

Caracterización de las proteínas de reserva y contenido mineral de semilla de melón (*Cucumis melo* L.)*

Characterization of storage proteins and mineral content melon seed (*Cucumis melo* L.)

Juan Gabriel Ramírez Pimentel, Alberto Herrera Herrera, César Leobardo Aguirre Mancilla, Jorge Covarrubias Prieto, Gabriel Iturriaga de la Fuente y Juan Carlos Raya Pérez[§]

Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Roque. Carretera Celaya-Juventino Rosas, km 8. C. P. 38110. Celaya, Guanajuato, México. (garamirez@itroque.edu.mx; alberhl@hotmail.com; cesar.aguirre.m@hotmail.com; jo_f_covarru-jrg@hotmail.com; gaiturriaga@itroque.edu.mx). [§]Autor para correspondencia: juancarlos.raya@gmail.com.

Resumen

La semilla de melón chino se ha usado de manera tradicional para elaborar horchata; sin embargo, se ha perdido la costumbre de consumirla. A fin de ampliar el conocimiento sobre este recurso vegetal se extrajeron las proteínas de reserva solubles de la semilla. El contenido total de proteína fue de 27.34% para el melón chino y de 24.9% para el melón verde (liso). Las globulinas constituyen la fracción mayoritaria y las prolaminas, la minoritaria. En el patrón electroforético, la fracción globulina muestra bandas abundantes y bien definidas. Las proteínas precipitadas con ácido clorhídrico o frío mostraron un patrón electroforético semejante en ambas variedades. Las proteínas se extrajeron mejor a valores de pH entre 5 y 12, pero no a valores de 2 a 4. El tratamiento con tripsina y quimotripsina mostró acumulación de bandas en el frente del gel, lo cual demuestra la presencia de péptidos digeridos. La actividad inhibitoria contra tripsina es mayor en la fracción albúminas con 741 UI mL⁻¹ y fracción globulina con 587 UI mL⁻¹. El contenido mineral fue de 0.5% para fósforo y de 0.28 para magnesio en melón chino; para el verde fue de 0.36% para potasio y de 0.28% para fósforo. El contenido de aceite fue de 35.8% en semilla de melón chino y de 23.2% en el verde, del cual se sabe que 67.5% son ácidos grasos insaturados; el aceite fue de color ámbar, de olor agradable. El uso de la semilla de melón es un recurso vegetal

Abstract

The chinese melon seed has been used traditionally to make horchata; however, it has lost the habit of consuming it. To expand the knowledge of this plant resource reservation soluble proteins were extracted from the seed. The total protein content was 27.34% for cantaloupe and 24.9% for honeydew (smooth). The globulins constitute the majority faction and prolamins, the minority. In the electrophoretic pattern shows globulin fraction abundant and well-defined bands. The precipitated proteins with hydrochloric acid or cold showed an electrophoretic pattern similar in both varieties. Proteins were extracted at pH values best between 5 and 12, but not values of 2 to 4. The treatment with trypsin and chymotrypsin showed accumulation of bands on the front of the gel, demonstrating the presence of digested peptides. The inhibitory activity against trypsin is greater at the albumins fraction with 741 UI mL⁻¹ and globulin fraction with 587 UI mL⁻¹. The mineral content was 0.5% for phosphorus and magnesium 0.28 for cantaloupe; for honeydew was 0.36% for potassium and 0.28% for phosphorus. The oil content was 35.8% in seed cantaloupe and 23.2% in the honeydew, which is known to 67.5% are unsaturated fatty acids; oil was amber color, pleasant odor. The use of melon seed is a plant resource to be promoted for its high content of protein and oil, as it

* Recibido: junio de 2016
Aceptado: agosto de 2016

que debe promoverse por su alto contenido de proteína y aceite, ya que es valioso para la alimentación humana. También puede usarse en la formulación de alimento para ganado o de larvas de insecto cultivadas en laboratorio.

Palabras clave: aceite, digestibilidad, proteína de reserva, recurso marginal.

Introducción

El melón (*Cucumis melo* L.) es un cultivo herbáceo anual, rastrero, de tallos gruesos y hojas pecioladas, perteneciente a la familia Cucurbitaceae. El melón es ampliamente cultivado por su fruto comestible y es una de las hortalizas de mayor importancia, tanto mundial como nacional, por su producción y área sembrada. En 2012 se produjeron 32 millones de toneladas en todo el mundo. El genoma del melón contiene presuntamente 27 427 genes que codifican para proteínas y se le propone como modelo para estudiar la maduración del fruto, determinación del sexo y fisiología del floema (García-Mas *et al.*, 2012).

La proteína que consume la humanidad proviene en su mayoría de los vegetales, siendo las leguminosas el grupo principal de estas, con la soya como el cultivo más importante, seguida del frijol. Los granos de las leguminosas comestibles son nutricionalmente importantes, como la principal fuente de proteínas (20 a 40% o más de la ingesta diaria) de bajo costo en la dieta de la población mexicana (Chagas and Santoro, 1997; Pérez *et al.*, 2002).

La familia de las leguminosas y en particular el caso de la soya, es un claro ejemplo de semillas ricas en proteína usada en la alimentación, y en el caso de la familia de las cucurbitáceas se puede tomar como ejemplo a la pepita o semilla de calabaza (*Cucurbita pepo*), ya que la semilla contiene 31% de proteínas, 36% de lípidos y 15% de hidratos de carbono, muy consumida en la República Mexicana, aunque desperdiciada en otros países (Martínez *et al.*, 2011). La semilla de melón, además de poseer cualidades medicinales (Ravishankar y Vishnu, 2012), es una fuente de proteínas (27%) y aceite (35%), lo que permitiría mejorar la alimentación y contribuir a rescatar las raíces culinarias (Leyva y Pérez, 2015).

is valuable for human consumption. It can also be used in the formulation of livestock feed or cultured insect larvae in the laboratory.

Keywords: digestibility, marginal resource, oil, protein reserve.

Introduction

The melon (*Cucumis melo* L.) is an annual herbaceous crop, creeping, thick stems and leaf petioles, belonging to the Cucurbitaceae family. The melon is widely cultivated for its edible fruit and vegetables is one of the most important, both global and national, for their production and planted area. In 2012 there were 32 million tons worldwide. The melon genome contains 27 427 genes allegedly encoding proteins and is proposed as a model for studying fruit ripening, sex determination and physiology of phloem (García-Mas *et al.*, 2012).

The protein consumed by mankind comes mostly from vegetables, legumes being the main group of these, with soy as the most important crop, followed by beans. The grains of edible legumes are nutritionally important, as the main source of protein (20 to 40% or more of the daily intake) low-cost diet of the Mexican population (Chagas and Santoro, 1997; Pérez *et al.*, 2002).

The legume family and in particular the case of soybeans, is a clear example of seeds rich in protein used in food, and in the case of the family cucurbitaceae can be taken as an example to the seed or pumpkin seed (*Cucurbita pepo*), as the seed contains 31% protein, 36% fat and 15% carbohydrates, widely consumed in Mexico, but wasted in other countries (Martínez *et al.*, 2011). The melon seed, besides having medicinal qualities (Ravishankar and Vishnu, 2012), is a source of protein (27%) and oil (35%), which would improve nutrition and help rescue the culinary roots (Leyva and Pérez, 2015).

