



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAESTRÍA INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA γ -KAFIRINA EN VARIEDADES DE
SORGO BLANCO (*Sorghum bicolor*)**

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA:

IBQ. ELIZABETH CHIQUITO ALMANZA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN LA OPCIÓN DE BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

ASESORA

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

COASESOR

DR. JOSÉ LUIS ANAYA LÓPEZ

Morelia, Michoacán, México

Agosto, 2011

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y la codirección del Dr. José Luis Anaya López. Para su realización se contó con el apoyo del Fondo de Ciencia Básica SEP-CONACyT con número de convenio 82320, y con la beca 226668 otorgada por el CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a las siguientes personas: Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, Dr. José Luis Anaya López y Dr. Joel Edmundo López Meza, por su asesoría en la realización de este proyecto, pero sobre todo por su amistad y apoyo.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, y al Dr. Horacio Cano Camacho por sus comentarios y sugerencias en la realización del proyecto.

A mis compañeros y amigos del CMEB: Letty, Heber, Huante, Naye, Luigüi, Indhy, Ma. Elena, Daisy, Susy, y Jaquelina por brindarme su amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

Muchas gracias!!!

DEDICATORIA

Papá, mamá siempre han estado conmigo...

Soy parte de sus esfuerzos y sueños, me han sabido guiar e instruir por el buen camino. Esto es solo una pequeña recompensa de ello...

A mis hermanos, Pablo, Marcelino, Obed y Ruth, que han sido parte de mi fortaleza, y fuente de inspiración para seguir adelante...

Muchas gracias!!!

ÍNDICE

	Página
Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	iv
Índice de abreviaturas	v
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	4
3.1 Características generales del sorgo	4
3.2 Estructura del grano de sorgo	5
3.3 Composición química del grano de sorgo	6
3.4 Importancia en la alimentación animal	7
3.4.1 Enzimas que participan en la digestión en animales monogástricos	8
3.4.2 Evaluaciones de digestibilidad del grano de sorgo <i>in vivo</i>	9
3.4.3 Evaluaciones de digestibilidad del grano de sorgo <i>in vitro</i>	10
3.5 Factores anti-nutrimientales del sorgo	11
3.5.1 Factores exógenos	12
3.5.1.1 Almidón	12
3.5.1.2 Lípidos	13
3.5.1.3 Taninos	13
3.5.2 Factores endógenos	14
3.5.2.1 Entrecruzamiento de proteínas	14
3.5.2.2 Racemización, formación de isopéptidos y enlaces disulfuro	14
3.5.2.3 Hidrofobicidad de proteínas	15
3.5.2.4 Cambios en la estructura secundaria	16
3.5.3 Prolaminas	16
3.5.3.1 Clasificación de las kafirinas	17
3.5.3.1.1 α -kafirinas	17
3.5.3.1.2 β -kafirinas	18
3.5.3.1.3 γ -kafirinas	18
3.5.3.1.4 δ -kafirinas	19
3.5.3.2 Kafirinas y la digestibilidad del grano de sorgo	19
3.5.3.2.1 Participación de la γ -kafirina en la digestibilidad	20
4. Antecedentes	25
5. Justificación	26
6. Hipótesis	27
7. Objetivo general	27
7.1 Objetivos específicos	27
8. Estrategia experimental	28
9. Materiales y métodos	29
9.1 Extracción de kafirinas totales	29
9.2 Perfil electroforético	29
9.3 Determinación del contenido de γ -kafirina	30
9.4 Amplificación y secuenciación del gen de γ -kafirina	31
9.5 Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de aminoácidos de γ -kafirina	32

ÍNDICE

	Página
9.6 Análisis estadístico	33
10. Resultados	34
10.1 Extracción de kafirinas totales	34
10.2 Perfil electroforético	34
10.3 Determinación del contenido de γ -kafirina	36
10.4 Amplificación y secuenciación del gen de γ -kafirina	38
10.5 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina	39
10.5.1 Comparación de secuencias	39
10.5.2 Análisis de la estructura secundaria	41
10.5.3 Análisis de hidrofobicidad de γ -kafirina	42
10.5.4 Predicción de la formación de puentes disulfuro	43
10.5.5 Predicción de estructura terciaria	44
10.5.6 Análisis de restricción con enzimas digestivas	48
11. Discusión	50
12. Conclusión	56
13. Perspectivas	57
14. Bibliografía	58
ANEXOS	64
A1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida SDS-PAGE o método Laemmli	64
A2. Metodología del uso del Bioanalizador Agilent 2100	67
A3. Método de Bradford para cuantificación de proteína en microplaca	69
A4. Método de extracción de ADN genómico CTAB	71
A5. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la región codificante de γ -kafirina	73
A6. Formación de enlaces disulfuro	75
A7. Procedimiento general para modelado por homología	77
A8. Soluciones empleadas	78

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. Composición química de los principales cereales producidos mundialmente	7
2. Enzimas que actúan en el sistema digestivo de aves y cerdos	8
3. Digestibilidad del grano de sorgo bajo y alto en taninos	9
4. Efecto del tipo de grano, la fracción del grano, el cocinado y el tratamiento con agentes reductores sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas del sorgo	11
5. Valores de R entre kafirinas y diversas evaluaciones	19
6. Contenido de proteína y digestibilidad proteica <i>in vitro</i> evaluadas durante el desarrollo y madurez del grano de sorgo de la variedad P721N	23
7. Composición de aminoácidos deducida a partir de las secuencias de ADN de las kafirinas	24
8. Contenido de proteína y porcentaje de digestibilidad de materiales de sorgo blanco	25
9. Rendimientos de extracción de kafirinas totales	34
10. Cantidad de γ -kafirina cuantificada a partir del perfil electroforético de las kafirinas totales y del perfil electroforético obtenido en el bioanalizador	37
11. Coeficientes de correlación (R) del contenido de γ -kafirina de proteína, la cantidad de kafirinas totales extraídas, el contenido de proteína total y la digestibilidad <i>in vitro</i> .	38
12. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de γ -kafirina	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estructura del grano de sorgo	5
2. Cuerpos proteicos del endospermo de los cereales	6
3. Cantidad de kafirinas contenidas en el grano de sorgo	17
4. Separación de las kafirinas de sorgo en SDS-PAGE	21
5. Microfotografía del cuerpo proteico de la línea P851171 altamente digerible y de una variedad de sorgo normal	22
6. Entrecruzamiento de kafirinas en el grano de sorgo	22
7. Perfil electroforético de kafirinas totales en condiciones reductoras	35
8. Electroforesis de albumina de suero bovino para la construcción de la curva	35
9. Perfil electroforético de kafirinas totales en condiciones reductoras	36
10. ADN genómico aislado de plantas de sorgo	38
11. Productos de PCR empleando oligonucleótidos específicos para el gen de γ -kafirina	39
12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de γ -kafirina de sorgo	40
13. Estructura secundaria de la secuencia deducida de γ -kafirina en los materiales A71 y Var-9	42
14. Predicción de la formación de puentes disulfuro en la secuencia de γ -kafirina correspondiente al material A71	43
15. Predicción de la formación de puentes disulfuro en la secuencia de γ -kafirina correspondiente al material Var-9	44
16. Alineamiento de las secuencias de γ -kafirina, 1psyA y 1B1uA	45
17. Modelos de estructura terciaria y superposición de γ -kafirina A79 y P79, 1psyA	47
18. Análisis del modelo propuesto de la estructura terciaria de la γ -kafirina de los aminoácidos 86 al 173	48
19. Secuencia de γ -kafirina donde se muestran los cortes enzimáticos realizados por pepsina, tripsina y quimiotripsina	48

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
dNTPs	Dinucleótidos trifosfatados
EtBr	Bromuro de etidio
g	Gramos
°C	Grados Celsius
h	Horas
ha	Hectáreas
Kg	Kilogramos
mM	Milimolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
mg/ mL	Miligramos por mililitro
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μg/ μL	Microgramos por microlitro
M	Molar
ng	Nanogramos
ng/ μL	Nanogramos por microlitro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RNAse	Ribonucleasa
TAE	Tampon Tris-acetato-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
Tm	Temperatura de alineamiento
Tris-HCl	Tris (hidroximetil)aminometano- ácido clorhídrico
t	Toneladas
V	Volts

1. Resumen

El uso de la semilla del sorgo en la alimentación animal está limitado por su baja digestibilidad, causada por el contenido de taninos y la formación de oligómeros de kafirinas, una familia de prolaminas hidrofóbicas clasificadas en α , β , γ y δ -kafirinas. Las γ -kafirinas podrían participar en la disminución de la digestibilidad formando enlaces disulfuro. Se han reportado dos secuencias de γ -kafirina con un 99% de identidad en la secuencia putativa de aminoácidos, una de ADN genómico (no. acceso X62480) y otra de ADNc (no. acceso M73688). Pero se desconoce si existen diferencias en la secuencia de aminoácidos entre materiales de sorgo blanco. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el perfil electroforético de prolaminas, el contenido de γ -kafirina, y la secuencia putativa de aminoácidos de γ -kafirina en 12 materiales de sorgo blanco. El perfil electroforético de las kafirinas se obtuvo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). El contenido de γ -kafirina se obtuvo por cuantificación densitométrica de la banda. La región codificante del gen de γ -kafirina se obtuvo por PCR usando ADN genómico y el producto de amplificación se utilizó para determinar la secuencia de nucleótidos, a partir de la cual se dedujo la secuencia de aminoácidos. La estructura secundaria y terciaria de la γ -kafirina se obtuvo por análisis *in silico*, a partir de la secuencia de aminoácidos. El material A71 mostró la menor digestibilidad *in vitro* con pepsina (76.6%), mientras que el material Var-9 la más alta (87.4%) ($P < 0.05$). El perfil electroforético de kafirinas en los 12 materiales mostró la presencia de α_1 , α_2 , β , y γ -kafirinas. Aunque no se detectaron diferencias significativas en el contenido de γ -kafirina el material de mayor contenido fue A71 (5.19%) y el de menor fue A20 (2.76%). El contenido de γ -kafirina no tuvo correlación con la digestibilidad. En la secuencia putativa de aminoácidos, 8 de los materiales tuvieron 100% de identidad con la secuencia M73688, y 4 tuvieron 99.5% de identidad con X62480, la diferencia entre ellos fue una sustitución de alanina por prolina en el residuo 79; lo que sugirió la formación de dos grupos de secuencias, el primer grupo estuvo formado por los materiales A16, A20, A71 y B9 donde sus secuencias contienen alanina en el residuo 79; y el segundo grupo está formado por los materiales B22, B73, Fortuna, Itsmeño, Perla, Sureño, S-23, y Var-9 en los que sus secuencias contienen prolina en el residuo 79. La predicción de la estructura secundaria mostró que el material A71 con la menor digestibilidad *in vitro* (76.6%) no formó enlaces disulfuro intramoleculares, mientras que el

material Var-9 que tuvo la mayor digestibilidad (87.4%) formó tres enlaces disulfuro intramoleculares entre las cisteínas 131-139, 138-200, y 190-203. La γ -kafirina contiene un dominio hacia el extremo carboxilo entre los aminoácidos 86 y 173, con 24% de identidad a lpsyA. **En conclusión**

2. Introducción

El sorgo crece en condiciones limitantes de agua, posee un alto valor nutritivo y un uso potencial en la industria. Sin embargo, su uso en la alimentación animal, incluyendo la humana, es restringido debido a la baja digestibilidad del grano, la cual es atribuida principalmente al contenido de taninos y a la formación de oligómeros de kafirinas, una familia de prolaminas altamente hidrofóbicas clasificadas en α , β , γ , y δ -kafirinas (Duodo *et al.*, 2003).

Los estudios de digestibilidad del grano de sorgo indican que las diferencias entre variedades de sorgo se deben, probablemente a la variación en el contenido de taninos y de kafirinas. En las variedades libres de taninos condensados las kafirinas parecen ser las principales responsables de la disminución de la digestibilidad proteica (Oria *et al.*, 1995).

De manera general el contenido de kafirinas se correlaciona negativamente con la digestibilidad del grano de sorgo. Se ha postulado que las γ -kafirinas podrían desempeñar una función predominante en la disminución de la digestibilidad. Algunas evidencias que soportan esta hipótesis son: 1) su alta hidrofobicidad (Duodo *et al.*, 2003), 2) la formación de enlaces disulfuro con las α -kafirinas (El Nour *et al.*, 1998), 3) su unión preferencial con los taninos (Taylor *et al.*, 2007), y 4) su localización en la periferia de los cuerpos proteicos del endospermo del grano (Oria *et al.*, 2000).

Hasta el momento se han reportado dos secuencias de *Sorghum bicolor*, una de ADN genómico y otra de ADNc correspondientes al gen codificante de γ -kafirina, con un 99% de identidad en la secuencia putativa de aminoácidos. Pero se desconoce si existen diferencias en la secuencia de este gen entre variedades de sorgo.

En el presente trabajo se propuso caracterizar la γ -kafirina en diferentes materiales de sorgo blanco con bajo contenido de taninos, con base en el perfil electroforético de las prolaminas, el contenido de γ -kafirina y la secuencia del gen que codifica para la misma.

3. Marco teórico

3.1 Características generales del sorgo

Se considera que el sorgo existió en la India en el siglo I d. C. Esculturas que lo describen se hallaron en ruinas asirias en el año 700 a.C. Sin embargo, el sorgo quizás sea originario de África central, Etiopía o Sudán, pues es allí donde se encuentra la mayor diversidad de tipos (AGROBIT, 2010). El género *Sorghum* incluye especies silvestres y cultivadas, las cuales se encuentran distribuidas actualmente en África, Asia y América. El sorgo fue traído a América en el siglo XVII; los afroamericanos elaboraban pan, tortas y amasijos. Este cereal (*Sorghum bicolor* L. Moench) pertenece a la tribu Andropogonae de la familia herbácea Poaceae. Se conoce bajo varios nombres: mijo grande y maíz de guinea en África occidental, kafir en África austral, duró en el Sudan, mtama en África oriental, iowar en la India y kaoliang en China (FAO, 2010).

El sorgo es de tallo cilíndrico y mide de 1 a 2 m de altura, tiene un sistema radicular que alcanza hasta 2 m de profundidad, una inflorescencia terminal en forma de espiga llamada panoja y semillas esféricas de 3 mm de diámetro, su color puede ser negro, rojizo o amarillento según la variedad (AGROBIT, 2010).

El sorgo puede crecer en una amplia variedad de suelos desde texturas arcillosas hasta arenosas. Para obtener la máxima producción deben ser suelos profundos, arcillosos, y con pH entre 5.5 y 7.5. El sorgo es tolerante a condiciones ambientales desfavorables como la sequía y la salinidad, y tiene un alto potencial para la producción de alimento y aplicaciones industriales, crece en ambientes donde la mayoría de los cereales no lo hacen, incrementando su biomasa en condiciones limitantes de agua y a una alta concentración de CO₂ atmosférico (Ottman *et al.*, 2001). Además, tiene la ventaja de que su producción rinde más bajo condiciones de estrés hídrico en comparación con la de otros cultivos como el maíz (Farre y Faci, 2006).

El sorgo es el quinto cereal más producido en el mundo, siendo los principales productores E.U.A con 12.6 millones de toneladas, Nigeria con 9.0 millones de toneladas,

India con 7.1 millones de toneladas, México con 6.2 millones de toneladas y Argentina con 2.7 millones de toneladas (FAOSTAT, 2007).

