521.
- [37] **Croston, C. B., Evans, C. D., & Smith, A. K.** (1945). Zein Fibers. *Industrial & engineering chemistry*, 37(12), 1194-1198.
- [38] **Yelland, W.** (1951). Production of zein fibers. US patent 2,552,079.
- [39] **Shukla, R., & Cheryan, M.** (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial crops and products*, 13(3), 171-192.

- [40] **Chen, Y., Ye, R., Li, X., & Wang, J.** (2013). Preparation and characterization of extruded thermoplastic zein–poly (propylene carbonate) film. *Industrial Crops and Products*, 49, 81-87.
- [41] **Hamdani, S. S., Li, Z., Sirinakbumrung, N., & Rabnawaz, M.** (2020). Zein and PVOH-Based Bilayer Approach for Plastic-Free, Repulpable and Biodegradable Oil-and Water-Resistant Paper as a Replacement for Single-Use Plastics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(40), 17856-17866.
- [42] **Kansal, D., Hamdani, S. S., Ping, R., & Rabnawaz, M.** (2020). Starch and Zein Biopolymers as a Sustainable Replacement for PFAS, Silicone Oil, and Plastic-Coated Paper. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(26), 12075-12084.
- [43] **Wang, Q., & Padua, G. W.** (2005). Properties of zein films coated with drying oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3444-3448.
- [44] **Vahedikia, N., Garavand, F., Tajeddin, B., Cacciotti, I., Jafari, S. M., Omid, T., & Zahedi, Z.** (2019). Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 25-32.
- [45] **Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., & Mahmoudian, A.** (2016). Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and monolaurin. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 37-43.
- [46] **Bilenler, T., Gokbulut, I., Sislioglu, K., & Karabulut, I.** (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), 392-398.
- [47] **Joye, I. J., Davidov-Pardo, G., Ludescher, R. D., & McClements, D. J.** (2015). Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. *Food chemistry*, 185, 261-267.
- [48] **Chen, S., Han, Y., Jian, L., Liao, W., Zhang, Y., & Gao, Y.** (2020). Fabrication, characterization, physicochemical stability of zein-chitosan nanocomplex for co-encapsulating curcumin and resveratrol. *Carbohydrate polymers*, 236, 116090.
- [49] **Chen, L., & Subirade, M.** (2009). Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. *Biomacromolecules*, 10(12), 3327-3334.
- [50] **Torres-Giner, S., Martinez-Abad, A., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M.** (2010). Stabilization of a nutraceutical omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrosprayed zein prolamine. *Journal of food science*, 75(6), N69-N79.
- [51] **Wang, Y., & Padua, G. W.** (2012). Nanoscale characterization of zein self-assembly. *Langmuir*, 28(5), 2429-2435.
- [52] **Santos, J., Alcaide-González, M. A., Trujillo-Cayado, L. A., Carrillo, F., & Alfaro-Rodríguez, M. C.** (2020). Development of food-grade Pickering emulsions stabilized by a biological macromolecule (xanthan gum) and zein. *International journal of biological macromolecules*, 153, 747-754.
- [53] **De Almeida, C. B., Catelam, K. T., Cornélio, M. L., & Lopes Filho, J. F.** (2010). Morphological and structural characteristics of zein biofilms with added xanthan gum. *Food Technology and Biotechnology*, 19-27.
- [54] **Shirmohammadli, F., Nikzad, M., Ghoreyshi, A. A., Mohammadi, M., & Poureini, F.** (2021). Preparation and Characterization of Zein/Sodium Caseinate/Xanthan Gum Complex for Encapsulation of Piperine and its In Vitro Release Study. *Food Biophysics*, 1-16.

- [55] **de Almeida, C. B., & Filho, J. F. L.** (2011, January). *Optical and Structural Properties of Zein-Xanthan Gum Biofilms*. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 299, No. 1, pp. 20-25). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- [56] **Vahedikia, N., Garavand, F., Tajeddin, B., Cacciotti, I., Jafari, S. M., Omid, T., & Zahedi, Z.** (2019). *Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 25-32.
- [57] **Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., & Mahmoudian, A.** (2016). *Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with Zataria multiflora Boiss. essential oil and monolaurin*. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 37-43.
- [58] **Zhang, F., Khan, M. A., Cheng, H., & Liang, L.** (2019). *Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability*. *Journal of Food Engineering*, 247, 9-18.
- [59] **Khan, M. A., Yue, C., Fang, Z., Hu, S., Cheng, H., Bakry, A. M., & Liang, L.** (2019). *Alginate/chitosan-coated zein nanoparticles for the delivery of resveratrol*. *Journal of Food Engineering*, 258, 45-53.