Protein concentrates, such as phaseolins, have been added to meat products, biscuits and bread, successfully. The stability of the food emulsions is affected by the source of proteins, the extraction method, the pH and the addition of other compounds such as polysaccharides. A energy drinks for athletes are added branched chain amino acids (valine,

Concentrados de proteína, como las faseolinas, se han agregado a productos cárnicos, galletas y pan, con éxito. La estabilidad de las emulsiones de alimentos es afectada por el origen de las proteínas, su método de extracción, el pH y la adición de otros compuestos, como polisacáridos. A las bebidas energéticas para atletas se les añaden aminoácidos ramificados (valina, leucina, isoleucina) por el supuesto que estos disminuyen la síntesis de serotonina en el cerebro, neurotransmisor relacionado con la fatiga, y que la ingesta de aminoácidos ramificados podría retrasar el cansancio e incrementar el rendimiento deportivo. Las proteínas de melón aportan 167% de las necesidades diarias de ingesta de isoleucina, 113% de leucina, 51% de lisina, 37% de metionina y 169% de fenilalanina (Hu y Ao, 2007; Makri y Doxastakis, 2006).

Además, en las proteínas de la semilla de melón se han encontrado propiedades antifúngicas (Ferreira *et al.*, 2007). Un mejor conocimiento de las proteínas de reserva permite su utilización para aplicaciones novedosas, como la producción de vacunas (Maruyama *et al.*, 2014) o usos especiales, como dietas para prevenir o tratar enfermedades (Tandang *et al.*, 2011). Por ejemplo, en la ingesta de proteína, la relación lisina:arginina se recomienda sea menor a 2 ya que esto es importante para el control de la hiperlipidemia y arterioesclerosis (Martínez y Sánchez, 2004). La semilla de melón es un recurso usado en la alimentación humana de manera tradicional pero que ha caído en desuso por lo que consideramos que su estudio permitirá reconsiderarla como un recurso alimenticio y valioso por su composición.

Materiales y métodos

La semilla (aproximadamente 50 g) se molió finamente y se desgrasó con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1. La harina desgrasada se usó para la extracción de proteínas (Syros *et al.*, 2003). Las proteínas de reserva se extrajeron de manera secuencial, incubando 1 h cada vez, primero con agua destilada, para extraer albúminas; al término de la hora de incubación, con agitación, se centrifugó 25 min a 13 000 x g en la microfuga (marca Eppendorf) y se tomó el sobrenadante; al precipitado se le agregó cloruro de sodio 0.5 M en Tris 50 mM pH 8, para la extracción de globulinas, incubando una hora a temperatura ambiente con agitación, se centrifugó como se mencionó y se tomó el sobrenadante; a la pastilla se le agregó 2-propanol al 55% (v/v), se incubó una hora en agitación y se centrifugó nuevamente para extraer prolaminas, guardando el sobrenadante.

leucine, isoleucine) by the assumption that these decrease the synthesis of serotonin in the brain, a neurotransmitter associated with fatigue, and that intake of branched chain amino acids may delay fatigue and enhance athletic performance. Melon proteins provide 167% of daily intake needs isoleucine, 113% of leucine, 51% of lysine, 37% of methionine and 169% of phenylalanine (Hu and Ao, 2007; Makri and Doxastakis, 2006).

Furthermore, proteins melon seed antifungal properties found (Ferreira *et al.*, 2007). A better understanding of proteins reserve allows its use for new applications such as the production of vaccines (Maruyama *et al.*, 2014) or special uses, such as diet to prevent or treat diseases (Tandang *et al.*, 2011). For example, protein intake, lysine relationship: arginine is recommended to be less than 2 as this is important for the control of hyperlipidemia and arteriosclerosis (Martínez and Sánchez, 2004). The melon seed is a resource used in human food in a traditional way but has fallen into disuse and we believe that their study will allow food and reconsider as a valuable resource for its composition.

Materials and methods

The seed (approximately 50 g) was finely ground and degreased with a mixture of chloroform-methanol 2:1. The defatted was used for protein extraction (Syros *et al.*, 2003). Storage proteins were extracted sequentially incubating 1 h each time, first with distilled water to remove albumins; the end of the hour incubation with stirring, 25 min was centrifuged at 13 000 x g in microfuge (Eppendorf mark) and the supernatant was taken; the precipitate was added 0.5 M sodium chloride in 50 mM Tris pH 8, for extracting globulins, incubating one hour at room temperature with stirring, centrifuged as mentioned and the supernatant was taken; the pellet was added 2-propanol 55% (v/v), incubated one hour stirring and centrifuged again to remove prolaminas, saving the supernatant.

A tablet was added 0.1 M borate buffer with 0.5% SDS, pH 8; glutelins for extraction, was incubated one hour with stirring at room temperature (Syros *et al.*, 2008). For the separation of protein denaturing gels 10% they were employed with tricine buffer (Shagger and von Jagow, 1987). For protein extraction to different pH values (2, 4, 6, 7, 8, 10, 12); 1 g of defatted flour was weighed and added 5 mL of distilled water and brought to the appropriate pH by adding small amounts of NaOH or HCl (1N or 0.1 N),

A la pastilla se le agregó amortiguador de boratos 0.1 M con SDS 0.5%, pH 8; para la extracción de glutelinas, se incubó una hora con agitación a temperatura ambiente (Syros *et al.*, 2008). Para la separación de proteínas se emplearon geles desnaturalizantes al 10% con amortiguador de tricina (Shagger y von Jagow, 1987). Para la extracción de proteína a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 7, 8, 10, 12); se pesó 1 g de harina desgrasada y se agregaron 5 mL de agua destilada y se llevó al pH correspondiente agregando pequeñas cantidades de NaOH o HCl (1N ó 0.1 N), se completó el volumen a 10 mL, se incubó con agitación durante una hora y se centrifugó una hora a 14 000 x g en centrifuga (Wolfy Sathe 1998; Meng y Ma, 2002; Tavano y Neves, 2008). El contenido de humedad de la semilla se determinó pesando 20 granos e incubando a 80 °C durante 24 h (Raya *et al.*, 2014). Crioprecipitación: se pesó 0.1 g de harina desgrasada y se agregó 0.5 mL de agua, se agitó durante una hora y se centrifugó por 30 min a 15700 x g en la microfuga; se extrajo el sobrenadante.

Al residuo (pastilla) se le agregó nuevamente 1 mL de H₂O destilada y se extrajo por 12 h a 4 °C (toda la noche), al día siguiente se centrifugó nuevamente bajo las condiciones mencionadas, y se juntaron los sobrenadantes de ambas extracciones en un tubo de 1.5 mL y fueron llevados a refrigeración (4 °C) por 12 h y se centrifugó 45 min a 15 700 x g. Al sobrenadante se le agregó ácido clorhídrico para lograr una concentración de (HCl) al 0.025 M. Se refrigeró por una hora y se centrifugó 30 min a 15 700 x g a fin de obtener el precipitado de proteína (Montoya *et al.*, 2008). La proteína se cuantificó por triplicado mediante el método de Bradford (1976).