En México los estados con mayor producción son Tamaulipas con 2.43 millones de toneladas, Guanajuato con 1.6 millones de toneladas, Sinaloa con 0.62 millones de toneladas, Michoacán con 0.53 millones de toneladas, y Nayarit con 0.33 millones de toneladas, seguidos por los estados de Morelos, Jalisco, Nuevo León y Chihuahua; con un rendimiento nacional anual de 3.58 t/Ha (SIACON, 2007).

La producción nacional de sorgo se destina exclusivamente a la alimentación de animales de granja, principalmente el cerdo y las aves de corral, a diferencia de otros países donde este cereal representa la principal fuente de carbohidratos para la alimentación humana (Duodu *et al.*, 2003).

3.2 Estructura del grano de sorgo

La estructura del grano de sorgo está compuesta por tres partes principales que son: epicarpio, endocarpio y endospermo; encontrándose este último en mayor proporción. El endospermo está formado por almidón y proteínas, y tiene la función de servir como alimento al embrión durante el desarrollo de la planta (Figura 1).

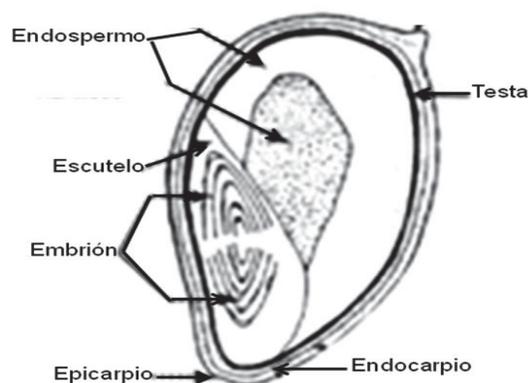


Figura 1. Estructura del grano de sorgo. Corte en sección longitudinal (Domanski *et al.*, 1997).

Las proteínas encontradas en el endospermo son conocidas como proteínas de almacenamiento de las semillas (PAS), estas son sintetizadas y secretadas por el retículo

endoplásmico rugoso (rER); después de ser traducidas se elimina el péptido señal ubicado en el extremo amino terminal, y las PAS son desplazadas al lumen del retículo endoplásmico (RE) formando cuerpos proteicos-I (PB-I). Además, en el endospermo también se encuentran otras PAS como albúminas y globulinas, las cuales son depositadas dentro de vacuolas, formando PB-II (Kawakatsu, 2010).

Hay tres vías de transporte de proteínas para formar PB-II. La primera es a través del aparato de Golgi, en el que vesículas densas derivadas de Golgi transportan PAS a PB-II. La segunda vía es la acumulación de precursores (PAC) en vesículas, donde son directamente derivadas de rER y transportadas como PAS a PB-II. Y la tercera ruta es con procesos ligados a la autofagia, donde PB derivados del RE son incorporados dentro de vacuolas formando PB-II (Kawakatsu, 2010). En la Figura 2 se muestran los dos tipos de cuerpos proteicos almacenados en el endospermo del grano de sorgo.

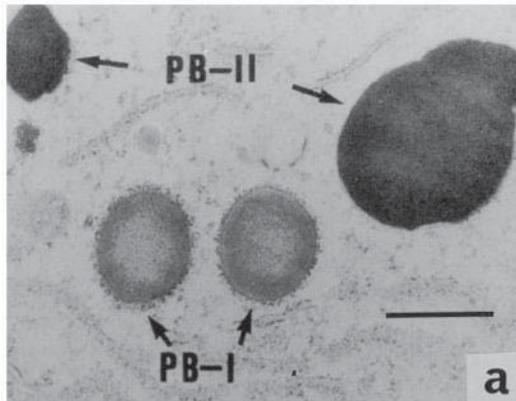


Figura 2. Cuerpos proteicos del endospermo de los cereales. Se muestran dos tipos de cuerpos proteicos. PB-I son vesículas esféricas derivadas del RE y contiene PAS llamadas prolaminas. PB-II son vesículas amorfas que están en vacuolas y contienen PAS que consisten de albúminas y globulinas.

El contenido de proteína del grano de sorgo es semejante al de otros cereales cultivados y ampliamente utilizados en el mundo, por ello es importante conocer la composición química de este cereal.

3.3 Composición química del sorgo

El sorgo tiene una composición química similar a la del maíz, el trigo, y el arroz; aunque puede tener un contenido de proteína cruda y almidón más alto. En cuanto al contenido

de vitaminas y minerales del grano de sorgo estos son similares entre los cultivos antes mencionados. Las proteínas del sorgo en general tienen un alto contenido de los aminoácidos: Leucina, Ac. Glutámico, Alanina, Prolina, y Ac. Aspártico, siendo los más limitantes los aminoácidos esenciales Lisina, Metionina, y Triptófano (Cuadro 1) (Jaramillo, 1994).

Cuadro 1. Composición química de los principales cereales producidos mundialmente

Compuesto	Sorgo	Maíz	Trigo	Arroz decorticado
Proteína (%)	7.0-14.0	10.0	11.5	8.0
Lípidos (%)	2.4-6.5	4.5	2.0	1.5
Carbohidratos (%)	70.0-90.0	71.0	70.0	77.0
Fibra (%)	1.2-3.5	2.0	2.0	0.5
Ca (mg)	11.0-58.6	12.0	30.0	10.0
P (mg)	167.0-751.0	340.0	380.0	290.0
Fe (mg)	0.9-20.0	2.5	3.5	2.0
Tiamina (mg)	0.2-0.5	0.35	0.40	0.25
Niacina (mg)	2.9-6.4	2.0	5.0	2.0
Riboflavina (mg)	0.1-0.2	0.13	0.10	0.05
Aminoácidos esenciales	Sorgo	Maíz	Trigo	Arroz
Lisina (%)	2.4	2.7	2.5	3.7
Treonina (%)	3.3	3.6	2.5	5.1
Valina (%)	4.8	4.7	2.9	5.7
Isoleucina (%)	3.8	3.5	4.2	3.9
Leucina (%)	13.3	12.4	6.6	8.0
Tirosina (%)	1.8	4.4	3.5	3.3
Fenilalanina (%)	4.9	5.0	4.9	5.2
Triptófano (%)	1.0	1.0	1.3	1.4
Metionina (%)	1.2	1.7	1.0	2.4

(Domanski *et al.*, 1997)

La principal importancia de este cereal es su uso en la alimentación de animales de granja, ya que además del grano se les puede suministrar el tallo y las hojas de dos formas: verde picado, o henificado como ensilaje (AGROBIT, 2010).

3.4 Importancia en la alimentación animal

El grano de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench), participa aproximadamente entre un 60-70% en la estructuración de la fórmula promedio balanceada, destinada básicamente para abastecer la industria avícola y porcina nacional (SAGARPA, 2007). Su valor nutritivo es considerado ligeramente inferior al del grano de maíz en la alimentación avícola y porcina. Esto se debe a la menor digestibilidad de carbohidratos y de las fracciones proteicas, lo cual ocasiona una menor producción de los animales en términos de velocidad de crecimiento e índice de conversión alimenticia. Dado que la digestibilidad del grano de sorgo es un

parámetro importante para determinar cuáles componentes del mismo participan en ella, a continuación se describirán algunos aspectos generales de la digestibilidad de aves y cerdos.

3.4.1 Enzimas que participan en la digestión en animales monogástricos

Debido a que el grano de sorgo producido en México es destinado principalmente a la alimentación de aves y cerdos es importante conocer los mecanismos de digestión de estos animales. De manera general los mecanismos de digestión en aves y cerdos son similares, dado que el tracto digestivo está determinado por el tipo de alimento ingerido por cada especie. Las aves a diferencia de los cerdos tienen molleja, la cual ayuda a una mejor molienda de los granos. A continuación se presentan ciertas particularidades de los aparatos digestivos tanto de aves de corral como de cerdos (Cuadro 2) (UGRJ, 2010).

Cuadro 2. Enzimas que actúan en el sistema digestivo de aves y cerdos

Localización	Enzima	Substrato	Producto final
Aparato digestivo de aves			
Glándulas salivales	Amilasa	Almidón	Maltosa
Proventrículo	Pepsina HCL	Proteínas Activa proteinasas	Polipéptidos
Jugo intestinal	Amilasa Tripsina	Polisacáridos Polipéptidos	Poli-disacáridos Péptidos
Jugo pancreático	Amilasa Tripsina Lipasa	Poli-disacáridos Polipéptidos Grasa coloidal	Di-monosacáridos Aminoácidos Ac. Grasos y glicéridos
Hígado	Sales biliares	Masa de grasa	Grasa coloidal
Aparato digestivo de cerdos			
Boca (saliva)	Amilasa	Almidón	Maltosa
Estomago	Pepsina	Proteínas	Polipéptidos
Páncreas	Amilasa Lipasa Tripsina	Almidón Triglicéridos Polipéptidos	Maltosa di-monoglicéridos Polipépt. Menores
Intestino	Quimiotripsina	Polipéptidos	Polipépt. Menores
	Esteroquinasa	Tripsinógeno	Tripsina
	Aminopeptidasa	Polipéptidos	Aminoácidos
	Carboxipeptidasa	Polipéptidos	Aminoácidos
	Dipeptidasas	Dipéptidos	Aminoácidos
	Tripsina	Polipéptidos	Polipépt. Menores
	Maltasa	Maltosa	Glucosa
	Lactasa	Lactosa	Glucosa/galactosa
	Sacarasa	Sacarosa	Glucosa/fructosa
	Lipasa	Triglicéridos	di- monoglicéridos

Se observa en las dos especies que las enzimas que más participan son las amilasas, pepsinas, tripsinas y lipasas. En este trabajo solo se hablará de las enzimas descritas que actúan sobre las proteínas del grano de sorgo. La pepsina tiene un pH óptimo de acción de 2; actúa rompiendo enlaces peptídicos próximos a los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina. La tripsina tiene un pH óptimo de 8 y actúa rompiendo los enlaces peptídicos por el extremo carboxilo terminal de los aminoácidos lisina y arginina. Y por último la quimiotripsina, la cual tiene un pH óptimo de 8 y actúa sobre los enlaces peptídicos de los residuos de aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (UGRJ, 2010).

La digestibilidad es usada como un indicador de la biodisponibilidad de la proteína, esencialmente se refiere a la susceptibilidad de la proteína a la proteólisis. Una proteína con alta digestibilidad tiene potencialmente un mejor valor nutricional que una proteína de baja digestibilidad, porque ésta provee de más aminoácidos para la absorción durante la proteólisis (UGRJ, 2010).

3.4.2 Evaluaciones de digestibilidad del grano de sorgo *in vivo*

En 1947 D'Alessandro y colaboradores evaluaron la digestibilidad de dos variedades de sorgo; una de ellas Dekalb DA 49 (X7735) catalogada como sorgo dulce baja en taninos condensados (SD), y la otra variedad Pioneer B 815, catalogada como antipájaro alta en taninos condensados (SAP). Donde se observó que la digestibilidad real de la proteína cruda (DrPC) y la energía metabolizable (EM) son significativamente más altas en la variedad de sorgo Dekalb (SD) en comparación con la variedad Pioneer (SAP) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Digestibilidad de granos de sorgo bajo y alto en taninos

	SD	SAP
DMS (%)	78.07	77.28
DMO (%)	79.29	78.43
DrPC (%) [‡]	68.62 ^a	53.61 ^b
BN (g/día) [‡]	18.43 ^a	5.60 ^b
EM (Kcal/kg) [‡]	3.268 ^a	3.119 ^b

[‡]Letras distintas en la misma fila difieren significativamente. DMS: Digestibilidad aparente de la materia seca, DMO: Digestibilidad aparente de la materia orgánica, DrPC: Digestibilidad real de la proteína cruda, BN: Balance de nitrógeno, EM: Energía metabolizable.

Por otro lado Jaramillo y colaboradores en 1994 evaluaron tres variedades de sorgo altas en taninos: Chaguaramas-3, Nk-Savanna-S, y Pioneer 816-B con la finalidad de analizar

la energía metabolizable (EM) y el efecto de los taninos en el sorgo. Sus resultados mostraron que la EM de las tres variedades evaluadas oscila entre 3.412 y 3.676 Kcal/kg, sin guardar una relación consistente con el contenido de taninos.

De las dos evaluaciones anteriores se puede observar que la EM es mayor en los experimentos realizados con gallos, y se puede dilucidar que de igual forma existe una mayor digestibilidad de la proteína del grano de sorgo. Este fenómeno puede deberse a diversos factores de la composición del grano de sorgo, así como a la diferencia de tipos de digestión realizada en aves y cerdos.

3.4.3 Evaluaciones de la digestibilidad del grano de sorgo *in vitro*

Hasta ahora se ha mencionado de cuatro variedades altas en taninos condensados y una baja en taninos condensados en las que su digestibilidad no es mayor al 68% (D'Alessandro *et al.*, 1947 y Jaramillo *et al.*, 1994). Duodu y colaboradores en el 2003 realizaron una recopilación de información en la cual diversos grupos de investigación reportan el efecto del tipo de grano, la fracción del grano, y el tratamiento sobre la digestibilidad en variedades libres de taninos condensados (Cuadro 4). De manera general se observó, que la digestibilidad de la harina de sorgo disminuyó con el proceso de cocción y se incrementó con el uso de agentes reductores. Cuando se evaluó la fracción entera del grano de sorgo crudo la digestibilidad osciló entre un 50 y 90%, mientras que cuando el grano de sorgo es fraccionado y en presencia de agentes reductores la digestibilidad osciló entre un 78 y 96%. Los datos mencionados son de importancia debido a que a los animales se les suministra de manera cruda, ya sea en forma de grano entero o fraccionado.

Cuadro 4. Efecto del tipo de grano, la fracción del grano, el cocinado y el tratamiento con agentes reductores sobre la digestibilidad *in vitro* de las proteínas del sorgo

Característica del grano	Fracción*	Tratamiento	Digestibilidad (%)
Sin taninos condensados (Axtell <i>et al.</i> , 1981)	Grano entero	SC; P	88.6-93.0
		C; P	45.3-56.7
	Descascarillado	SC; P	78.2-85.7
		C; P	37.1-43.0
Sin taninos condensados (Rom <i>et al.</i> , 1992)	Grano entero	SC; P	79.0
		C; P	58.0
		SC; P; AR	96.0
		C; P; AR	79.0
Sin taninos condensados (Oria <i>et al.</i> , 1995)	Decorticado	SC; P	69.2
		C; P	43.6
		SC; P; AR	93.0
		C; P; AR	56.2
Sin taninos condensados sorgo rojo (Duodu <i>et al.</i> , 2002)	Grano entero	SC; P	59.1
		C; P	30.5
	Endospermo	SC; P	65.7
		C; P	35.9
	Grano entero	SC; P	55.8
		C; P	36.6
Sin taninos condensados sorgo blanco (Duodu <i>et al.</i> , 2002)	Endospermo	SC; P	67.4
		C; P	39.4
		C; P	39.4

§: Harina; C: cocinada; SC: sin cocinar; AR: agente reductor; P: digestión *in vitro* con pepsina (Duodu *et al.*, 2003)

Además, el empleo de agentes reductores para aumentar la digestibilidad, indica que las proteínas contenidas en el grano de sorgo están formando enlaces disulfuro. Por ello es conveniente conocer los tipos de factores que afectan la disponibilidad de la proteína en el grano de sorgo.