- [60] **Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B.** (2015). *Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods*. *Journal of functional foods*, 19, 868-881.
- [61] **Bilenler, T., Gokbulut, I., Sislioglu, K., & Karabulut, I.** (2015). *Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles*. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), 392-398.
- [62] **Zhang, F., Khan, M. A., Cheng, H., & Liang, L.** (2019). *Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability*. *Journal of Food Engineering*, 247, 9-18.
- [63] **Moomand, K., & Lim, L. T.** (2014). *Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres*. *Food research international*, 62, 523-532.
- [64] **Bilenler, T., Gokbulut, I., Sislioglu, K., & Karabulut, I.** (2015). *Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles*. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), 392-398.
- [65] **Tapia-Hernández, J. A., Rodríguez-Felix, F., Juárez-Onofre, J. E., Ruiz-Cruz, S., Robles-García, M. A., Borboa-Flores, J., ... & Del-Toro-Sánchez, C. L.** (2018). *Zein-polysaccharide nanoparticles as matrices for antioxidant compounds: A strategy for prevention of chronic degenerative diseases*. *Food Research International*, 111, 451-471.
- [66] **Hu, K., & McClements, D. J.** (2014). *Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method*. *Food Research International*, 64, 329-335.
- [67] **Yuan, Y., Li, H., Liu, C., Zhu, J., Xu, Y., Zhang, S., ... & Wang, D.** (2019). *Fabrication of stable zein nanoparticles by chondroitin sulfate deposition based on antisolvent precipitation method*. *International journal of biological macromolecules*, 139, 30-39.
- [68] **Hu, K., & McClements, D. J.** (2015). *Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles*. *Food Hydrocolloids*, 44, 101-108.

- [69] Wang, Y., & Padua, G. W. (2012). Nanoscale characterization of zein self-assembly. *Langmuir*, 28(5), 2429-2435.
- [70] Padua, G. W., & Guardiola, L. V. (2015). Microcapsules Produced from Zein. In *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* (pp. 3-20). Academic Press.
- [71] Yu, X., Afreen, S., Kong, Q., & Wang, J. (2020). Study on Self-Assembled Morphology and Structure Regulation of α -Zein in Ethanol–Water Mixtures. *Langmuir*, 36(40), 11975-11984.
- [72] Tavares, L. L., Almeida, C. B. D., Caruso, Í. P., Cornélio, M. L., & Lopes Filho, J. F. (2012). Effect of modified clays on the structure and functional properties of biofilms produced with zein. *Food Science and Technology*, 32(2), 314-322.
- [73] Cheng, C. J., & Jones, O. G. (2017). Stabilizing zein nanoparticle dispersions with ι -carrageenan. *Food Hydrocolloids*, 69, 28-35.
- [74] Dai, L., Sun, C., Wei, Y., Mao, L., & Gao, Y. (2018). Characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/gum arabic complex colloidal nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 74, 239-248.
- [75] Wang, L., & Zhang, Y. (2019). Heat-induced self-assembly of zein nanoparticles: Fabrication, stabilization and potential application as oral drug delivery. *Food Hydrocolloids*, 90, 403-412.
- [76] Selling, G. W., Lawton, J., Bean, S., Dunlap, C., Sessa, D. J., Willett, J. L., and Byars, J. (2005). Rheological studies utilizing various lots of zein in N,N-dimethylformamide solutions. *J. Agric. Food Chem.* 53:9050-9055.
- [77] Erickson, D. P., Ozturk, O. K., Selling, G., Chen, F., Campanella, O. H., & Hamaker, B. R. (2020). Corn zein undergoes conformational changes to higher β -sheet content during its self-assembly in an increasingly hydrophilic solvent. *International journal of biological macromolecules*, 157, 232-239.
- [78] Creighton, T. E. (1993). Pages 26-28 in: *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd Ed. W. H. Freeman and Company: New York.
- [79] Cabra, V., Arreguin, R., Vazquez-Duhalt, R., & Farres, A. (2006). Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(6), 1110-1118.
- [80] Altschul, A. M., Yatsu, L. Y., Ory, R. L., & Engleman, E. M. (1966). Seed proteins. *Annual Review of Plant Physiology*, 17(1), 113-136.
- [81] Matsushima, N., Danno, G., Takezawa, H. and Izumi, Y., (1997). Three-dimensional structure of maize α -zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1), pp.14-22.
- [82] Forato, L. A., Doriguetto, A. C., Fischer, H., Mascarenhas, Y. P., Craievich, A. F., & Colnago, L. A. (2004). Conformation of the Z19 prolamin by FTIR, NMR, and SAXS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(8), 2382-2385.
- [83] Momany, F., Sessa, D., Lawton, J., Selling, G., Hamaker, S. and Willett, J., (2006). Structural Characterization of α -Zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), pp.543-547.