La cuantificación de minerales se llevó a cabo usando un microscopio electrónico de barrido, marca Jeol, acoplado a una sonda dispersiva de Rayos X en pastillas de la harina de semilla de melón. Se hicieron al menos tres análisis por muestra. Esta técnica de cuantificación da resultados equiparables a otras y ha sido utilizada para muestras biológicas (Liu *et al.*, 2007; Raya y Aguirre, 2009).

Digestibilidad *in vitro*: se tomaron muestras por triplicado de 100 µl del extracto de proteína y se colocaron por separado, ajustando con HCl a pH 2; se preincubaron 30 min a 39 °C en baño María y se le agregó 10 µl de la enzima pepsina (10 mg mL⁻¹) (pepsin from porcine gastric mucosa, Sigma); se tomó una alícuota de 25 µL y al resto se le agregó tripsina-quimotripsina (10mg/mL) (Trypsin type IXS from porcine pancreas, Sigma; chymotrypsinogen A type II from bovine pancreas, Sigma) y se incubó 120 min a 39 °C; tomando 20

the volume was completed to 10 mL, it was incubated with stirring for one hour and centrifuged one hour at 14 000 xg in centrifuge (Wolf and Sathe 1998; Meng and Ma, 2002; Tavano and Neves, 2008). The moisture content of the seed was determined by weighing 20 grains and incubating at 80 C for 24 h (Raya *et al.*, 2014). Cryoprecipitation: 0.1 g of defatted it weighed and added 0.5 mL of water, stirred for one hour and centrifuged for 30 min at 15 700 x g in microfuge; the supernatant was removed.

To the residue (tablet) was again added 1 mL of distilled H₂O and extracted for 12 h at 4 °C (overnight), the next day centrifuged again under the above conditions, and the supernatants of both extractions were pooled in a and 1.5 mL tube were taken to refrigeration (4 °C) for 12 h 45 min was centrifuged at 15 700 x g. The supernatant was hydrochloric acid added to achieve a concentration of (HCl) at 0.025 M. It was refrigerated for an hour and 30 minutes was centrifuged at 15 700 x g to obtain the protein precipitate (Montoya *et al.*, 2008). The protein was quantified in triplicate by the method Bradford (1976).

Mineral quantification was performed using a scanning electron microscope, Jeol mark coupled to a dispersive X-ray probe tablets of melon seed meal. At least three analyzes were made per sample. This quantification technique gives results comparable to others and has been used for biological samples (Liu *et al.*, 2007; Raya and Mancilla, 2009).

In vitro digestibility: samples were taken in triplicate 100 µl of protein extract and placed separately adjusted with HCl to pH 2; 30 min preincubated at 39 °C in a water bath and 10 µl was added pepsin enzyme (10 mg/mL) (from porcine gastric mucosa pepsin, Sigma); An aliquot of 25 µl was taken and the rest was added trypsin-chymotrypsin (10 mg mL⁻¹) (Trypsin type IXS from porcine pancreas, Sigma; chymotrypsinogen A type II from bovine pancreas, Sigma) and 120 min was incubated at 39 °C ; taking 20 µL of each of the aliquots obtained in vitro digestibility, samples were loaded on the gel. After the electrophoresis the gel was stained with Coomassie blue (Montoya *et al.*, 2008).

Oil extraction: The 1 g of flour was weighed; it was placed in a pre-weighed filter and this was put into a glass; was added hexane in a ratio of 4:1 volume/weight, the glass was covered to prevent the solvent to evaporate and allowed to incubate for 18 h. At the end of this time the vessel was taken to Soxhlet

μL de cada una de las alícuotas obtenidas en la digestibilidad *in vitro*, las muestras fueron cargadas en el gel. Al término de la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie (Montoya *et al.*, 2008).

Extracción de aceite: se pesó 1 g de harina; se colocó dentro de un filtro previamente pesado y este se puso dentro de un vaso; se le agregó hexano en una relación de 4:1 volumen/peso, se cubrió el vaso para evitar que se evaporara el solvente y se dejó incubar por 18 h. Al término de este tiempo el vaso fue llevado al Soxhlet marca Tecator modelo 1043; el vaso en el equipo se calentó por dos horas y se destiló por otras dos horas y se evaporó el solvente. Una vez extraído el aceite se pesó el vaso y el filtro y por diferencia, se obtuvo el rendimiento de aceite. Actividad inhibitoria contra enzimas tipo tripsina: se determinó midiendo el incremento de absorbencia a 253 nm en un lector espectrofotométrico VELAB modelo 722-2000 y utilizando como sustrato sintético el N- α -Benzoil-L-Arginina p-nitroanilida (BApNA) (Raya *et al.*, 2014).

Esta actividad está definida como el número de unidades de enzima inhibidas, y es calculada por la fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \text{Abs Enz} - \text{Abs Inh} / (0.01 \times V_i)$$

Donde: UI/mL = unidades de inhibición por mililitro; Abs Enz = absorbencia de la enzima; Abs Inh = absorbencia del inhibidor; V_i = volumen del inhibidor en mL.

Se usaron 60 μL de cada extracto proteico, se usó de control de enzima a la tripsina bovina (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y como sustrato se utilizó el N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BApNA).

Determinación de cenizas: se pesaron dos gramos de la muestra en un crisol previamente tarado y seco; el crisol y su contenido se calcinaron, primero sobre una llama baja, evitando en lo posible la formación excesiva de hollín, hasta que se carbonizó y luego se pasó a una mufla durante 4 h.

Resultados y discusión

El contenido de aceite para semilla de melón se reporta como de 35.36%, un contenido similar al hallado en este estudio para el melón chino, aunque el melón verde presentó un contenido menor (23.28%), pero importante, superior al de otras oleaginosas (Hu y Ao, 2007; Raya *et al.*, 2012).

Tecator brand model 1043; the glass on the team was heated for two hours and distilled for two hours and evaporated the solvent. Once extracted oil and filter glass and weighed by difference, the oil yield was obtained. inhibitory activity against trypsin enzymes: was determined by measuring the absorbance increase at 253 nm in a spectrophotometric reader 722-2000 VELAB model using as synthetic substrate and the N- α -Benzoil-L-Arginina p-nitroanilida (BApNA) (Raya *et al.*, 2014).

This activity is defined as the number of inhibited enzyme units, and is calculated by the formula:

$$\text{Inhibitory activity} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \text{Abs Enz} - \text{Abs Inh} / (0.01 \times V_i)$$

Where: IU/mL= milliliter inhibition units; Abs Enz= absorbance enzyme; Abs Inh= Absorbance inhibitor; V_i = volume in mL inhibitor.

The 60 μL of each protein extract were used, was used to control bovine enzyme trypsin (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and as substrate was used the N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BApNA).

Determination of ash: two grams of sample were weighed into a tared crucible and dry; the crucible and its contents were fired first on a low flame, avoiding possible excessive soot formation, until charred and then transferred to a muffle for 4 h.