3.5 Factores anti-nutrimientales del sorgo

Existen diversos factores exógenos y endógenos que afectan la disponibilidad de la proteína en el grano del sorgo. La participación de estos factores es más evidente cuando el grano de sorgo es molido y cocinado, ya que durante estos procesos las proteínas pueden interactuar con componentes no proteicos o sufrir modificaciones, que afectan su digestibilidad. Uno de los aspectos más estudiados en la disminución de la digestibilidad es el entrecruzamiento y la formación de enlaces disulfuro entre prolaminas que son consideradas las principales causas de la disminución de la digestibilidad del grano de sorgo (Duodu *et al.*, 2003).

3.5.1 Factores exógenos

Los factores exógenos se refieren a la interacción de la proteína del grano con compuestos no proteicos como almidón, lípidos, polifenoles, y fitatos.

3.5.1.1 Almidón

Existe una estrecha asociación entre los cuerpos proteicos y los gránulos de almidón contenidos en el endospermo del grano de sorgo (Sabelli y Larkins, 2009). La consecuencia de tal asociación puede ser que el almidón gelatinizado después de la cocción, contribuya a reducir la accesibilidad de las enzimas proteolíticas a los cuerpos proteicos y por lo tanto la digestibilidad de la proteína (Duodu *et al.*, 2003). La información en la literatura sobre la participación del almidón en la digestibilidad de las proteínas del sorgo parece ser un conflicto, debido a que en el sorgo la presencia de los cuerpos proteicos tiene efectos sobre la gelatinización y digestibilidad del almidón; reduciendo su hidrólisis enzimática (Oria *et al.*, 1995b).

De manera *in vitro* el uso de pronasa aumenta la hidrólisis del almidón en el grano de sorgo como resultado de incrementar la superficie de contacto del almidón con la amiloglicosidasa (Rooney y Pflugfelder, 1986); dicho efecto ha sido observado en granos de sorgo con baja capacidad de gelatinización y que contienen más kafirinas en los cuerpos proteicos. En arroz se ha reportado que la adición de 2- β mercaptoetanol cuando este es cocinado, incrementa la gelatinización del almidón lo que indica que el rompimiento de los enlaces disulfuro que unen a las proteínas alrededor de los gránulos de almidón incrementa en gran medida la gelatinización (Hamaker y Griffin, 1993).

En sorgo, el tratamiento de harina con pepsina antes de la cocción o en la cocción con agentes reductores (ditiotreitól), incrementa la digestibilidad del almidón, sugiriendo que la proteína actúa como barrera a su digestión (Zhang y Hamaker, 1998). Se ha planteado la hipótesis de que cuando el grano se somete a cocción, el enfriamiento hace al almidón resistente formando complejos con las proteínas del sorgo que son menos susceptibles al ataque enzimático (Duodu *et al.*, 2003). La disposición del almidón y las proteínas en el maíz son similares a las del sorgo; se ha visto que cocinando el grano entero de maíz, seguido de un tratamiento con alfa-amilasa y por último la digestión con pepsina aumenta la digestibilidad de la proteína (Duodu *et al.*, 2002).

3.5.1.2 Lípidos

El contenido de lípidos en el grano de sorgo oscila de 2.4% a 6.5%, estos lípidos están contenidos principalmente en las capas del embrión y la testa que cubre al endospermo. El embrión contiene hasta un 80% del total de los lípidos (FAO, 2010). Al parecer, los lípidos no juegan una función importante en la digestibilidad proteica, pero sí en la energía metabolizable (EM). Se ha observado que a pesar de que se suministren alimentos ricos en taninos, la presencia de lípidos mejora la EM disminuyendo el efecto perjudicial que los taninos pudieran causar (Koenig, 1991).

3.5.1.3 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos de las plantas, su característica principal es precipitar y bloquear a las proteínas influyendo sobre el valor nutricional de los alimentos. Las plantas generan este tipo de compuestos como mecanismo de defensa contra insectos, aves y hongos. Además de formar complejos con proteínas, los taninos son capaces de formar también complejos con el almidón, celulosa y minerales; debido a que contienen grupos hidroxilo y carboxilo. Los taninos están localizados en las vacuolas o en las superficies serosas de la plantas. En la semilla se localizan principalmente en la testa, epicarpio y endocarpio (cáscara). Los taninos se dividen en dos clases, los taninos hidrolizables y los taninos condensados; estos últimos afectan en la nutrición animal, ya que son resistentes a la degradación hidrolítica (Duodu *et al.*, 2003).

La forma en que afectan en la nutrición animal es: 1) disminuyendo el consumo voluntario por parte del animal, 2) formando complejos con sustancias nutritivas del grano de sorgo, 3) formando complejos con las enzimas digestivas, 4) en algunos casos los complejos de taninos lesionan el tracto digestivo, 5) y tienen efectos tóxicos (Latorre-Ramírez y Calderón-Araque, 1998).

Se considera que la baja digestibilidad del grano de sorgo se debe al alto contenido de polifenoles en el grano (ácidos fenólicos, flavonoides y taninos), de manera particular al contenido de taninos, ya que estos pueden unirse a las proteínas precipitándolas y disminuyendo su digestibilidad (Duodu *et al.*, 2003). Sin embargo, la disminución en la digestibilidad se ha observado también en harina cocinada proveniente de variedades de sorgo

libres de taninos (Cuadro 4) (Duodu *et al.*, 2002). Además, se han detectado diferencias significativas en la digestibilidad entre genotipos de sorgo con contenidos similares de taninos, por lo que los taninos solo son parcialmente responsables de las variaciones en la digestibilidad del grano (Elkin *et al.*, 1996), lo que sugiere que además de los taninos existe otro factor causante de la disminución de la digestibilidad.

3.5.2 Factores endógenos

Los factores endógenos hacen referencia a cambios internos en las proteínas del sorgo, como el entrecruzamiento de las mismas, la racemización, la formación de isopéptidos y enlaces disulfuro, la hidrofobicidad de las prolaminas, y cambios en la estructura secundaria.

3.5.2.1 Entrecruzamiento de proteínas

Durante los tratamientos a los que son sometidos los alimentos, las proteínas pueden sufrir cambios como la hidratación, y la formación de enlaces disulfuro entre monómeros por efecto de la temperatura. Además, durante algunas de estas reacciones se pueden llegar a formar algunos derivados de aminoácidos, o se pueden formar enlaces que no existían inicialmente entre aminoácidos de una misma o de varias moléculas proteicas. El entrecruzamiento que se pudiera presentar entre las proteínas disminuye la digestibilidad y la calidad proteica del alimento (Duodu *et al.*, 2003)

3.5.2.2 Racemización, formación de isopéptidos y enlaces disulfuro

El proceso en el que los L-aminoácidos son convertidos en D-aminoácidos es conocido como racemización. Esta conversión afecta el valor nutricional, debido a que los D-aminoácidos son digeridos y absorbidos lentamente en comparación con los L-aminoácidos. Los procesos de racemización ocurren cuando se somete a las proteínas a tratamientos con bases y ácidos a altas temperaturas. La formación de isopéptidos por la racemización y el entrecruzamiento entre estos disminuye la digestibilidad y la accesibilidad de las proteínas (Duodu *et al.*, 2003).

La cocción húmeda de la harina de sorgo induce la formación de enlaces disulfuro entre los monómeros de kafirinas, produciendo un alto grado de polimerización (Duodu *et al.*,

2003; Nunes *et al.*, 2005; Belton *et al.*, 2006), sin embargo la adición de agentes reductores como ditioneitol, 2-mercaptoetanol, o bisulfito de sodio reducen la formación de puentes disulfuro impidiendo la formación de estructuras secundarias incrementando la digestibilidad de las proteínas (Hamaker *et al.*, 1987). Dicha evidencia ha sido reforzada mediante la expresión heteróloga de mutantes de la proteína γ -zeína de maíz; en la que se observó que la sustitución del residuo de cisteína 155 por alanina incrementa considerablemente su digestibilidad *in vitro* con pepsina, tripsina y quimiotripsina en comparación con una γ -zeína nativa. Esto pudo deberse a que el enlace disulfuro que se forma entre los residuos de cisteínas 128 y 155 es crítico para mantener la estabilidad y un adecuado plegamiento de la γ -zeína (Lee y Hamaker, 2006). Estas evidencias confirman que los enlaces disulfuro no solo contribuyen en la disminución de la digestibilidad, sino que participan e influyen en la función y el mantenimiento de la estructura secundaria de las kafirinas.

3.5.2.3 Hidrofobicidad de proteínas

Las proteínas del sorgo y del maíz son conocidas como proteínas hidrofóbicas, debido a su alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos. Por esta característica estas proteínas solo pueden ser extraídas en soluciones acuosas de alcoholes. Las soluciones acuosas de propan-1-ol al 50% (v/v) son eficientes para extraer las proteínas del trigo y la cebada, las de propan-2-ol al 55% (v/v) para las proteínas de maíz, mientras que las soluciones acuosas de 2-metil-2-propanol al 60% (v/v) son más eficientes para extraer a las proteínas del sorgo. Esto se debe a que el 2-metil-2-propanol es más hidrofóbico que el etanol, el propan-1-ol y el propan-2-ol, por lo tanto las proteínas del sorgo son más hidrofóbicas comparadas con las proteínas de otros cereales (Belton *et al.*, 2006). Adicionalmente, conociendo el perfil de aminoácidos que constituye una proteína se puede determinar la hidrofobicidad con base a las energías libres de hidratación de cada uno de los aminoácidos constituyentes. Mientras más negativo sea el valor de energía libre de hidratación, menor hidrofobicidad tendrá la proteína (Duodu *et al.*, 2003).

3.5.2.4 Cambios en la estructura secundaria

Entre 50-60% de las proteínas de los cuerpos proteicos del sorgo y del maíz sin cocinar tienen una conformación de hélice- α , pero cuando son calentadas por calor húmedo (Duodu *et al.*, 2001; Emmambux y Taylor, 2009; Ezeogu *et al.*, 2008) o por microondas (Byaruhanga *et al.*, 2006) cambian su estructura secundaria a una conformación de hoja- β . Lo mismo ocurre con el proceso de secado. Debido a que el proceso de cocción húmeda induce la formación de hojas- β en las proteínas de la harina de sorgo, pero no en las proteínas de la harina de maíz, se ha sugerido que la formación de hojas- β en las proteínas del sorgo puede ser la causa de la reducción en la susceptibilidad a la proteólisis por pepsina (Emmambux y Taylor, 2009; Gao *et al.*, 2005), ya que la formación de hojas- β es indicativa de la agregación de proteínas que surge probablemente de un despliegue parcial de las hélices- α y su subsiguiente agregación (Byaruhanga *et al.*, 2006). Estos cambios conformacionales explican parcialmente la menor digestibilidad de las proteínas del sorgo, ya que cuando los sorgos mutantes P850029 y P851171, con alta digestibilidad proteica, son cocinados con calor húmedo tienen cambios en la estructura secundaria similares a los que presentan los sorgos convencionales y sin embargo siguen conservando una alta digestibilidad proteica (Duodu *et al.*, 2001).

3.5.3 Prolaminas

Los cereales son considerados una de las principales fuentes de proteínas en la alimentación humana y del ganado. El gluten del trigo fue una de las primeras proteínas estudiadas en los cereales (Shewry y Halford, 2002). En 1916 Johns y Brewster definieron como kafirinas a la fracción de proteínas del sorgo solubles en etanol al 70%. Posteriormente Osborne acuñó el nombre de prolaminas, debido a su alto contenido de prolina y amidas, para definir a las proteínas solubles en alcohol (Shewry y Tatham, 1990).

Debido a lo anterior, a las proteínas del sorgo (kafirinas), se les conoce como una familia de prolaminas altamente hidrofóbicas las cuales son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y posteriormente depositadas como cuerpos proteicos (PB-I) en el endospermo del grano de sorgo sirviendo como fuente de nitrógeno al embrión durante las primeras etapas de su desarrollo (Figuras 1 y 2) (Oria *et al.*, 1995).

Como las kafirinas constituyen entre un 68 a 82% de las proteínas totales del grano de sorgo su composición determina en gran medida la calidad proteica del grano (Figura 3).

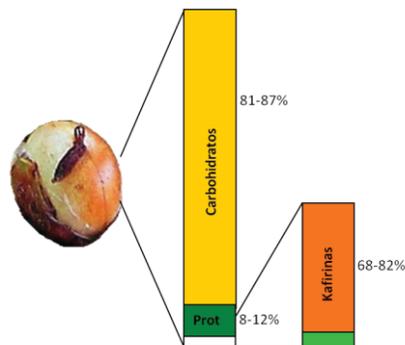


Figura 3. Cantidad de kafirinas contenidas en el grano de sorgo. Diseñado a partir de Watterson *et al.*, 1993 y Ioerge *et al.*, 2007)

En el grano de sorgo existen dos fracciones de kafirinas; la fracción 3 llamada también kafirina 2 o kafirina entrecruzada (soluble en alcohol y agentes reductores) esta fracción es más abundante que la fracción 2 conocida también como kafirina 1 o kafirina real (soluble en alcohol) (El Nour *et al.*, 1998; Duodu *et al.*, 2003). Esta solubilidad ha permitido extraer a las kafirinas del sorgo para diversos estudios, como su composición de aminoácidos, propiedades electroforéticas, cromatográficas e inmunológicas (Essen, 1987). Las características mencionadas han permitido su clasificación y la comparación de secuencias de aminoácidos con las zeínas del maíz, las cuales están mayormente estudiadas (Woo *et al.*, 2001).

3.5.3.1 Clasificación de las kafirinas

3.5.3.1.1 α -kafirinas

Se han reportado al menos 17 secuencias de aminoácidos de α -kafirinas clasificadas en α_1 -kafirinas (25 kDa) y α_2 -kafirinas (23 kDa), que conforman aproximadamente el 80 y el 60% del total de las prolaminas en el endospermo cristalino y el opaco, respectivamente (Shull *et al.*, 1991). Las α_1 y α_2 -kafirinas tienen su equivalente en el maíz con las α -zeínas de M_r 22,000 y 19,000 respectivamente; las cuales tienen una estructura primaria conservada formada por un péptido señal en el extremo amino-terminal, una sección de secuencias repetidas que forman dominios de hélice- α altamente conservados, y un extremo carboxilo-

terminal corto. Los dominios de hélice- α están constituidos por 15 a 20 aminoácidos delimitados por un segmento de poliglutamina (Garrat *et al.*, 1993).

En el caso de las α -zeínas de M_r 22,000 están formadas por diez dominios de hélice- α , mientras que las de M_r 19,000 contienen solo nueve. En el sorgo se han identificado dos subfamilias de α -kafirinas: la de M_r 22,000, cuyas secuencias son homologas a las α -zeínas de M_r 22,000, y la subfamilia homóloga a las α -zeínas de M_r 19,000, conocida como “19 kD-like” (Rezende y Figueira, 2008), que a diferencia de las α -zeínas de M_r 19,000 contienen un sexto dominio adicional de hélice- α .