- [84] Sun, C., Dai, L., He, X., Liu, F., Yuan, F., & Gao, Y. (2016). Effect of heat treatment on physical, structural, thermal and morphological characteristics of zein in ethanol-water solution. *Food Hydrocolloids*, 58, 11-19.
- [85] Mosse, J. (1961). Monographie sur une protéine du maïs: la zéine. *Ann. Physiol. Veg.* 3, 105-139.
- [86] Wang, Y., & Padua, G. W. (2010). Formation of zein microphases in ethanol– water. *Langmuir*, 26(15), 12897-12901.

- [87] **Cabra, V., Vázquez-Contreras, E., Moreno, A., & Arreguin-Espinosa, R.** (2008). The effect of sulfhydryl groups and disulphide linkage in the thermal aggregation of Z19 α -zein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(7-8), 1028-1036.
- [88] **Zhong, Q., & Jin, M.** (2009). Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2380-2387.
- [89] **Wu, Y., Luo, Y., & Wang, Q.** (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. *LWT-Food Science and Technology*, 48(2), 283-290.
- [90] **Luo, Y., Teng, Z., & Wang, Q.** (2012). Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(3), 836-843.
- [91] **Ciceri, P., Castelli, S., Lauria, M., Lazzari, B., Genga, A., Bernard, L., ... & Viotti, A.** (2000). Specific Combinations of Zein Genes and Genetic Backgrounds Influence the Transcription of the Heavy-Chain Zein Genes in Maizeopaque-2 Endosperms. *Plant physiology*, 124(1), 451-460.
- [92] **Chutipongtanate, S., Watcharatanyatip, K., Homvises, T., Jaturongkakul, K., & Thongboonkerd, V.** (2012). Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta*, 98, 123-129.
- [93] **Woody, R. W.** (1995). [4] Circular dichroism. *Methods in enzymology*, 246, 34-71.
- [94] **Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C.** (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119-139.
- [95] **J Yang, R Yan, A Roy, D Xu, J Poisson, Y Zhang** (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12: 7-8.
- [96] **Sun, Z., Liu, Q., Qu, G., Feng, Y., & Reetz, M. T.** (2019). Utility of B-factors in protein science: interpreting rigidity, flexibility, and internal motion and engineering thermostability. *Chemical reviews*, 119(3), 1626-1665.
- [97] **Wang, J. F., Geil, P. H., Kolling, D. R., & Padua, G. W.** (2003). Analysis of zein by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(20), 5849-5854.
- [98] **Woo, Y. M., Hu, D. W. N., Larkins, B. A., & Jung, R.** (2001). Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *The Plant Cell*, 13(10), 2297-2317.
- [99] **Wilson, C. M.** (1991). Multiple zeins from maize endosperms characterized by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Plant physiology*, 95(3), 777-786.
- [100] **Mutter, M., & Hersperger, R.** (1990). Peptides as conformational switch: Medium-induced conformational transitions of designed peptides. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(2), 185-187.
- [101] **Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T., & Zagorski, M. G.** (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid β -peptides of Alzheimer's disease: analysis of circular dichroism spectra. *Journal of molecular biology*, 225(4), 1075-1093.
- [102] **Thirumalai, D., Reddy, G., & Straub, J. E.** (2012). Role of water in protein aggregation and amyloid polymorphism. *Accounts of chemical research*, 45(1), 83-92.

- [103] **Bleholder, C., Dupuis, N. F., Wyttenbach, T., & Bowers, M. T.** (2011). Ion mobility–mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to β -sheet in amyloid fibril formation. *Nature chemistry*, 3(2), 172-177.
- [104] **Keller, A., & Grundmeier, G.** (2020). Amyloid aggregation at solid-liquid interfaces: Perspectives of studies using model surfaces. *Applied Surface Science*, 506, 144991.
- [105] **Hirota-Nakaoka, N., & Goto, Y.** (1999). Alcohol-induced denaturation of β -lactoglobulin: a close correlation to the alcohol-induced α -helix formation of melittin. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 7(1), 67-73.
- [106] **Hirota, N., Mizuno, K., & Goto, Y.** (1998). Group additive contributions to the alcohol-induced α -helix formation of melittin: implication for the mechanism of the alcohol effects on proteins. *Journal of molecular biology*, 275(2), 365-378.
- [107] **Shiraki, K., Nishikawa, K., & Goto, Y.** (1995). Trifluoroethanol-induced stabilization of the α -helical structure of β -lactoglobulin: implication for non-hierarchical protein folding. *Journal of molecular biology*, 245(2), 180-194.