Results and discussion

The oil content seed melon is reported as 35.36%, similar to that found in this study for the cantaloupe content, but the honeydew presented a lower content (23.28%), but important, than other oilseeds (Hu and Ao, 2007; Raya *et al.*, 2012). A cantaloupe can contain about 14 grams of seed per fruit on average; green or smooth can yield about 21 grams. The composition of the seed oil is a melon 53.9% of linoleic, 12.1% of oleic, 23.9% of palmitic and 5.7% of stearic. A 67.5% are unsaturated fatty acids (Hu and Ao, 2007). Comparatively, olive oil contains 71.9% of oleic (18:1) and 7.5% of linoleic (18:2) (Dubois *et al.*, 2007).

The total protein content, gave 27.34% for cantaloupe (Hu and Ao, 2007). For honeydew a value of 29.9% (Table 1), similar to that found in this study reported amount. The

Un melón chino puede contener unos 14 gramos de semilla por fruto, en promedio; el verde o liso puede rendir unos 21 gramos. La composición del aceite de la semilla de melón es de un 53.9% de linoleico, 12.1% de oleico, 23.9% de palmítico y 5.7% de esteárico. Un 67.5% son ácidos grasos insaturados (Hu y Ao, 2007). Comparativamente, el aceite de oliva contiene 71.9% de oleico (18:1) y 7.5% de linoléico (18:2) (Dubois *et al.*, 2007).

distribution of the protein fractions to the defatted (Table 2) shows that the fraction is greater presence globulin 37% while that found in lower content is the prolamine fraction with 6% compared to the protein. The seed chokecherry more water-soluble protein (albumin fraction) was extracted with other solvents, but also managed to extract a good deal with saline and borates. This is consistent with those reported by other authors, as dicots presented

Cuadro 1. Contenido de aceite, proteína, cenizas y humedad de la semilla de melón chino y melón verde.

Table 1. Content of oil, protein, ash and moisture seed cantaloupe and honeydew.

Material	Contenido (%)				
	Aceite	Proteína	Cenizas	Humedad	Carbohidratos
Semilla melón chino	35.89	27.34	3.43	9.32	24.03
Semilla melón liso	23.28	24.9	4.71	11	36.11

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia con el resto de los componentes.

El contenido de proteína total, dio 27.34% para melón chino (Hu y Ao, 2007). Para melón verde se reportó un valor de 29.9% (Cuadro 1), cantidad similar a la encontrada en este estudio. La distribución de las fracciones proteicas para la harina desgrasada (Cuadro 2) muestra que la fracción que se encuentra en mayor presencia es la globulina 37%, mientras que la que se encuentra en menor contenido es la fracción prolamina con 6%, respecto a la proteína. De la semilla de capulín se extrajo más proteína soluble en agua (fracción albumina) que con los otros solventes, aunque también se logró extraer una buena cantidad con solución salina y con boratos. Esto concuerda con lo reportado por otros autores, ya que las dicotiledóneas presentan como principales proteínas de reserva albúminas y globulinas. Otros autores han reportado diferencias en el contenido de proteína y en la abundancia relativa de las distintas fracciones, lo cual podría deberse a las variedades usadas o condiciones de cultivo (Mandal y Mandal, 2000; Tavano y Neves, 2008; Raya, *et al.*, 2012).

La distribución de las fracciones proteicas para la harina de melón verde (Cuadro 2) muestra que la fracción más abundante es la de globulinas con 38% mientras que la que se encuentra en menor cantidad es la fracción prolamina con un 4.7%.; en la fracción globulinas se obtuvo una concentración de 5.83 mg/mL. En frijol criollo, las albúminas constituyen un poco más de la mitad de la proteína soluble extraída (Raya *et al.*, 2014), aunque las leguminosas contienen cantidades altas de globulinas (Tavano y Neves, 2008).

as major proteins of albumins and globulins reservation. Other authors have reported differences in the protein content and the relative abundance of different fractions, which could be due to the varieties used or culture conditions (Mandal and Mandal, 2000; Tavano and Neves, 2008; Raya, *et al.*, 2012).

The distribution of the protein fractions to flour honeydew (Table 2) shows that the most abundant fraction is 38% globulin while found in lesser amount is the prolamine fraction with 4.7%; globulins fraction in a concentration of 5.83 mg/mL was obtained. In creole beans, albumins are a little more than half of the extracted soluble protein (Raya *et al.*, 2014), although legumes contain high amounts of globulins (Tavano and Neves, 2008).

Cuadro 2. Contenido de las fracciones proteicas (%) en harina de semilla de melón.

Table 2. Content of the protein fractions (%) in melon seed meal.

Fracción	Chino	Verde
Albumina	26.39	25.41
Globulina	37.07	38.82
Prolamina	5.74	4.71
Glutelina	30.79	31.06

The fraction most abundant protein honeydew is the globulin fraction is in the third lane (Figure 1A, B), followed by the glutelin fraction in the fifth lane and where one can see that

La fracción que más abunda en la proteína de melón chino es la fracción globulina que está en el tercer carril (Figura 1A,B), seguida de la fracción glutelina en el quinto carril y donde se puede apreciar que es de bajo peso molecular. En el segundo carril se encuentra la albumina la cual contiene proteínas de alto a bajo peso molecular, siendo más abundantes las de bajo peso molecular. La fracción menos abundante es la prolamina, con proteínas de bajo peso molecular (Figura 1).

En la Figura 1B se aprecia el patrón electroforético de proteínas de semilla de melón verde, muy semejante al del melón chino (1A). Esto indicaría que al menos en este nivel es poca la diversidad existente y que probablemente una variedad dio origen a la otra.

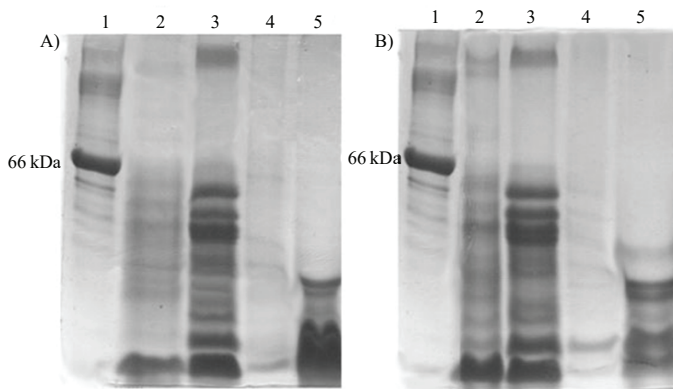


Figura 1. Patrón electroforético de las fracciones proteicas de la semilla de melón. A. Melón chino. Carril 1 marcadores de peso molecular (MPM); 2 fracción albumina; 3 fracción globulina; 4 fracción prolamina; y 5 fracción glutelina. B. melón verde. Carril 1 MPM; 2 fracción albumina; 3 fracción globulina; 4 fracción prolamina; y 5 fracción glutelina.

Figure 1. Electrophoretic pattern of protein fractions melon seed. A. Chinese melon. Lane 1 molecular weight markers (MPM); 2 albumin fraction; 3 globulin fraction; 4 prolamin fraction; and 5 glutelin fraction. B. green melon. Lane 1 MPM; 2 albumin fraction; 3 globulin fraction; 4 prolamin fraction; and 5 glutelin fraction.