3.5.3.1.2 β -kafirinas

Las β -prolaminas son codificadas por un solo gen que es ortólogo en sorgo y maíz (Rezende y Figueira, 2008). Su clasificación ha representado un reto, no solo por las discrepancias en su movilidad electroforética aparente, sino por la identidad en la secuencia de aminoácidos. Las β -kafirinas se encuentran en forma de oligómeros de distintos pesos moleculares; sin embargo, solo se ha reportado un gen cuya secuencia traducida codifica una proteína de M_r 18,745 y constituye aproximadamente el 8% de las prolaminas en el endospermo cristalino y el 12% en el opaco (Belton *et al.*, 2006). Esta proteína equivale a la β -zeína de M_r 15,000 en maíz; las β -zeínas de M_r 15,000 comparten con las γ -zeínas seis residuos de cisteína altamente conservados y algunos dominios polipéptidicos, por lo que Woo *et al.*, (2001) sugieren que las β -zeínas forman parte de la familia de las γ -zeínas. Sin embargo la β -kafirina de M_r 15,000 carece de los residuos de cisteína 25 y 27 contenidos en la β -zeína de M_r 15,000.

3.5.3.1.3 γ -kafirinas

Las γ -kafirinas conforman aproximadamente el 10 y el 20% de las prolaminas en el endospermo cristalino y el opaco, respectivamente (Belton *et al.*, 2006). Estas se clasificaron con base en las γ -zeínas de M_r 27,000 y 50,000 las cuales tienen en el extremo amino-terminal un bloque de secuencias repetidas ausente en las γ -zeínas de M_r 16,000. Este bloque en las γ -zeínas de M_r 27,000 está formado por ocho repetidos del hexapéptido PPPVHL, que difiere del bloque de las γ -zeínas de M_r 50,000 formado por repetidos de poliglutamina (Woo *et al.*,

2001). En sorgo solo se han identificado dos secuencias codificantes para γ -kafirina, una secuencia de ARNm (No. de accesión M73688) y otra de ADN genómico (No. de accesión de X62480) cuyas secuencias de aminoácidos deducidas tienen 99% de identidad entre sí y corresponden a la γ -kafirina de M_r 27,000. Estas secuencias codifican para un polipéptido con un tamaño aproximado de M_r 20,000 y una movilidad aparente de M_r 28,000. A diferencia de las γ -zeínas de M_r 27,000, las γ -kafirinas solo tienen cuatro repetidos del motivo PPPVHL.

3.5.3.1.4 δ -kafirinas

Aunque en sorgo no se han detectado δ -kafirinas a nivel de proteína, se han identificado dos secuencias de ARN (No. de accesión AY043223 y AY834250) con una alta identidad con las δ -zeínas de M_r 10,000.

3.5.3.2 Kafirinas y digestibilidad del grano de sorgo

En experimentos *in vivo* con pollos se ha correlacionado el contenido total de kafirinas con la disminución de la digestibilidad y la energía aprovechable (Salinas *et al.*, 2006). En este estudio se evaluaron 12 sorgos, con una concentración de kafirinas de 42 a 58% de la proteína total. La concentración de kafirinas se correlacionó de manera negativa con la digestibilidad de la proteína, energía metabolizable verdadera y aparente con valores de $R > 0.4$ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores de R entre kafirinas y diversas evaluaciones

	Kafirinas	AME
TME	-0.63**	0.91**
AME	-0.61**	1
ADF	-0.4*	0.01
CP	-0.49**	0.19
Almidón	0.23	-0.08
Amilosa	0.28	0.11

TME: Energía metabolizable verdadera corregida por N; AME: Energía metabolizable aparente; ADF: Fibra ácido detergente; CP: Proteína cruda. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Se observa que los valores de R entre las kafirinas la TME, la AME, y el CP son altamente significativos. Lo que indica que la concentración de kafirinas es un factor importante en la disminución de la digestibilidad y la energía aprovechable.

Hasta este momento todo indica que las kafirinas tienen una fuerte participación en la digestibilidad de las proteínas del grano de sorgo. A continuación se discuten algunas evidencias que proponen que las γ -kafirinas favorecen en gran medida en este efecto.

3.5.3.2.1 Participación de γ -kafirina en la digestibilidad

Se han descrito diversos factores involucrados con la disminución de la digestibilidad proteica en el grano de sorgo. En este apartado se presentan algunas de las principales evidencias que sugieren que las γ -kafirinas contribuyen mayoritariamente en la disminución de la digestibilidad proteica del grano de sorgo y son:

1) La mayor hidrofobicidad de la γ -kafirina del sorgo. La energía libre de hidratación de las α -kafirinas del sorgo (-140.36 kcal/mol) son muy similares a las α -prolaminas de otros cultivos como el maíz, sin embargo, este valor es mayor para las γ -kafirinas (-113.63 kcal/mol) en comparación con el resto de las kafirinas contenidas en el grano de sorgo, lo que se traduce en mayor hidrofobicidad para las γ -kafirinas. Esto podría contribuir a la menor digestibilidad de la harina de sorgo en comparación con las harinas de otros cultivos (Duodu *et al.*, 2003).

2) La formación de enlaces disulfuro entre las γ -kafirinas con las α_1 y α_2 -kafirinas. Adicionalmente a la presencia de las α , β , y γ -kafirinas, se han detectado oligómeros de distintos pesos moleculares conformados por kafirinas entrecruzadas en forma de polímeros, trímeros y dímeros (P, T y D) (Figura 4 A). Aproximadamente el 70% de las kafirinas extraídas por *ter*-butanol son oligómeros de γ , α_1 y α_2 -kafirinas unidas por enlaces disulfuro, mientras que el 90% de la fracción residual de kafirinas que no son extraídas por *ter*-butanol contiene además de polímeros de γ , α_1 y β -kafirinas, monómeros y dímeros de γ y α_1 -kafirinas (Figura 4 C). La presencia de estos oligómeros podrían ser responsables también de la disminución en la digestibilidad (El Nour *et al.*, 1998).

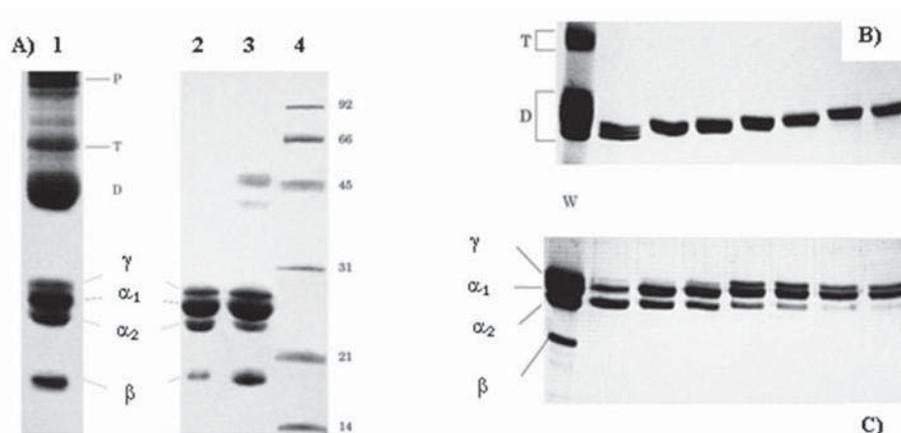


Figura 4. Separación de las kafirinas de sorgo en SDS-PAGE. A) Se muestra el perfil proteico correspondiente a las kafirinas. Carril 1: Oligómeros de distinto peso molecular, donde P: Polímeros, T: trímeros, D: dímeros, y los monómeros α_1 , α_2 , β , y γ -kafirinas; sometidos a condiciones no reductoras. Carril 2 y 3: Monómeros de α_1 , α_2 , β , y γ -kafirinas; sometidos a condiciones reductoras. Carril 4: marcador de proteínas. B) Se muestran diluciones de la fracción correspondiente a los dímeros de kafirinas antes de ser reducidos con 2-mercaptoetanol. C) Se muestran las diluciones de la fracción de dímeros de kafirinas después de ser reducidos. Tomado de El Nour *et al.*, 1998.

3) La localización de las γ -kafirinas en la periferia de los cuerpos proteicos, formando una barrera de protección. Al comparar la estructura de los cuerpos proteicos y la ubicación de las kafirinas en una variedad de sorgo normal y una línea altamente digerible (P851171), se determinó que los cuerpos proteicos de P851171 tenían mayor área de contacto debido a su forma irregular y la formación de numerosas invaginaciones, a diferencia de la estructura esférica observada en la variedad normal. Las α y β -kafirinas de ambas variedades se localizaron en el interior de los cuerpos proteicos, sin embargo, las γ -kafirinas de P851171 se localizaron específicamente en la base de las invaginaciones, lo que podría facilitar el contacto de la α -kafirina con las enzimas digestivas (Figura 5 A). En contraste, la variedad normal tiene las γ -kafirinas distribuidas en la periferia de los cuerpos proteicos formando una barrera. De esta manera, la forma esférica de los cuerpos proteicos y la distribución periférica de la γ -kafirina en la variedad normal podrían interferir con la digestión de la α -kafirina, la proteína de mayor almacenamiento localizada al centro de los cuerpos proteicos (Figura 5 B) (Oria *et al.*, 2000).

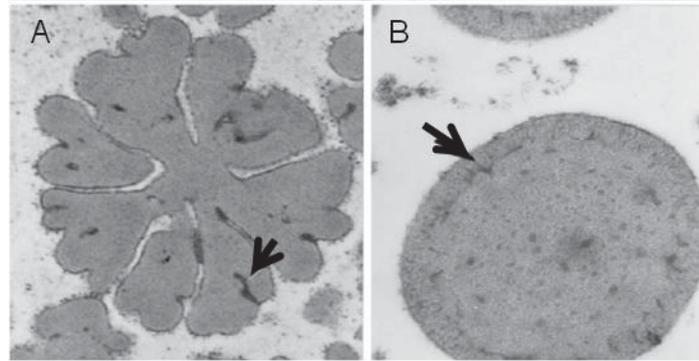


Figura 5. A) Microfotografía del cuerpo proteico de una línea altamente digerible P851171, y B) Microfotografía de una variedad de sorgo normal. Tomada de Duodu *et al.*, 2003.

4) El entrecruzamiento de kafirinas durante el proceso de maduración del grano de sorgo. Se ha determinado que existe una correlación directa entre la maduración del grano, el entrecruzamiento de kafirinas (formación de enlaces disulfuro) (Figura 6), y la disminución en la digestibilidad de la harina (Cuadro 6). La digestibilidad de la harina de sorgo sin cocinar es aproximadamente del 90% entre los 20 y 40 días después de la floración media (DDFM) y disminuye al 73.2% en el grano maduro. Sin embargo, al cocinar la harina la digestibilidad disminuye de manera altamente significativa del 88.2% a los 20 DDFM, hasta 55.2% en el grano maduro. Esta disminución en la digestibilidad se ha correlacionado con el entrecruzamiento de la β y la γ -kafirina, ya que a partir de los 30 DDFM el 40% de la γ -kafirina se encuentra en forma entrecruzada alcanzando un valor de entrecruzamiento del 90% en el grano maduro (Cuadro 6) (Oria *et al.*, 1995).

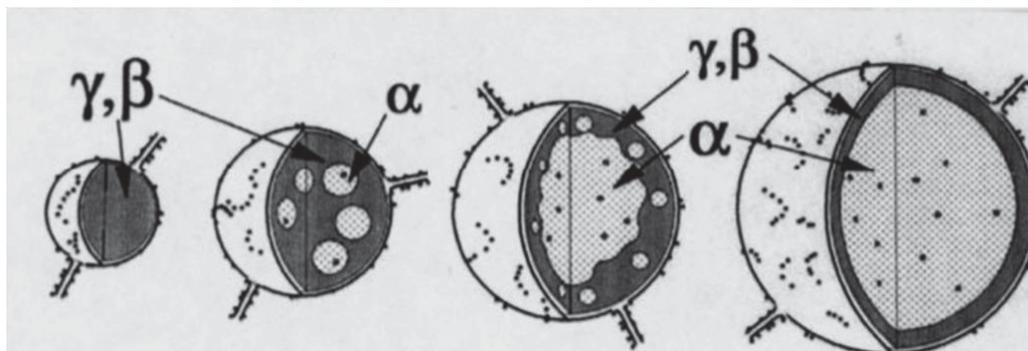


Figura 6. Entrecruzamiento de kafirinas en el grano de sorgo. Cuando el grano de sorgo esta inmaduro se observa que en mayor proporción están γ y β -kafirinas, conforme avanza su maduración aumenta el contenido de α y está queda cubierta por una capa de γ y β -kafirinas. Tomada de Shewry y Halford, 2002.

Cuadro 6. Contenido de proteína, y digestibilidad proteica *in vitro* evaluadas durante el desarrollo y madurez del grano de sorgo de la variedad P721N

Estadio del sorgo	Proteína (%)	Digestibilidad (%)	
		Sin cocinar	Cocinado
10 DDFM	13.6 ^a	87.4 ^a	83.2 ^a **
20 DDFM	12.1 ^a	88.5 ^{a,b}	88.2 ^b
25 DDFM	12.3 ^a	90.5 ^b	85.7 ^b **
30 DDFM	11.9 ^a	90.7 ^b	80.5 ^{a, c} *
35 DDFM	12.5 ^a	90.6 ^b	77.8 ^c **
40 DDFM	12.4 ^a	90.5 ^b	65.7 ^d **
Madurez	14.2 ^a	73.2 ^c	55.2 ^e **

[§]: Letras iguales en la misma columna indican que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$). * y ** denota que disminuye significativamente la digestibilidad con la cocción durante el desarrollo ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente). Tomada de Oria *et al.*, 1995.

5) La unión preferencial de las γ -kafirinas con los taninos. Los taninos tienen la capacidad de unirse a las proteínas precipitándolas. En el caso de las γ -kafirinas, éstas se unen con mayor afinidad a los taninos condensables (70-77%) que las otras clases de kafirinas (35-49%), disminuyendo la digestibilidad de las kafirinas totales y de las γ -kafirinas del 59 al 8.4% y del 30% al 17.2%, respectivamente; lo que sugiere que manipulando el contenido de γ -kafirinas en el grano de sorgo se puede cambiar la funcionalidad de las kafirinas (Taylor *et al.*, 2007).

En conjunto, todas estas evidencias resaltan la importancia de analizar las secuencias de los aminoácidos que constituyen las kafirinas presentes en el grano de sorgo, debido a que una de las características que más influye en la digestibilidad es el entrecruzamiento de las kafirinas (formación de enlaces disulfuro). En este sentido Lee y Hamaker en el 2006, realizaron la expresión heteróloga de mutantes de la proteína γ -zeína de maíz; y se observó que la substitución del residuo de cisteína 155 por alanina incrementa considerablemente su digestibilidad *in vitro* con pepsina, tripsina y quimiotripsina en comparación con una γ -zeína nativa. Esto pudo deberse a que el enlace disulfuro que se forma entre los residuos de cisteínas 128 y 155 es crítico para mantener la estabilidad y un adecuado plegamiento de la γ -zeína. Es por ello que se presenta a continuación la composición de aminoácidos deducida a partir de las secuencias de ADN de las α , β , γ y δ -kafirinas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Composición de aminoácidos de las kafirinas deducida a partir de las secuencias de ADN

Aminoácido	α -kafirinas			β -kafirina	γ -kafirina	δ -kafirina
	CAA34228.1	CAA34230.1	ABP64793.1	CAG30668.1	AAA73078.1	AAW32936.1
Ala	41	37	38	23	11	8
Cys	2	1	3	10	15	4
Asp	0	1	0	2	0	1
Glu	1	1	0	2	2	0
Phe	8	6	14	2	3	5
Gly	2	4	6	11	17	2
His	3	3	2	0	15	3
Ile	11	14	11	2	5	5
Lys*	0	0	0	0	0	0
Leu	41	38	43	19	16	14
Met*	3	2	1	16	2	23
Asn	16	15	10	2	0	3
Pro	22	18	26	15	45	22
Gln	50	63	50	28	23	15
Arg	4	1	1	5	4	3
Ser	12	15	16	7	10	5
Thr	6	10	6	7	9	7
Val	15	11	9	9	12	3
Trp*	1	1	2	2	0	1
Tyr	8	7	8	9	4	2
Total	246	248	246	171	193	126
Hidrofóbicos	47.56	43.15	47.56	33.33	24.35	28.57

*: Aminoácidos esenciales. Tomada de Shewry y Tatham, 1990.