- [108] **Kim, S., & Xu, J.** (2008). Aggregate formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol. *Journal of Cereal Science*, 47(1), 1-5.
- [109] **Uzun, S., Ilavsky, J., & Padua, G. W.** (2017). Characterization of zein assemblies by ultra-small-angle X-ray scattering. *Soft Matter*, 13(16), 3053-3060.
- [110] **Hirota, N., Goto, Y., & Mizuno, K.** (1997). Cooperative α -helix formation of β -lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein science*, 6(2), 416-421.
- [111] **Arnaudov, L. N., & de Vries, R.** (2005). Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophysical journal*, 88(1), 515-526.
- [112] **Shindo, Y., & Nakagawa, M.** (1985). Circular dichroism measurements. I. Calibration of a circular dichroism spectrometer. *Review of scientific instruments*, 56(1), 32-39.
- [113] **Swallen, L. C.** (1941). Zein. A new industrial protein. *Industrial & Engineering Chemistry*, 33(3), 394-398.
- [114] **Wheelwright, W. V., Easteal, A. J., Ray, S., & Nieuwoudt, M. K.** (2013). A one-step approach for esterification of zein with methanol. *Journal of applied polymer science*, 127(5), 3500-3505.
- [115] **Lakowicz, J. R.** (1983). Protein fluorescence. In *Principles of fluorescence spectroscopy* (pp. 341-381). Springer, Boston, MA.
- [116] **Szabo, A. G., & Rayner, D. M.** (1980). Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 102(2), 554-563.
- [117] **Sun, M., & Song, P. S.** (1977). Solvent effects on the fluorescent states of indole derivatives-dipole moments. *Photochemistry and Photobiology*, 25(1), 3-9.
- [118] **Andrews, L. J., & Forster, L. S.** (1974). Fluorescence characteristics of indoles in non-polar solvents: Lifetimes, quantum yields and polarization spectra. *Photochemistry and Photobiology*, 19(5), 353-360.
- [119] **Goldberg, J. M., Wissner, R. F., Klein, A. M., & Petersson, E. J.** (2012). Thioamide quenching of intrinsic protein fluorescence. *Chemical Communications*, 48(10), 1550-1552.
- [120] **Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidtner, K., Kroll, J., & Schweigert, F. J.** (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular nutrition & food research*, 50(8), 705-713.

- [121] **Lehrer, S. S., & Leavis, P. C.** (1978). *Solute quenching of protein fluorescence*. In *Methods in enzymology* (Vol. 49, pp. 222-236). Academic Press.
- [122] **Eftink, M. R., & Ghiron, C. A.** (1981). *Fluorescence quenching studies with proteins*. *Analytical biochemistry*, 114(2), 199-227.
- [123] **Naiki, H., & Gejyo, F.** (1999). [20] *Kinetic analysis of amyloid fibril formation*. *Methods in enzymology*, 309, 305-318.
- [124] **King, L., & Lehrer, S. S.** (1989). *Thermal unfolding of myosin rod and light meromyosin: circular dichroism and tryptophan fluorescence studies*. *Biochemistry*, 28(8), 3498-3502.
- [125] **Eftink, M. R.** (1994). *The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins*. *Biophysical journal*, 66(2), 482-501.
- [126] **Picó, G. A.** (1997). *Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin*. *International journal of biological macromolecules*, 20(1), 63-73.
- [127] **Busti, P., Gatti, C. A., & Delorenzi, N. J.** (2005). *Thermal unfolding of bovine β -lactoglobulin studied by UV spectroscopy and fluorescence quenching*. *Food research international*, 38(5), 543-550.
- [128] **M. Lai, P. H. Geil and G. W. Padua** (1999), *X-ray diffraction characterization of the structure of 340 zein–Oleic acid films*, *J. Appl. Polym. Sci.*, , 71, 1267-1281.
- [129] **Li, Y., Xia, Q., Shi, K., & Huang, Q.** (2011). *Scaling behaviors of α -zein in acetic acid solutions*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(32), 9695-9702.
- [131] **Kretschmer, C. B.** (1957). *Infrared spectroscopy and optical rotatory dispersion of zein, wheat gluten and gliadin*. *The Journal of Physical Chemistry*, 61(12), 1627-1631.
- [132] **Danzer, L. A., Ades, H., & Rees, E. D.** (1975). *The helical content of zein, a water insoluble protein, in non-aqueous solvents*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 386(1), 26-31.
- [133] **Wu, Y. V., Paulis, J. W., Sexson, K. R., & Wall, J. S.** (1983). *Conformation of corn zein and glutelin fractions with unusual amino acid sequence*.
- [134] **Whitmore, L., & Wallace, B. A.** (2008). *Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases*. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 89(5), 392-400.