En la Figura 2 se muestran proteínas solubles precipitadas de ambas variedades, donde nuevamente se observa un patrón muy semejante entre ambas variedades. En el verde se observan algunas bandas enriquecidas un poco por debajo de la altura del marcador de peso molecular (66 kDa, carril 1). Extracción de proteína de semilla de melón a diferentes pH's. De acuerdo a los datos obtenidos para la concentración de los extractos de proteína, el tratamiento que resultó en una mayor concentración fue la extracción con agua a pH 8, 6.29 mg mL⁻¹.

is low molecular weight. In the second lane is albumen which contains protein of high molecular weight low, being most abundant low molecular weight. The less abundant is the prolamin fraction with low molecular weight proteins (Figure 1).

In Figure 1B is appreciated electrophoretic seed protein pattern of honeydew, very similar to the cantaloupe (1A). This would indicate that at least at this level there is little diversity and a variety probably gave rise to the other.

In Figure 2 soluble proteins precipitated both varieties, where again a very similar pattern is observed between the two varieties shown. In some bands enriched green slightly below the height of the molecular weight marker (66 kDa, lane 1) are observed. Protein extraction melon seed pH's different. According to the data obtained for the concentration of protein extracts, treatment resulted in a higher concentration was water extraction at pH 8, 6.29 mg mL⁻¹.

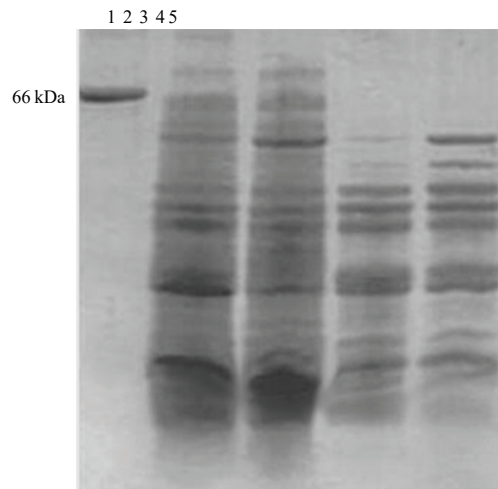


Figura 2. Patrones electroforéticos de proteína precipitada con ácido clorhídrico o con baja temperatura. Carril 1 MPM (66 kDa); carril 2 proteína de melón chino precipitada con ácido clorhídrico; carril 3, proteína de melón verde precipitada con ácido clorhídrico. Carril 4, proteína de melón chino crioprecipitada; carril 5, proteína de melón verde crioprecipitada.

Figure 2. Electrophoretic patterns of precipitated protein with hydrochloric acid or low temperature. Lane 1 MPM (66 kDa); lane 2 cantaloupe protein precipitated with hydrochloric acid; lane 3, protein precipitated with hydrochloric acid honeydew. Lane 4, cantaloupe cryoprecipitated protein; lane 5, protein cryoprecipitated honeydew.

La alta solubilidad de la proteína se debe a la baja hidrofobicidad de su superficie; su alta solubilidad a pH neutro y ácido posibilita su uso en bebidas y alimentos líquidos (Meng y Ma, 2002). La proteína de semilla de capulín es insoluble a pH muy ácido, (Raya *et al.*, 2012), La proteína de frijol rojo ("red bean") tiene un mínimo de solubilidad a pH 5; algo similar a lo observado con la de melón, que es poco soluble a pH 4 (carril 4, Figura 3), (Chagas y Santoro, 1997). La proteína de *Cicer arietinum* tiene un mínimo de solubilidad entre pH 4.5 a 6 y es prácticamente insoluble a pH 5 (Tavano y Neves, 2008).

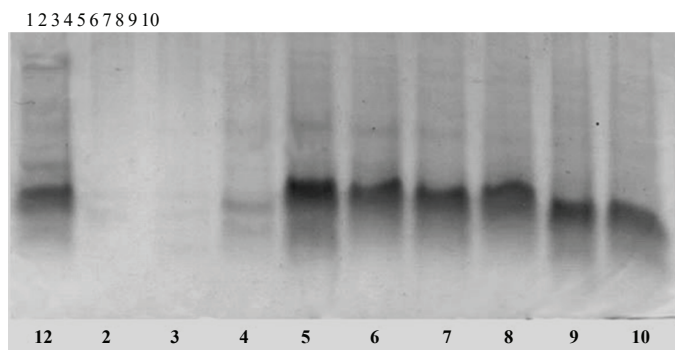


Figura 3. Extracción de proteína a diferentes valores de pH. La extracción de proteína a pH 8 parece ser la mejor; a pH ácido, 2,3 y 4 casi no se extrae proteína, seguramente por la baja solubilidad a estos pH. La mayor cantidad se extrajo a valores de pH básicos o ligeramente ácidos (pH5.6).

Figure 3. Removing protein at different pH values. Protein extraction at pH 8 seems to be the best; at acidic pH, 2.3 and 4 hardly extracted protein, probably due to the low solubility of these pH. Most values are extracted basic or slightly acidic pH (pH5.6).

En la Figura 4 se muestra la digestión de proteína extraída de semilla y tratada con enzimas digestivas; las observaciones indican que es una proteína de fácil digestión. Esto daría pie para su utilización en dietas especiales donde se requiere proteína con estas características. Por ejemplo, alimento para bebés, deportistas (Ardura *et al.*, 2000).

El extracto que presentó mayor actividad inhibitoria contra proteasas fue el extracto proteico obtenido con agua, el cual corresponde a la fracción albúminas; los extractos correspondientes a globulinas y prolaminas tienen una actividad similar entre ellos (Figura 5), el extracto de globulinas con el agente reductor ditioneitol (DTT) muestra una gran disminución de la actividad enzimática y en el extracto de glutelinas tiene poca actividad inhibitoria. En la semilla de capulín y en la de *C. arietinum*, la fracción de

The high protein solubility is due to the low hydrophobicity of the surface; high solubility at neutral pH and acid enables use in beverages and liquid food (Meng and Ma, 2002). The chokecherry seed protein is insoluble to very acidic pH (Raya *et al.*, 2012), red bean protein ("red bean") has a minimum solubility at pH 5; something similar to what was observed with melon, which is poorly soluble at pH 4 (lane 4, Figure 3), (Chagas and Santoro, 1997). The cicer arietinum protein has a minimum solubility between pH 4.5 to 6 and practically insoluble at pH 5 (Tavano and Neves, 2008).

In Figure 4 the digestion of protein extracted from seed and treated with digestive enzymes shown; observations indicate that a protein is easily digested. This would lead for use on special diets where protein is required with these characteristics. For example, baby food, sports (Ardura *et al.*, 2000).