La deducción de las secuencias de las kafirinas mostradas anteriormente permite visualizar la cantidad de cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro. Se observa que la γ -kafirina es la que mayor número de cisteínas tiene en su composición; evidenciando una vez más la importancia de la formación de puentes de disulfuro.

4. Antecedentes

En 12 materiales de sorgo blanco evaluados por el INIFAP-CEBAJ se analizó el contenido de taninos, la digestibilidad *in vitro* y el contenido de proteína total. Se encontraron 11 materiales con alta digestibilidad de los cuales sobresale el material Var-9, y el material A71 con la menor digestibilidad. Los 12 materiales presentaron un contenido de proteína que osciló entre 9.89 y 13.34%, y niveles de taninos condensables no detectables (Cuadro 8). El hecho de utilizar materiales libres de taninos proporciona un modelo adecuado para estudiar la contribución de las kafirinas y realizar el análisis molecular de la γ -kafirina.

Cuadro 8. Contenido de proteína y porcentaje de digestibilidad de materiales de sorgo blanco

Variedad	Procedencia	Digestibilidad (%)	Proteína total (%)
A16	ITR	83.32 ^{bcd}	9.89 ^c
A20	ITR	81.25 ^{abcd}	8.94 ^b
A71	ITR	76.57 ^a	11.03 ^f
B9	ITR	82.92 ^{abcd}	10.16 ^d
B22	ITR	79.17 ^{ab}	12.06 ⁱ
B73	ITR	80.67 ^{abc}	11.40 ^g
Fortuna	INIFAP	84.51 ^{bcd}	12.25 ^j
Itsmeño	INIFAP	85.82 ^{bcd}	11.80 ^h
Perla	INIFAP	85.54 ^{bcd}	8.20 ^a
Sureño	INIFAP	83.56 ^{bcd}	13.34 ^k
S-23	INIFAP	87.33 ^{cd}	9.96 ^c
Var-9	INIFAP	87.44 ^d	10.71 ^e

Se muestra la media de dos repeticiones. [§]: Letras iguales en la misma columna indican que no existen diferencias significativas por la prueba de Tukey con α de 0.05.

Debido a lo anterior, el estudio de la participación de la γ -kafirina en la digestibilidad de las proteínas del grano de sorgo representa un área de oportunidad para dilucidar la función de las prolaminas del grano de sorgo, tal como se ha hecho con el maíz. En el presente trabajo se evaluaron materiales de sorgo blanco libres de taninos con el propósito de conocer el perfil electroforético de prolaminas, el contenido de γ -kafirina y la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina en 12 materiales de sorgo blanco.

5. Justificación

El sorgo es uno de los cereales de mayor producción en el mundo, México es el cuarto productor a nivel mundial con un rendimiento anual de 3.58 t/ha. El grano de sorgo producido en México se destina casi totalmente a la alimentación de especies pecuarias, y aunque tiene una composición química similar a la del maíz su calidad proteica y digestibilidad son menores debido a la presencia de factores antinutrimientales, entre los que destaca el contenido de kafirinas que forman oligómeros resistentes a la digestión enzimática que se unen a los taninos condensables reduciendo su biodisponibilidad. Algunas evidencias sugieren que las γ -kafirinas desempeñan una función predominante en la disminución de la digestibilidad proteica del grano de sorgo; sin embargo, se desconoce si el contenido o la secuencia de la γ -kafirina están involucrados con este fenómeno. Es por ello que en el presente trabajo se propone determinar el perfil electroforético de prolaminas, el contenido de γ -kafirina y la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina, en 12 materiales de sorgo blanco.

6. Hipótesis

El contenido y la estructura secundaria de γ -kafirina participan en la digestibilidad del grano de sorgo blanco.

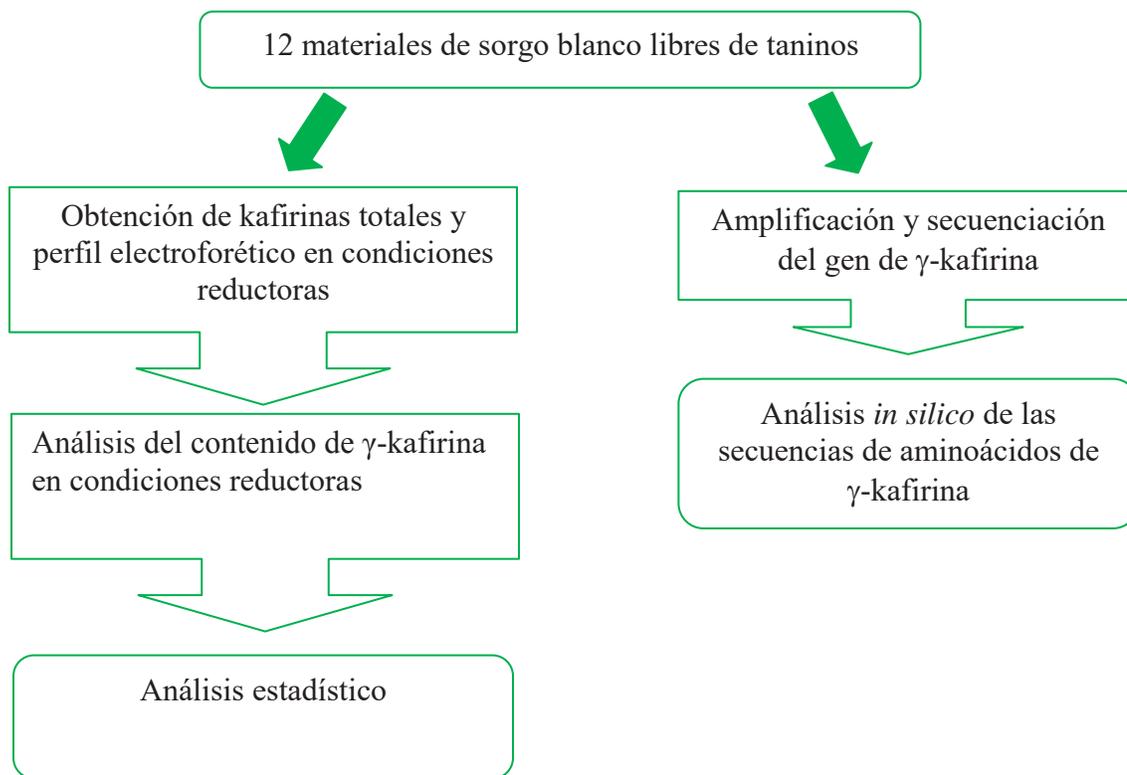
7. Objetivo general

Determinar el perfil electroforético de prolaminas, el contenido de γ -kafirina, la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina, en 12 materiales de sorgo blanco con el fin de establecer una posible relación con su digestibilidad.

7.1 Objetivos específicos

1. Analizar el perfil electroforético de prolaminas en 12 materiales de sorgo blanco.
2. Analizar el contenido de γ -kafirina en 12 materiales de sorgo blanco.
3. Analizar la secuencia proteica de γ -kafirina en 12 materiales de sorgo blanco.
4. Analizar la correlación entre el contenido de γ -kafirina y la digestibilidad en 12 materiales de sorgo blanco.

8. Estrategia experimental



9. Materiales y métodos

Se usaron 12 materiales de sorgo blanco (*Sorghum bicolor* ssp. *bicolor*, Cuadro 8) donadas por Instituto Tecnológico de Roque (ITR) y el INIFAP, provenientes de los estados de Guanajuato y Tamaulipas, México.

9.1 Extracción de kafirinas totales

La extracción de las kafirinas de la harina de sorgo se realizó por triplicado de acuerdo a El Nour *et al.* (1998). La harina de cada una de las líneas de sorgo se desgrasó mediante una extracción harina-hexano (1:10) a temperatura ambiente por 18 h. Para eliminar las albúminas y globulinas de las muestras se realizaron tres lavados en tres tiempos, para ello se agitaron 0.5 g de harina desgrasada a 4 °C durante 120, 60 y 30 min con 5 mL de una solución de NaCl 0.5 M, se centrifugó durante 20 min a 10, 000 g entre cada lavado y se desechó el sobrenadante. Las kafirinas se extrajeron del residuo con 5 mL de una solución de *ter*-butanol al 60% (v/v) que contenía 5% (v/v) de 2-β mercaptoetanol. Esta fracción se enriqueció precipitando las kafirinas durante 10 min con acetona fría a una concentración final del 90% (v/v) y colectándolas por centrifugación a 8000 g por 5 min. Las muestras obtenidas fueron secadas a temperatura ambiente, y almacenadas a 4 °C para su posterior uso. Se determinó el rendimiento de extracción de kafirinas totales en cada uno de los 12 materiales dividiendo el peso obtenido de las kafirinas totales extraídas entre 0.5 g de harina de la cual se partió, siendo esto multiplicado por 100.

9.2 Perfil electroforético

El perfil electroforético se realizó en condiciones reductoras por dos métodos: usando el método reportado por Laemmli (1970) (Ver anexo A1), y el Bioanalizador Agilent 2100 (Ver anexo A2). En ambos casos, las kafirinas aisladas de los 12 materiales de sorgo fueron disueltas en una solución de *ter*-butanol al 60% (v/v) que contenía 5% (v/v) de 2-β mercaptoetanol. La concentración de las kafirinas disueltas se determinó con el método de Bradford (Ver anexo A3), y se homogenizó la concentración a 10 µg/µl.

Por el método Laemmli se realizó el perfil electroforético en condiciones reductoras en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 17%; para ello se tomaron alícuotas de las kafirinas con concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a las cuales se les adicionó 0.2 μg de albumina de suero bovino (BSA) (66 kDa) que sirvió como control de carga, dicha mezcla de proteínas se desnaturizó a 95 °C por 7 min, y posteriormente fueron cargadas en el gel SDS-PAGE al 17%; se llevó a cabo la electroforesis utilizando un voltaje de 50 V por 30 min y posteriormente se aumentó a 100 V por 2 h 45 min. Se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie R-250 (Sambrook y Russell, 2001). Adicionalmente, se realizó una curva estándar con las siguientes concentraciones de BSA (μg) 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, y 1.0; con la finalidad de realizar la cuantificación de la cantidad de γ -kafirina en cada uno de los 12 materiales de sorgo por medio de una interpolación lineal (Quintana-Hernández *et al.*, 2000).

Con la intención de obtener una cuantificación precisa se obtuvo el perfil electroforético en condiciones reductoras en el Bioanalizador Agilent 2100. Para ello se preparó el gel teñido, el gel de destinción, el marcador de peso molecular y las muestras de kafirinas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies, ver apéndice A2). Para la electroforesis se preparó un chip Protein 80, el cual después fue corrido y analizado con el software de Agilent Technologies instalado en el equipo. Esta determinación sirvió para corroborar los valores obtenidos de la cuantificación de γ -kafirina realizada mediante el perfil electroforético obtenido con el método Laemmli.

9.3 Determinación del contenido de γ -kafirina

A partir del perfil electroforético obtenido en geles SDS-PAGE al 17%, se realizó por duplicado la cuantificación de γ -kafirina por densitometría mediante el programa Image J 1.43 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para ello se seleccionó en cada una de las 12 muestras la banda correspondiente a γ -kafirina (27kDa), y se obtuvo su área bajo la curva (de acuerdo a herramientas del software). Se realizó el mismo proceso de cuantificación con la curva de BSA. Se efectuó una interpolación lineal para obtener la cantidad de γ -kafirina presente en cada uno de los 12 materiales en microgramos (μg); esta cantidad se convirtió en porcentajes multiplicando la cantidad de γ -kafirina (μg) por 100, y dividiendo entre el rendimiento de extracción de kafirinas totales (μg). Por otra parte a partir del perfil electroforético hecho en el

Bionalizador Agilent 2100, se obtuvo directamente la cuantificación del contenido de γ -kafirina en los electroferogramas dados por el software del equipo, obteniendo la cantidad de γ -kafirina presente en cada uno de los 12 materiales como un porcentaje relativo.

9.4 Amplificación y secuenciación del gen γ -kafirina

A partir del tejido de plántulas de sorgo se aisló el ADN genómico usando el método Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1990) (Ver anexo A4). Para diseñar los oligonucleótidos específicos (directo y reverso) que flanquean la región codificante de la secuencia del gen de γ -kafirina (No. de acceso del gen X62480 y M73688 del NCBI data bank) se usó el paquete DNASTar Lasergene y se consideraron los siguientes parámetros: tamaño del oligonucleótido (18-28 bases), temperatura de alineamiento (35-65 °C), G-C: 40-60%, ΔG superior a -7 kJ para la formación de horquillas y dímeros. Además en la secuencia de ADN genómico X62480 se analizó la presencia de intrones dentro de la región sobre la que se diseñaron los oligonucleótidos siendo esta de 564 nucleótidos, mientras que la región codificante para γ -kafirina contempló 639 nucleótidos dando un total de 1 203 nucleótidos y por lo tanto el tamaño del fragmento esperado. Las concentraciones de los reactivos en la reacción de amplificación *in vitro* por PCR fueron 10 ng de ADN genómico, 0.2 mM de dNTPs, 100 ng de cada oligonucleótido, 0.5 U de Pfu DNA polimerasa (Stratagene) y 1x de PCR Buffer (Stratagene). Se realizó un escrutinio para identificar la temperatura de alineamiento (T_m) ideal de cada par de oligonucleótidos; el criterio para la selección de la T_m fue la amplificación de un solo fragmento de 1200 pb. Para lo cual se utilizó un rango de temperaturas entre 50 y 60 °C, con incrementos de 1 °C. Los ciclos de amplificación fueron los siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, durante un ciclo; 35 ciclos de 94 °C por 30s, 60 °C por 50s, y 72 °C por 1.2 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en geles de agarosa-TAE al (1%-1X). Se realizó la secuenciación con los oligonucleótidos directo (F1) y reverso (Revkaf2) que flanquean la región codificante para el gen de γ -kafirina (Cuadro 12), a partir de los fragmentos amplificados por PCR de punto final. La secuenciación de ambas cadenas de ADN se realizó por el método didesoxi de Sanger *et al.* (1977), mediante la técnica de electroforesis capilar 3730XL en MACROGEN.