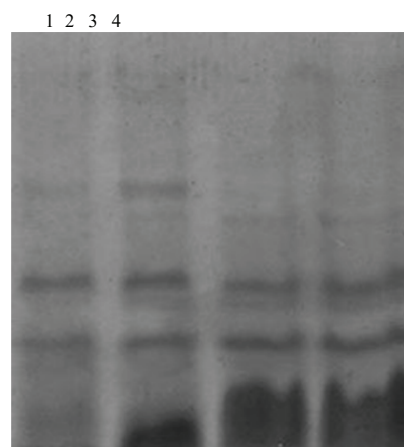


Figura 4. Proteínas solubles de melón tratadas con enzimas digestivas. Se muestran en el carril 1 proteína digerida solo con pepsina. En el carril 2, proteína digerida con pepsina y quimotripsina. En los carriles 3 y 4 se observan los péptidos al fondo del gel en los tratamientos con pepsina, tripsina y quimotripsina.

Figure 4. Soluble proteins melon treated with digestive enzymes. Shown in lane 1 single with pepsin digested protein. In lane 2, protein and chymotrypsin pepsin digested. In lanes 3 and 4 the peptides are observed in the bottom of the gel treatments with pepsin, trypsin and chymotrypsin.

The extract showed higher inhibitory activity against protease protein extract was obtained with water, which corresponds to the albumin fraction; extracts corresponding to globulins and prolamins have similar activity between them (Figure 5), globulins extract with reducing agent dithiothreitol (DTT) shows a large decrease in enzyme activity and glutelin extract has little inhibitory activity. In

albúminas presenta la actividad más alta, seguida de las glutelinas (Tavano y Neves, 2008; Raya *et al.*, 2012). No obstante, observaciones en el laboratorio indican que estas semillas son fácilmente colonizadas y consumidas por plagas de almacén, su alto contenido proteico y lipídico sin duda permite proponerlas como ingrediente para dietas para este tipo de organismos, algo que valdría la pena explorar (Wang *et al.*, 2014).

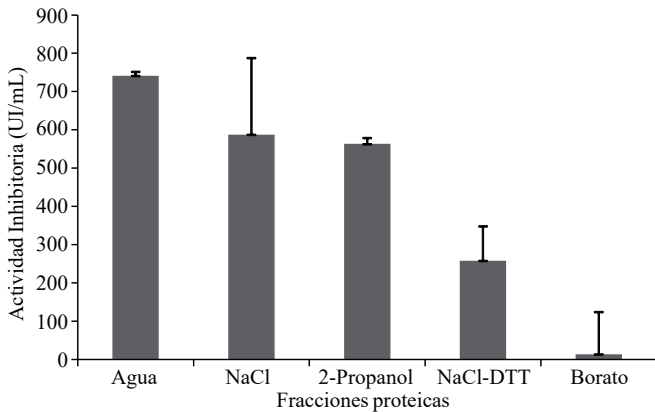


Figura 5. Actividad inhibitoria de extractos proteicos de la semilla de melón.

Figure 5. Inhibitory activity of protein extracts from the seed of melon.

La semilla de melón chino contiene gran cantidad de fósforo (P) en relación a los otros elementos que contiene, seguido de magnesio (Mg) (Figura 6), por lo cual se puede considerar a esta semilla como alimento con buen aporte de fósforo y magnesio. En comparación con la semilla de melón verde, la de melón chino contiene silicio (Si) y cloro (Cl) (Figura 7).

La semilla de melón verde es rica en potasio (K), seguido por fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S); la de melón contiene entre un 0.3% y 0.5% de fósforo (Figura 7), un contenido algo más bajo que lo reportado para la semilla de *Nicotiana glauca* (Hocking, 1980). Ambas variedades presentaron un contenido de potasio, entre 0.2 y 0.35%; para semillas de *Nicotiana* reportaron 1030 mg/100 g y para capulín 700 mg/100 g. El azufre se aproxima a lo reportado para *Nicotiana* (190 mg/100 g), lo mismo que el magnesio 350 mg/100 g; para semilla de capulín se hallaron 120 mg/100 g (Hocking, 1980; Raya *et al.*, 2012).

En la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*) el contenido de molibdeno (Mo) difiere por un orden de magnitud entre suelos ricos y pobres en este elemento; la cantidad de minerales presente en la semilla es, en algunos casos, lo

chokecherry seed and that of *C. arietinum*, albumin fraction has the highest activity, followed by the glutelin (Tavano and Neves, 2008; Raya *et al.*, 2012). However, observations in the laboratory indicate that these seeds are easily colonized and consumed by storage pests, its high protein and lipid certainly content can propose them as an ingredient for diets for such organisms, something that would be worth exploring (Wang *et al.*, 2014).

The seed cantaloupe contains large amount of phosphorus (P) in relation to the other elements containing followed magnesium (Mg) (Figure 6), so can be considered to seed as a food with good supply of phosphorus and magnesium. Compared to seed honeydew, cantaloupe contains that of silicon (Si) and chlorine (Cl) (Figure 7).

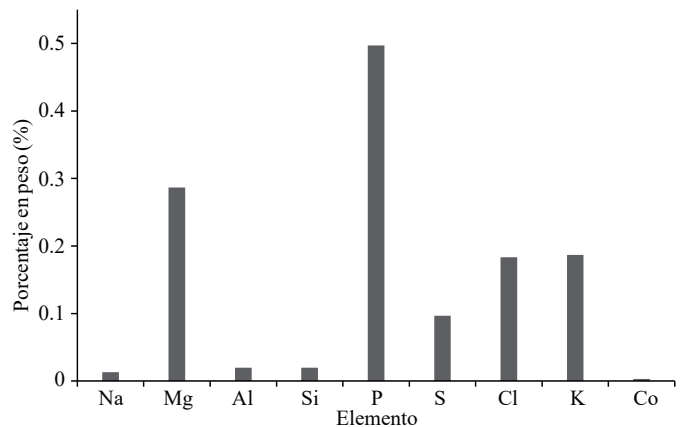


Figura 6. Contenido elemental de la semilla de melón chino.

Figure 6. Elemental content seed cantaloupe.

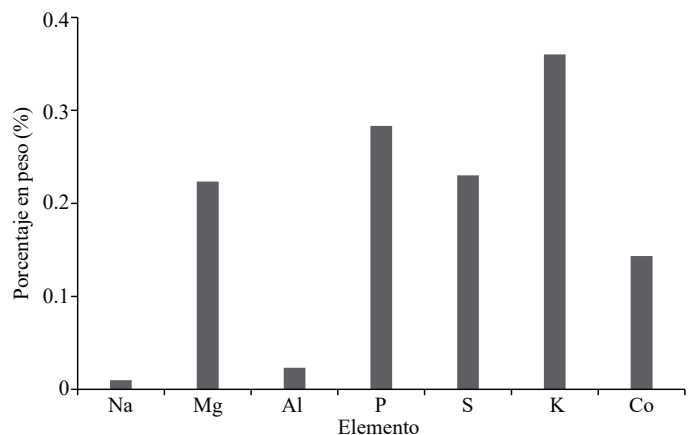


Figura 7. Contenido elemental de la semilla de melón verde.

Figure 7. Elemental content of honeydew seed.

The honeydew melon seed is rich in potassium (K), followed by phosphorus (P), magnesium (Mg) and sulfur (S); the melon contains between 0.3% and 0.5% phosphorus (Figure 7), a content somewhat lower than reported for seed

que tendrá a disposición la planta para su desarrollo (Tyler y Zohlen, 1998). En el grano de sorgo (*Sorghum halepense*), las concentraciones de fósforo (P), potasio (K), y magnesio (Mg) decrecen significativamente cuando disminuye la suplementación de estos elementos (Tyler y Zohlen, 1998). El contenido de cobalto (Co) y el de azufre es mayor que en la semilla de melón chino. El Co es requerido para la fijación biológica de nitrógeno, pero la absorción en melón podría deberse simplemente a que está presente en el suelo; el cobalto presente en la semilla puede prevenir la clorosis de la futura planta (Tyler y Zohlen, 1998). Hay un gran componente hereditario en cuanto a la acumulación de elementos minerales por parte de las plantas (Hodson *et al.*, 2005). El Instituto Nacional de la Nutrición, en México, recomienda una ingesta diaria, para adultos, 350 mg de Mg, fosfatos 800 mg y potasio 900-2 700 mg diarios.

La semilla de melón es una fuente adecuada de potasio, fósforo (fosfatos) y magnesio, e incluso de azufre tratándose de la semilla de melón verde o liso. Las proteínas se han extraído de manera secuencial, usando agua, solución salina, alcohol (2-propanol) y álcali (buffer de boratos pH 9.5), lo cual nos ha permitido averiguar que se extrae más y mejor proteína con solución salina. Por otra parte, el aceite que se extrae es de color ámbar y de olor agradable. Se midió la actividad inhibitoria contra tripsina y resultó prácticamente nula, lo cual indica que esta proteína se puede consumir en crudo sin preocuparse por este aspecto. La medición de actividad inhibitoria se realizó mediante un método espectrofotométrico y usando un substrato sintético. El contenido mineral de la semilla es semejante al de otras (frijol, maíz, capulín) aunque destaca la presencia de molibdeno.

También se extrajo proteína a diferentes pH, lo cual nos permite conocer que no se disuelve bien en solución ácida, pero si se logra disolver en pH neutro o alcalino. Esto posibilitaría su uso en alimentos con esta característica. La semilla de melón contiene 35% de aceite, lo cual la hace susceptible de aprovecharse para la extracción de este, sea para uso humano o para biodiesel (Dubois *et al.*, 2007). Esto podría ser especialmente indicado, el uso humano, en las zonas donde la ingesta calórica es deficiente; es decir, zonas marginadas y rurales (Leyva y Pérez, 2015). De colectarse y usarse la semilla de melón podría sin duda equipararse a la de calabaza en cuanto a volumen manejado. Existen en el mercado harinas para

Nicotiana glauca (Hocking, 1980). Both varieties showed a potassium content between 0.2 and 0.35%; *Nicotiana* seed reported 1 030 mg/100 g and chokecherry 700 mg/100 g. The sulfur approaches that reported for *Nicotiana* (190 mg/100 g), the same as the magnesium 350 mg/100 g; for seed chokecherry 120 mg/100 g were found (Hocking, 1980; Raya *et al.*, 2012).

In the seed of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) the content of molybdenum (Mo) differs by an order of magnitude between rich and poor soils in this element; the amount of minerals present in the seed is, in some cases, which will make available for plant development (Tyler and Zohlen, 1998). In grain sorghum (*Sorghum halepense*), concentrations of phosphorus (P), potassium (K) and magnesium (Mg) decreases significantly decrease when supplementation of these elements (Tyler and Zohlen, 1998). The content of cobalt (Co) and the sulfur is greater than in the seed of cantaloupe. The Co is required for biological nitrogen fixation, but absorption in melon could simply be that present in the soil; the cobalt present in the seed can prevent chlorosis of the future plant (Tyler and Zohlen, 1998). There is a large genetic component as to the accumulation of mineral elements by plants (Hodson *et al.*, 2005). The National Institute of Nutrition in Mexico, recommends a daily intake for adults, 350 mg of Mg, phosphate 800 mg and potassium 900-2 of 700 mg daily.

The melon seed is a suitable source of potassium, phosphorus (phosphate) and magnesium, sulfur and even in the case of seed honeydew or smooth. The proteins were extracted sequentially, using water, saline, alcohol (2-propanol) and alkali (pH 9.5 borate buffer), which has allowed us to determine that more and better protein extracted with saline. Moreover, the oil extracted is amber and pleasant smell. The inhibitory activity against trypsin was measured and virtually zero, indicating that this protein can be eaten raw without worrying about this. Measuring inhibitory activity was performed by a spectrophotometric method using a synthetic substrate and. The mineral content of the seed is similar to other (beans, corn, chokecherry) but highlights the presence of molybdenum.

The protein is also extracted at different pH, which allows us to know that does not dissolve well in acidic solution, but if it can dissolve in neutral pH or alkaline. This would

preparar agua de horchata, que al parecer contienen harina de arroz y gran cantidad de azúcar; resultaría más sana y nutritiva sin duda una harina a base de semilla de melón; se probó a combinarla con harina de amaranto a fin de mejorar su composición aminoacídica, logrando buena aceptación entre los probadores. Esta fue calificada como muy buena en cuanto a sabor, acidez y apariencia.

Conclusiones

El perfil electroforético de las fracciones proteicas de los materiales empleados así como el perfil electroforético de la proteína crioprecipitada de los materiales empleados presentaron el mismo tipo de proteínas. La crioprecipitación de las proteínas permitió obtener bandas bien definidas, lo que permite proponer la técnica como un método de fraccionamiento. El melón chino y verde tienen una cantidad muy similar de proteína; a pH 2,3,4 no se extrajo proteína. La proteína de semilla de melón podría integrarse a la dieta, ya sea como extracto proteico o consumiendo las semillas, ya que aparentemente, es de fácil digestión por no ser rica en inhibidores de proteasas. El contenido de aceite fue mayor en el melón chino que en el verde; esto hace factible su uso para fines alimenticios o incluso para la obtención de biodiesel. La semilla de melón es una fuente adecuada de minerales, en especial, potasio, fósforo (fosfatos) y magnesio.

Literatura citada

- Ardura, F. J.; de Hoyos, L. C.; de Llano, J. M. A.; Aldana, G. J. y Revilla, R. M. A. 2000. Actimetría y cronobiología en el cólico infantil. Efecto de dos dietas especiales. *Boletín Pediatría* 40:8-18.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72:248-252.
- Chagas, E. P. and Santoro, I. G. Y. 1997. Globulin and albumin protein in dehulled seeds of three *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition* 51:17-26.
- Dubois V.; Breton, M. S.; Linder, F. J. and Parmentier, M. 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:710-732.
- Ferreira, S. F. F.; Oliveira, M. A.; Fernandes, K. V. S.; Carvalho, A. O.; Perales, J. and Gomes, V. M. 2007. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. *Scientia Hort.* 111:399-405.

allow use in foods with this feature. The melon seed contains 35% oil, which makes it susceptible to profit for the extraction of this, either for human use or biodiesel (Dubois *et al.*, 2007). This could be particularly suitable, human use in areas where caloric intake is deficient; i.e. marginalized and rural areas (Leyva and Pérez, 2015). To be collected and used melon seed could certainly be equated with pumpkin in terms of volume handled. They exist in the flour to prepare horchata market, which apparently contain rice flour and lots of sugar; it is more healthy and nutritious definitely a flour-based melon seed; She was tested to combine it with amaranth flour to improve its amino acid composition, achieving good acceptance among testers. This was rated as very good in flavor, acidity and appearance.