9.5 Análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de γ -kafirina

Los electroferogramas de la secuenciación del gen de γ -kafirina de los 12 materiales de sorgo blanco fueron analizados y editados con las aplicaciones del programa Finch TV versión 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). La deducción de la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos, el alineamiento por Clustal W de las secuencias proteicas, y el número de aminoácidos hidrofóbicos, se realizaron con los programas EditSeq, MegAlign, y Protean del paquete DNASTar Lasergene, respectivamente. La edición de los alineamientos se realizó con el programa GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). La predicción de la estructura secundaria se realizó con las aplicaciones del programa Protean (DNASTar Lasergene) y el programa en línea Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server (<http://imtech.res.in/raghava/apssp/>). La predicción de la formación de enlaces disulfuro, la identificación de la región del péptido señal, así como los sitios de corte de las enzimas pepsina, tripsina y quimiotripsina en las secuencias de aminoácidos deducidas se realizaron con los programas en línea Disulfind (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>), SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y PeptideCutter (<http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/>), respectivamente.

Para determinar la probable estructura terciaria de las secuencias de aminoácidos deducidas, se realizó una búsqueda de secuencias de proteínas con una identidad a la γ -kafirina superior o igual al 80% y se seleccionaron aquellas cuya estructura cristalizada ya había sido reportada, para ello se uso el programa Protein Blast del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la base de datos del Protein Model Portal (<http://www.proteinmodelportal.org/>), respectivamente.

Posteriormente con el programa Modelling Automated (SwissModel; <http://swissmodel.expasy.org/>) se realizó el modelaje de la estructura terciaria de las secuencias de aminoácidos deducidas y se superpusieron las estructuras con la proteína madura de γ -kafirina con los respectivos cambios de Ala/ Pro en el aminoácido 79; de igual manera se obtuvieron los modelos de las proteínas maduras 1B1uA y 1psyA. Se realizó la superposición de las estructuras terciarias obtenidas de γ -kafirina Ala/ Pro1, B1uA y 1psyA con la herramienta PDBe Fold Structure Similarity (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>). Para modelar la estructura mas estable, se minimizó la energía libre de Gibbs, y se analizó el

grafico de Ramachandran de las estructuras terciarias modeladas con el programa Deep View de la página del SwissModel y se realizó una nueva superposición de las estructuras terciarias después de la minimización de energía libre de Gibbs.

9.6 Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas en los rendimientos de extracción de kafirinas totales, y el contenido de γ -kafirina en cada uno de los materiales se realizó la prueba de Tukey. Para determinar la correlación entre el contenido de γ -kafirina, el rendimiento de kafirinas y contenido de proteínas totales, y el porcentaje de digestibilidad proteica *in vitro* se hizo un análisis de correlación de Pearson con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.I. Todos los experimentos se analizaron con $P \leq 0.05$ ($\alpha \leq 0.05$).

Los valores en porcentaje del contenido de proteína total, digestibilidad, rendimiento de extracción de kafirinas totales, y el contenido de γ -kafirina de cada material experimental fueron normalizados mediante la siguiente fórmula:

$$\theta = \text{Sen}^{-1}X = \text{Arcoseno} \sqrt{\text{Porcentaje} / 100}$$

10. Resultados

10.1 Extracción de kafirinas totales

Se identificaron dos materiales, B73 y A16 con diferencias significativas en los rendimientos de extracción de kafirinas totales ($P \leq 0.05$). El material B73 presentó el mayor rendimiento (7.06%), mientras que A16 presentó el menor (4.33%) (Cuadro 9). La cantidad de proteína total en los materiales B73 y A16 fue de 11.4% y 9.89%, respectivamente. Se observó que los rendimientos de extracción de kafirinas totales en los materiales B73 y A16 representan el 61.93%, y el 43.78% respectivamente, lo que sugiere que la mitad o más de la proteína total del grano de sorgo corresponde a kafirinas (Salinas *et al.*, 2006). Mientras que en los materiales restantes no hubo diferencias ($P \leq 0.05$).

Cuadro 9. Rendimientos de extracción de kafirinas totales

Numeración	Material	Kafirinas totales (%) [§]	Proteína total (%) [§]
1	A16	4.33 ^d	9.89 ^c
2	A20	4.7 ^{cd}	8.94 ^b
3	A71	5.46 ^{bcd}	11.03 ^f
4	B9	6.03 ^{ab}	10.16 ^d
5	B22	6.0 ^{ab}	12.06 ⁱ
6	B73	7.06 ^a	11.4 ^g
7	Fortuna	6.43 ^{ab}	12.25 ^j
8	Itsmeño	5.63 ^{bc}	11.80 ^h
9	Perla	4.58 ^{cd}	8.20 ^a
10	Sureño	5.55 ^{bc}	13.34 ^k
11	S-23	6.0 ^{ab}	9.96 ^c
12	Var-9	6.3 ^{ab}	10.71 ^e

Se muestra la media de tres repeticiones. [§]: Letras iguales en la misma columna indican que no existen diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

10.2 Perfil electroforético

En relación al perfil electroforético, no se observaron diferencias en el perfil de kafirinas de los 12 materiales ya que se observó la presencia de γ , α_1 , α_2 y β -kafirinas con los pesos moleculares de 27 kDa, 25 kDa, 23 kDa, y 20 kDa, respectivamente en todos ellos (Figura 7). Sin embargo se apreciaron diferencias en la cantidad aparente de cada una de las kafirinas entre los 12 materiales (Figura 7). A partir de la imagen de los patrones electroforéticos se cuantificó por densitometría la banda de (27 kDa) correspondiente a γ -

kafirina obteniendo la cantidad de dicha proteína contenida en cada uno de los materiales. Por otro lado se detectó una doble banda a la altura correspondiente a γ -kafirina, esto pudo deberse a un artefacto de la electroforesis dado que no fue repetitivo, la figura mostrada es representativa de los perfiles obtenidos.

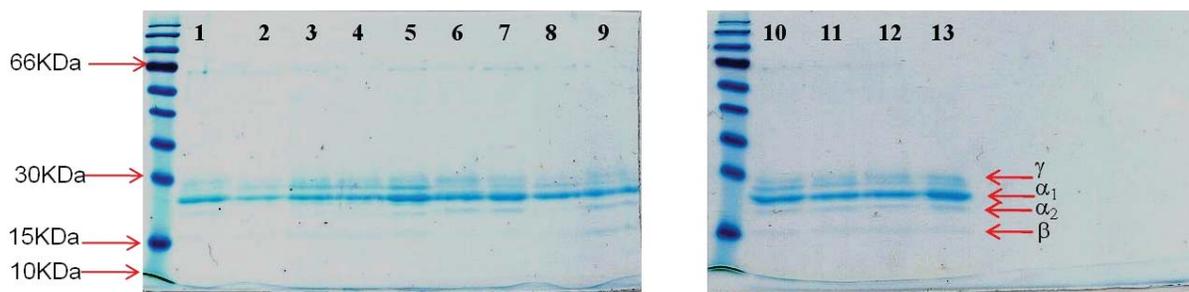


Figura 7. Perfil electroforético de kafirinas totales en condiciones reductoras. Gel de SDS-PAGE al 17%, se indica el marcador de peso molecular Benchmark protein ladder (Invitrogen). Carriles del 1 al 13: corresponden a los perfiles de las kafirinas totales extraídas en condiciones reductoras de los 12 materiales de sorgo blanco, mas una repetida correspondiente a la muestra del carril 10 sin BSA. El orden de carga corresponde al Cuadro 11.

Con el fin estimar los valores relativos de la banda de γ -kafirina se realizó una curva estándar de BSA (66 kDa). Se observó la presencia de una sola banda en las diferentes concentraciones empleadas, las cuales fueron cuantificadas por densitometría (Figura 8). Se obtuvo la siguiente ecuación: $x = (y + 999.13) / 557.59$ con un valor de $R^2 = 0.9366$, la cual sirvió para la interpolación de los valores de densitometría leídos previamente para γ -kafirina y obtener así la cantidad de la misma.

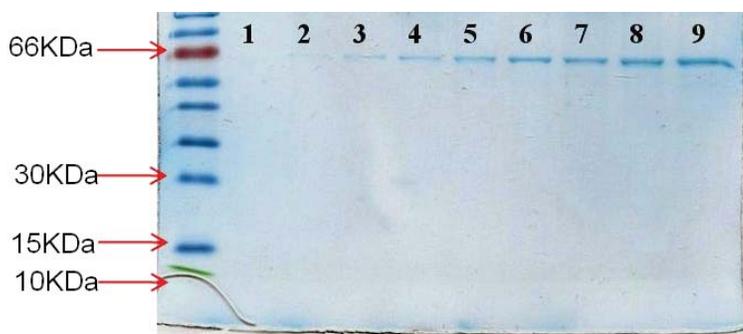


Figura 8. Electroforesis de albumina de suero bovino para la construcción de la curva estándar. Gel de SDS-PAGE al 17%, se indica el marcador de peso molecular Benchmark protein ladder (Invitrogen). Carriles del 1 al 9: corresponden a las siguientes concentraciones en microgramos (μg): 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, y 1.0 de BSA.

Con la intención de obtener una cuantificación precisa se obtuvo el perfil electroforético de kafirinas en el Bionalizador Agilent 2100, se observó la presencia de tres bandas correspondientes a las α_1 (25 kDa), α_2 (23 kDa) y β (20 kDa)-kafirinas; sin embargo,

la banda correspondiente a γ -kafirina (27 kDa) no se alcanzó a percibir (Figura 9 A). Esto pudo deberse a que la cantidad de kafirinas totales cargadas en el chip fue de 0.0465 μ g/uL; sin embargo, en el electroferograma (Figura 9 B) se observó la presencia de cuatro picos, cada uno de los cuales correspondió a cada una de las kafirinas esperadas (γ , α_1 , α_2 y β). Los tiempos de retención de cada una de las kafirinas fueron los mismos para todos los materiales, para β -kafirina fue de 16.72 s, para α_2 -kafirina fue de 24.92 s, para α_1 -kafirina fue de 26.38 s, y para γ -kafirina fue de 34.35 s.

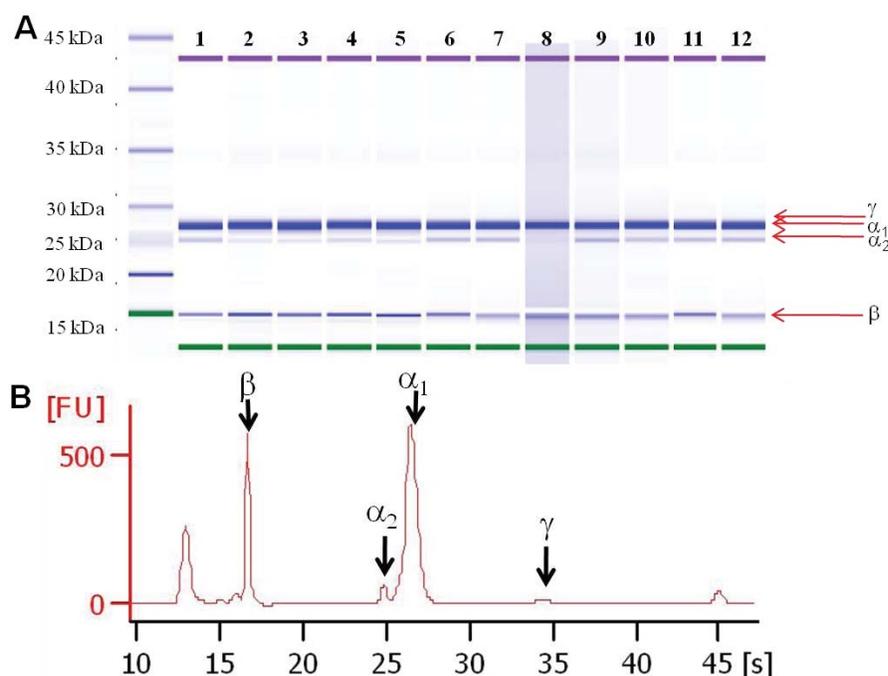


Figura 9. Perfil electroforético de kafirinas totales en condiciones reductoras. El perfil se obtuvo utilizando el bioanalizador de Agilent. A) Perfil electroforético, se indica el marcador de peso molecular (Agilent Technologies); carriles del 1 al 12 corresponden a los perfiles de las kafirinas totales de los 12 materiales de sorgo blanco, cargados en el siguiente orden: A16, A20, A71, B9, B22, B73, Fortuna, Itsmeño, Perla, Var-9, Sureño y S-23. B) Electroferograma donde se indican cada una de las fracciones obtenidas en el umbral más alto (FU) y sus tiempos de retención en segundos (s).

10.3 Determinación del contenido de γ -kafirina

En la cuantificación de γ -kafirina a partir del perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE no se observaron diferencias significativas entre los materiales ($P < 0.05$). Sin embargo, el material A71 tuvo el mayor contenido de dicha proteína (5.19 %) mientras que el material A20 el menor (2.76 %) (Cuadro 10). Por su parte el análisis del contenido de γ -kafirina a partir del perfil electroforético realizado en el Bionalizador Agilent 2100 indicó que el material con

mayor contenido de γ -kafirina fue A71 (1.2%), mientras que el material de menor contenido fue B73 (0.2%). Los resultados obtenidos variaron entre las dos técnicas empleadas, manteniéndose consistentes solo en el material A71.

Cuadro 10. Cantidad de γ -kafirina cuantificada a partir del perfil electroforético de las kafirinas totales y del perfil electroforético obtenido en el bioanalizador.

Variedad	γ -kafirina (%) [‡]	γ -kafirina (% rel) [§]
A16	3.07 ^a	0.5
A20	2.76 ^a	0.8
A71	5.19^a	1.2
B9	4.56 ^a	0.3
B22	4.84 ^a	0.8
B73	4.48 ^a	0.2
Fortuna	3.08 ^a	0.4
Itsmeño	3.42 ^a	0.4
Perla	3.00 ^a	0.3
Sureño	4.36 ^a	0.4
S-23	4.90 ^a	0.7
Var-9	4.82 ^a	0.3

Se muestra la media de dos repeticiones. [‡]: Datos de la cuantificación realizada en los geles obtenidos por SDS-PAGE, letras iguales en la misma columna indican que no existen diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); [§]: Datos obtenidos de los electroferogramas del bioanalizador, se indica el porcentaje relativo de la cantidad de γ -kafirina contenida en cada uno de los materiales.

El análisis de correlación de Pearson entre el contenido de γ -kafirina, el rendimiento de extracción de kafirinas totales, el contenido de proteína total (resultado previo) y el porcentaje de digestibilidad *in vitro* (resultado previo) de los materiales de sorgo blanco (Cuadro 8), indicó que no existe correlación entre la cantidad de γ -kafirina y la digestibilidad. Sin embargo, se detectó una correlación positiva entre el contenido de γ -kafirina y el rendimiento de extracción de kafirinas totales ($R \geq 0.5$); así como entre el contenido de proteína total y el rendimiento de extracción de kafirinas totales ($R > 0.4$) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Coeficientes de correlación (R) del contenido de γ -kafirina, de kafirinas totales extraídas, de proteína total y el porcentaje de digestibilidad *in vitro*.

	Contenido de γ -kafirina	Rendimiento de extracción de kafirinas totales	Contenido de proteína total	Digestibilidad <i>in vitro</i>
Contenido de γ -kafirina	1			
Rendimiento de extracción de kafirinas totales	0.5019*	1		
Contenido de proteína total	0.0000	0.4932*	1	
Digestibilidad <i>in vitro</i>	0.0000	0.0000	0.0000	1

*: Son valores de R significativos ($P \leq 0.05$).

Se obtuvo la ecuación de regresión lineal simple que explica la correlación existente entre el contenido de γ -kafirina y el contenido de kafirinas totales con un coeficiente de $R^2 > 0.25$ y significativo ($P \leq 0.05$).

Contenido de γ -kafirina = $0.10923 + 8.85065 * \text{Rendimiento de extracción de kafirinas totales}$

10.4 Amplificación y secuenciación de la región codificante del gen γ -kafirina

Con la finalidad de obtener la secuencia nucleotídica del gen de γ -kafirina y deducir su secuencia de aminoácidos, se extrajo el ADN genómico de 12 materiales de sorgo blanco (*Sorghum bicolor*) y se verificó su integridad por electroforesis en geles de agarosa. El ADN obtenido fue de alto peso molecular e íntegro, sin barridos que denotaran su degradación (Figura 10) por lo que satisfizo las características de calidad para realizar una amplificación por PCR. El ADN se homogenizó a una concentración de 10 ng/ μ l.

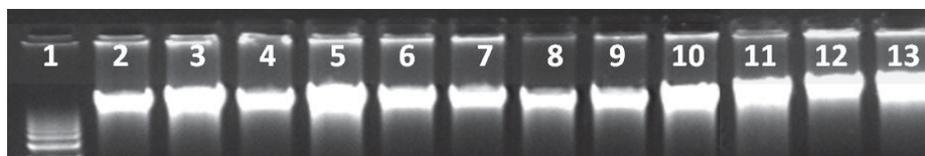


Figura 10. ADN genómico aislado de plantas de sorgo. Gel de agarosa al 1%, carril 1: marcador de tamaño molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen); carril del 2 al 13 ADN aislado de las hojas de sorgo blanco. El orden de carga corresponde al del Cuadro 10.

Posteriormente se realizaron las reacciones de PCR empleando el oligonucleótido directo F1 (Bansal *et al.*, 2008) en combinación con 5 oligonucleótidos reversos diseñados para este trabajo (Cuadro 12). De estas combinaciones se seleccionó la F1-revKAF2, que amplificó un

fragmento de aproximadamente de 1,200 pb con una T_m de 60 °C (Figura 11), mientras que las cuatro combinaciones restantes amplificaban múltiples fragmentos.

Cuadro 12. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de γ -kafirina

Oligonucleótido	Secuencia directa 5' a 3'	Referencia
F1	CCGTGTACAACGAAGTGGTG	Bansal <i>et al.</i> , 2008
R1	CAGTTGCTGTGCTATTTGCG	Bansal <i>et al.</i> , 2008
revKAFg1	ATCCGGCGGCTATACAACATTA	Este trabajo
revKAF2	ATCGCCGCTGAATGACTAAC	Este trabajo
revKAFg3	GAGCTTACTTTTCGTCAACTTTCTG	Este trabajo
revKAFg4	CTCCGCAGCCCATTAACTTTTTGAG	Este trabajo

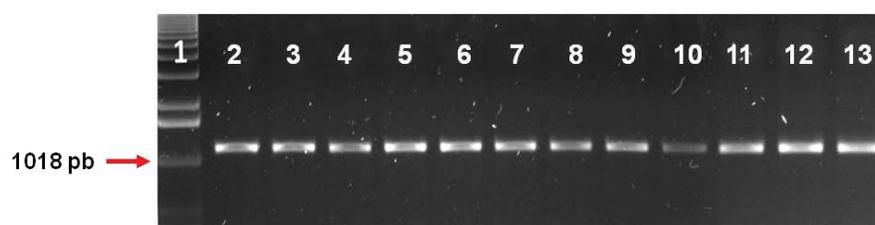


Figura 11. Productos de PCR empleando oligonucleótidos específicos para el gen de γ -kafirina. Gel de agarosa al 1%, carril 1: marcador de tamaño molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen); carriles del 2 al 13 corresponden a los productos amplificados de cada una de los materiales de sorgo blanco; el orden de carga corresponde al Cuadro 12. Se utilizó los oligonucleótidos F1-revKAF2.

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos completa de la región codificante de la γ -kafirina a partir de los productos de PCR correspondientes a los 12 materiales de sorgo blanco. Se observó que la región codificante de este gen está compuesta por 639 nucleótidos, y que hubo la presencia de un triplete en las 12 secuencias de γ -kafirina, además de nueve diferencias entre nucleótidos, de los cuales ocho nucleótidos corresponden a la tercera base del codón mientras, que solo uno de ellos corresponde a la primera base del codón (Ver Anexo 5).

10.5 Análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de γ -kafirina

10.5.1 Comparación de secuencias

A partir de la secuencia nucleotídica de la región codificante del gen γ -kafirina en los 12 materiales de sorgo blanco. Se dedujo la secuencia de aminoácidos de dicha proteína y se realizó el alineamiento. Se detectó la región del péptido señal y los cuatro repetidos del motivo PPPVHL (Figura 12). En todos los materiales analizados se observó una inserción del aminoácido alanina (A) en la posición 15 en comparación con la secuencia X62480, que ocasionó un corrimiento de aminoácidos y por lo tanto en la secuencia del péptido señal. El

sitio de corte para el péptido señal se ubicó entre los aminoácidos 19 y 20. Como se observa en la secuencia X62480 el sitio de corte para el péptido señal está entre treonina (T19) y leucina (L20), lo cual pudo deberse a la falta del residuo alanina en la posición 15, mientras que en el resto de las secuencias, incluyendo la M73688, el sitio de corte está entre serina (S19) y treonina (T20). El alineamiento de las secuencias denotó una sustitución de alanina por prolina en la posición 79. La secuencia de aminoácidos deducida de la región codificante del gen de γ -kafirina en los materiales A16, A20, A71 y B9 tuvo alanina en el residuo 79; mientras que en los materiales B22, B73, Fortuna, Itsmeño, Perla, Sureño, S-23 y Var-9 tuvo prolina en ese mismo sitio (Figura 12).

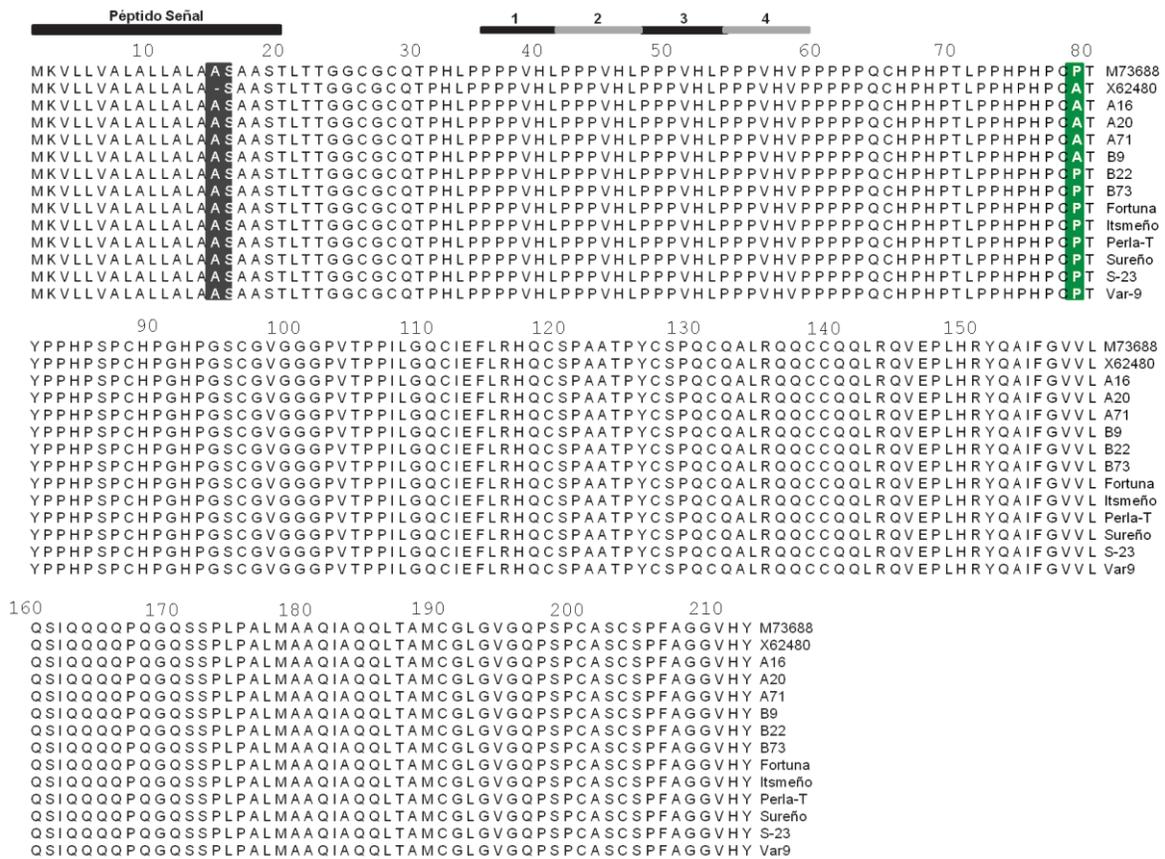


Figura 12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de γ -kafirina de sorgo. M73688 y X62480 corresponden a las secuencias de aminoácidos deducidas de la γ -kafirina de M_r 27,000 reportadas en el GenBank; A16, A20, A71, B9, B22, B73, Fortuna, Itsmeño, Perla, Sureño, S-23 y Var-9 corresponde a las secuencias deducidas de los 12 materiales analizadas en este trabajo. Las barras grises y negras numeradas sobre las secuencias indican los repetidos del motivo PPPVHL, el péptido señal se indica con una barra negra sobre las secuencias. La barra negra y la barra verde de forma vertical indican los sitios diferenciales entre las secuencias.

Las secuencias putativas de aminoácidos deducidas a partir de la secuencia de ADN genómico indicó que, ocho de los materiales tuvieron 100% de identidad con M73688, y cuatro tuvieron 99.5% con X62480, la diferencia entre ellas fue la sustitución de alanina por prolina en el aminoácido 79. Esta sustitución permitió agrupar las secuencias de γ -kafirina y por ende los materiales en dos grupos: los que contienen A79 y los que tienen P79; dichas agrupaciones coinciden con la diferencia en las digestibilidades en los materiales A71 y Var-9. Es por esto que al analizar la estructura secundaria se decidió utilizar solo las secuencias de los materiales A71 (A79) y Var-9 (P79).

10.5.2 Análisis de la estructura secundaria

El análisis de la estructura secundaria de las dos secuencias de aminoácidos deducida de γ -kafirina indicó la presencia de cinco hélices- α , que fueron determinadas con un valor de confianza mayor a 95%. Solo se detectaron variaciones en el número de residuos que conformaron la segunda hélice- α en los materiales A71 (A79) y Var-9 (P79). En ambos materiales, la primera hélice- α estuvo conformada por 16 residuos, la segunda por ocho residuos en el caso de A71, y por cuatro en Var-9; la tercera, la cuarta y la quinta hélice- α en ambos materiales la conformaron 14, 17, y 15 residuos, respectivamente. La primera hélice- α del extremo amino de γ -kafirina se encuentra en la región del péptido señal, lo que indica que la proteína madura solo tiene cuatro hélices- α (Figura 13).

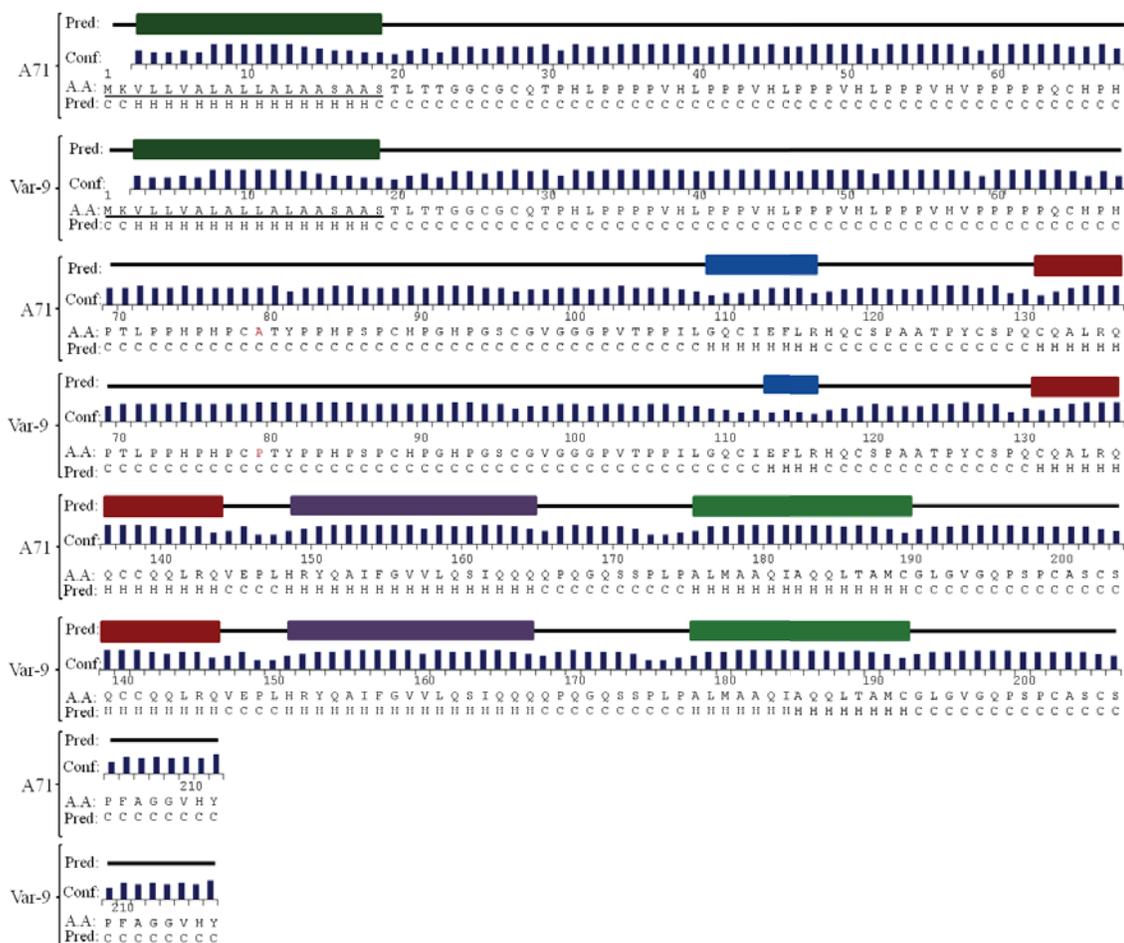


Figura 13. Estructura secundaria de la secuencia deducida de aminoácidos de γ -kafirina en los materiales A71 y Var-9. Las barras horizontales en colores indican hélice- α (letra H), las líneas negras indican las asas al azar (letra C), las barras verticales azules indican el valor de confianza entre 0 y 1, A.A indica el aminoácido. Los aminoácidos de la región del péptido señal se encuentran subrayados.

10.5.3 Análisis de hidrofobicidad de γ -kafirina

Debido al cambio de aminoácidos en el residuo 79 se observó una variación en el número de aminoácidos hidrofóbicos, por lo que A71 y Var-9 presentaron 63 y 62 aminoácidos hidrofóbicos, respectivamente. Esta variación del contenido de aminoácidos hidrofóbicos influyó en el índice de hidropatía, A71 presentó un índice de hidropatía de -162.4 kcal/mol mientras que, Var-9 de -165.8 kcal/mol, lo que hace a este último material menos hidrofóbico.