Conclusions

The electrophoretic profile of the protein fractions of the materials used as well as the electrophoretic profile of cryoprecipitated protein materials used similar types of proteins. The cryoprecipitation of proteins yielded well-defined bands, enabling proposed technique as a method of fractionation. The cantaloupe and honeydew have a similar amount of protein; 2,3,4 pH not extracted protein. The melon seed protein to the diet could be integrated either as a protein extract or consuming the seeds, as apparently, it is easily digestible for not being rich in protease inhibitors. The oil content was higher in the cantaloupe than in the honeydew; this makes possible its use for food purposes or even for obtaining biodiesel. The melon seed is a suitable source of minerals, especially potassium, phosphorus (phosphate) and magnesium.

End of the English version



- García-Mas, J.; Benjak, A.; Sanseverino, W.; Bourgeois, M.; Mir, G.; González, V.M.; Hénaff, E.; Câmara, F.; Cozzuto, L.; Lowy, E.; Alioto, T.; Capella-Gutiérrez, J.; Blanca, J.; Cañizares, J.; Ziarso, P.; Gonzalez-Ibeas, D.; Rodríguez-Moreno, L.; Droege, M.; Du, L.; Alvarez-Tejado, M.; Lorente-Galdos, B.; Melé, M.; Yang, L.; Weng, Y.; Navarro, A.; Marques-Bonet, T.; Aranda, M.A.; Nuez, F.; Picó, B.; Gabaldón, T.; Roma, G.; Guigó, R.; Casacuberta, J.M.; Arús, P. and Puigdomènech, P. 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings Natural Academic Science.* 109:11872-11877.

- Hocking, P.J. 1980. The composition of phloem exudate and xylem sap from tree tobacco (*Nicotiana glauca* Grah). *Annals Bot.* 45:633-643.
- Hodson, M. J.; White, P. J.; Mead, A. and Broadley, M. R. 2005. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals Bot.* 96:1027-1046.
- Hu, M.H. and Ao, Y. 2007. Characteristics of some nutritional composition of melon (*Cucumis melo* hybrid 'Chunli') seeds. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 42:1397-1401.
- Leyva, T. D. A. y Pérez, V. A. 2015. Pérdida de las raíces culinarias por la transformación en la cultura alimentaria. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6:867-889.
- Liu, D.; Kottke, I. and Adam, D. 2007. Localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by energy dispersive X-ray analysis. *Biologia Plantarum.* 51:363-366.
- Majkowska, G. J. 2009. Mineral content of melon fruit (*Cucumis melo* L.). *J. Elemental.* 14:717-727.
- Makri E. A. and Doxastakis, G. I. 2006. Study of emulsions stabilized with *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus* with addition of Arabic gum, locust bean gum, and xanthan gum. *Food Hydrocolloids.* 20:1141-1152.
- Mandal, R. K. and Mandal, S. 2000. Seed storage protein and approaches improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Current Sci.* 79: 576-589.
- Martínez, A. Y. O.; Martínez, Y. J.; Córdova, L. M.; Valdivié, N. y Estarrón, E. M. 2011. Fitoesteroles y escualeno como hipocolesterolémicos en cinco variedades de semillas de Cucurbita máxima y Cucurbita moschata (calabaza). *Rev. Cubana Plantas Medicinales.* 16:72-81.
- Martínez, A. O. y Sánchez, de M. F. 2004. Arginina, óxido nítrico y función endotelial. *Ars Pharm* 45:303-317.
- Maruyama, N.; Fujiwara, K. K.; Yokoyama, C. C.; Hasegawa, K. H.; Takagi, K.; Nishizawa, Y.; Uki, T.; Kawarabayashi, M.; Shouji, M.; Ishimoto, P. and Terakawa, T. 2014. Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds. *J. Bios. Bioeng.* 118: 441-447.
- Montoya, C. A.; Leterme P.; Victoria, N. F.; Toro O.; Souffrant W.B.; Beebe, S. and Lailles, J. P. 2008. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 56:2183-2191.
- Pérez, H. P.; Esquivel, E. G.; Rosales, S. R. y Acosta, G. J. A. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Arch. Latinoam. Nutric.* 52:172-180.
- Ravishankar K. and Vishnu, P. P. S. 2012. In vitro antioxidant activity of ethanolic seed extracts of *Macrotyloma uniflorum* and *Cucumis melo* for therapeutic potential. *Int. J. Res. Pharmacy Chem.* 2:2231-2781.
- Raya, P.J.C.; Aguirre, M. C. L.; Tapia, A. R.; Ramírez, P. J. C. y Covarrubias, P. J. 2012. Composición elemental y caracterización de las proteínas de reserva de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). *Polibotanica* 34:203-215.
- Raya, P. J. C.; Gutiérrez, B. G. M.; Ramírez, P. J. G.; Covarrubias, P. J. y Aguirre, M. C. L. 2014. Caracterización de proteínas y contenido mineral de dos variedades nativas de frijol de México. *Agron. Mesoam.* 25:1-11
- Raya, P. J. C. y Aguirre, M. C. L. 2009. Composición elemental de algunas especies de plantas silvestres mexicanas. *Rev. Chapingo Ser. Cienc. Forest. Amb.* 15:95-99.
- Ribeiro, S. F. F.; Agizzio, A. P.; Machado, O. L. T.; Neves, F.; Oliveira, M. A. A. G. C.; Fernández, K. V. S.; Carvalho, A. O.; Perales, J. and Gomes, V. M. 2007. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. *Scientia Hort.* 111:399-405.
- Schägger H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Shewry, P. R. 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J. Cereal Sci.* 46:239-250.
- Shewry, P. R. and Halford, N. G. 2001. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 53: 947-958.
- Shewry, P. R.; Napier, J. A. and Tatham, A. S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell.* 7:945-956.
- Syros, T.; Yupsanis, T. and Economou, A. 2003. Fractionation and electrophoretic patterns of storage protein of *Ebanus creatica*. A preliminary survey as a tool in taxonomy. *Biologia Plantarum.* 46:435-443.
- Tandang, S.; Tecson, M. R. G.; Mikami, M. E. M; Utsumi, B. and Maruyama, N. S 2011. Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties. *Ann. Review Food Sci. Technol.* 2:59-73.
- Tavano O. L. and Neves, V. A. 2008. Isolation, solubility and *in vitro* hydrolysis of chickpea vicilin-like protein. *LWT* 41:1244-1251.
- Tyler, G. and Zohlen, A. 1998. Plant seeds as mineral nutrient resource for seedlings-A comparison of plants from calcareous and silicate soils. *Ann. Bot.* 81:455-459.
- Wang, Y. Ch.; Zhang. S. K. and Ren, J. S. 2014. Effects of dietary additives in artificial diets on survival and larval development of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: crambidae). *Florida Entomologist.* 97:1041-1045.