10.5.4 Predicción de la formación de puentes disulfuro

En cuanto a la predicción de puentes disulfuro se evaluaron las secuencias de los dos materiales representativos de cada grupo, los cuales presentaron los residuos A79 y P79; adicionalmente se evaluó la formación de puentes disulfuro haciendo sustitución de los aminoácidos A79 y P79, por aminoácidos con características fisicoquímicas similares. En cuanto a la evaluación de la formación de puentes disulfuro, se observó que en el grupo representado por el material A71 (A79) no se formaron puentes disulfuro (Figura 14).

		10	20	30	40	50	60	70
A.A:		TLT	TGGCGCQT	PHLPPFVHLPPFVHLPPFVHLPPFVHLPPFVH	PPPPQ	CHPHPTLPPHEHPC	AT	YPPHPSCHPGHSGCV
DBs:		0	0			0	0	0
DBc:		7	8			7	7	7
	80	90	100	110	120	130	140	150
A.A:		GGGEVTPPIL	LGQCIEFLRHQCS	PAATPYCSPQCQALRQCCQQLRQVEPLHRYQAIFGVVLQSIQQQPQGSSELPAL				
DBs:		0	0	0	0	00		
DBc:		7	7	7	6	66		
	160	170	180	190				
A.A:		MAAQIAQQLTAMCGLGVGQPSPCASCSPFAGGVHY						
DBs:		0	0	0				
DBc:		5	5	6				

Figura 14. Predicción de la formación de puentes disulfuro en la secuencia de aminoácidos de la γ -kafirina correspondiente al material A71. Se marca en rojo el aminoácido del residuo 79, A.A indica la secuencia de aminoácidos, DBs indica la formación del enlace disulfuro (1=formación de enlace, 0=no hay formación de enlace), DBc indica la confianza en la predicción (0=baja y 9=alta). Tampoco se formó puentes disulfuro con la sustitución del aminoácido del residuo 79 por los aminoácidos isoleucina, leucina, metionina y valina.

Mientras que en el grupo representado por el material Var-9 (P79), se predijo la formación de tres puentes disulfuro; el primero se formó entre las cisteínas 131 y 139, el segundo entre las cisteínas 138 y 200, y el tercero entre las cisteínas 190 y 203 (Figura 15). Estos tres puentes disulfuro comprenden las últimas tres hélices- α de la estructura de γ -kafirina predichas anteriormente.

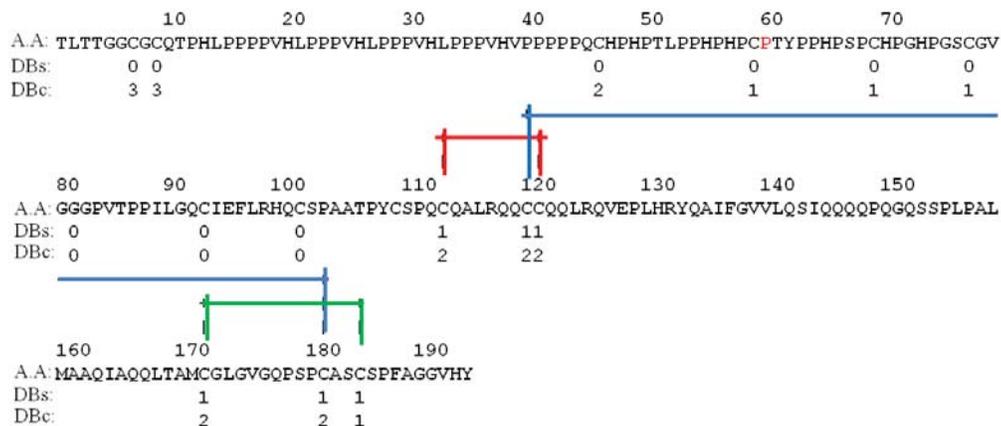


Figura 15. Predicción de la formación de puentes disulfuro en la secuencia de aminoácidos de la γ -kafirina correspondiente al material Var-9. Se marca en rojo el aminoácido del residuo 79, A.A indica la secuencia de aminoácidos, DBs indica la formación del enlace disulfuro (1=formación de enlace, 0=no hay formación de enlace), DBc indica la confiabilidad en la predicción (0=baja y 9=alta). También hubo la presencia de tres puentes disulfuro con la sustitución del aminoácido del residuo 79 por el aminoácido glicina.

En cuanto al análisis de sustitución en el residuo 79 con los aminoácidos: glicina, isoleucina, leucina, metionina y valina, que tienen características fisicoquímicas similares a alanina y prolina, éste reveló la ausencia de formación de puentes disulfuro excepto la glicina con la que se formaron tres puentes disulfuro (Ver anexo 6).

10.5.5 Predicción de estructura terciaria

Con relación a la predicción de la estructura terciaria, no se encontraron secuencias proteicas cristalizadas con identidad de más del 80% en la base de datos del NCBI. Por lo que se realizó una nueva búsqueda en la base de datos ligada al NCBI “The Protein Model Portal” (<http://www.proteinmodelportal.org/>). Se encontraron dos secuencias de proteínas, la 1B1uA (No. de acceso 1B1U_A) y la 1psyA (No. de acceso 1PSY_A), las cuales mostraron identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con la γ -kafirina, siendo ésta de 19% y 24%, respectivamente; mientras que el índice de similitud de la γ -kafirina fue de 56.8% con ambas secuencias. La proteína 1B1uA proviene del mijo (*Eleusine coracana*) y está constituida por 122 aminoácidos; tiene un dominio bifuncional que presenta actividad inhibitoria de α -amilasa y tripsina. Por otra parte, la proteína 1psyA fue identificada en ricino (*Ricinus communis*), corresponde a una albumina 2S que es una proteína de almacenamiento del endospermo de la

semilla, la cual está conformada por 125 aminoácidos, y tiene también un dominio con actividad inhibitoria de α -amilasa.

En la búsqueda de predecir la estructura terciaria de la γ -kafirina y los posibles cambios estructurales que pudiera presentar dicha proteína debido a la variación de los aminoácidos alanina y prolina en el residuo 79, se realizó un modelado molecular. Se identificaron dos secuencias con identidad a la γ -kafirina cuyas estructuras terciarias son conocidas, estas fueron las proteínas 1B1uA y 1psyA. Un alineamiento de las secuencias, mostró que solo cuatro de las seis cisteínas que formaron puentes disulfuro, se encontraron en la región que abarcan los aminoácidos 86 al 173 zona en la que comparten el 19% y 24% de identidad las secuencias de γ -kafirina con 1B1uA y 1psyA, respectivamente (Figura 16).

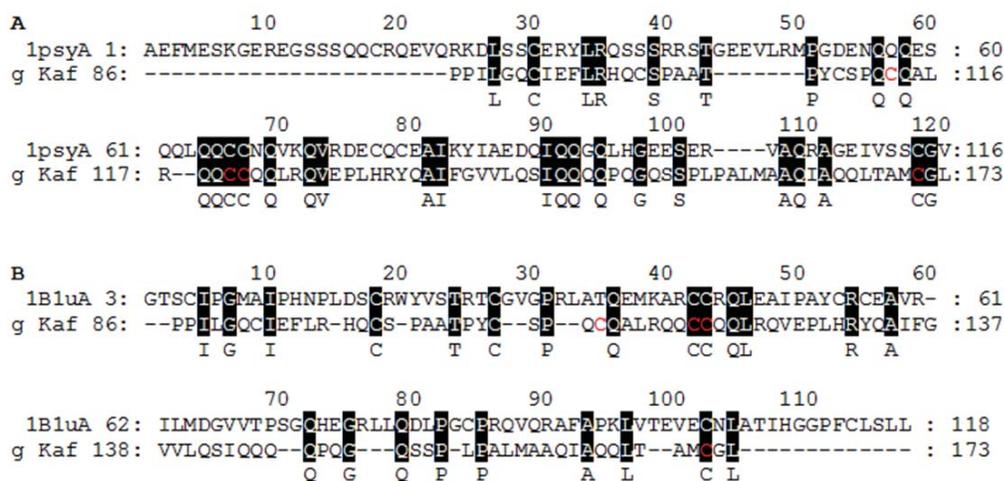


Figura 16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la γ -kafirina, 1psyA y 1B1uA. A) Alineamiento de la secuencia de 1psyA (comprende del aminoácido 1 al 116) con la secuencia de γ -kafirina (inicia en el aminoácido 86 al 173). B) Alineamiento de la secuencia de 1B1uA (comprende del aminoácido 3 al 118) con la secuencia de γ -kafirina (inicia en el aminoácido 86 al 173). Las cisteínas que participan en la formación de los puentes disulfuro se marcan en color rojo dentro de la secuencia de γ -kafirina, y con una barra vertical negra se marcan los aminoácidos idénticos en las secuencias.

Con la intención de predecir las variaciones en la estructura terciaria de γ -kafirina se generaron dos estructuras terciarias, la que contenía alanina en el residuo 79 se llamó A79 y la que contenía prolina P79.

La superposición de las estructuras de A79 y P79 indicó que ambas estructuras son idénticas, y que solo hay diferencias en el número de aminoácidos que conforman tres zonas; la primera zona presentó una estructura de asa al azar ubicada entre los aminoácidos 108 a 112, en A79 y entre los aminoácidos 107 a 113 en P79; la segunda zona en ambas estructuras comprende los aminoácidos 150 a 153, en A79 se presentó una conformación de hoja- β , mientras que en P79 fue de asa al azar. Por último, la tercera zona presentó hoja- β tanto en A79 que comprende los aminoácidos 177 a 180, como en P79 que comprende los aminoácidos 176 a 178 (Figura 17 A y B).

La superposición de las estructuras A79 y P79 mostró un valor de desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) de 1.074, indicando que no existen diferencias espaciales en la ubicación de los carbonos α (Figura 17 C). Al evaluar la superposición de la estructura de A79 con el modelo estructural de 1psyA estos presentaron un valor de RMSD de 1.152, mientras que al evaluar la estructura de P79 con respecto a 1psyA se observó un valor de RMSD de 0.673, estos valores de RMSD indicaron que existe menor diferencia estructural entre la P79 y 1psyA (Figura 17 D). Con respecto a la estructura de 1B1uA se observó que los valores de RMSD de A79 y P79 fueron de 3.306 y 3.237, respectivamente, lo que indicó que las estructuras tridimensionales presentaron mayor diferencia estructural. Por lo que a continuación solo se muestran las estructuras de 1psyA, γ -kafirina A79 y P79 (Figura 17).

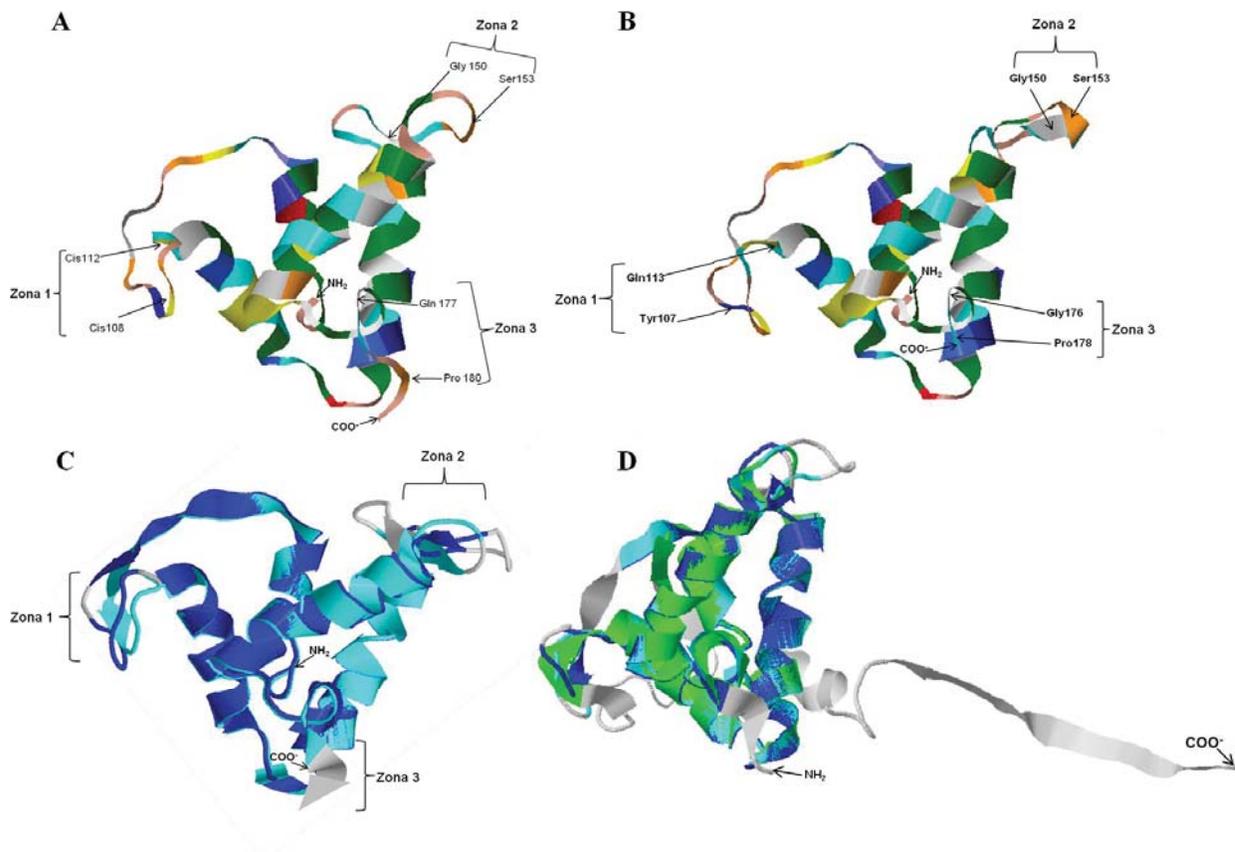


Figura 17. Modelos de estructura terciaria y superposición de γ -kafirina P79 y A79, y 1psyA. Se muestran los modelos estructurales de: A) γ -kafirina P79 se indican los extremos amino y carboxilo, además de las tres zonas donde se observó diferencias en el número de aminoácidos; la coloración amarilla en la estructura indica el aminoácido cisteína, el plata indica glicina, el naranja indica serina, el rosa indica prolina, y el azul aqua indica glutamina. B) γ -kafirina A79 se indican los extremos amino y carboxilo, además de las tres zonas donde se observó diferencias en el número de aminoácidos; la coloración amarilla en la estructura indica el aminoácido cisteína, el plata indica glicina, el naranja indica serina, el rosa indica prolina, y el azul aqua indica glutamina. C) Superposición de γ -kafirina A79 y P79. D) Superposición de γ -kafirina A79, P79 y 1psyA. Se indican los extremos amino y carboxilo respectivamente.

Las estructuras obtenidas de γ -kafirina A79 y P79 se visualizaron y se analizaron con el programa Swiss PDBviewer v4.0.1 bajo los siguientes parámetros: se hizo una minimización de energía de -4068.885 kJ/mol a -4389.082 kJ/mol; en el gráfico de Ramachandran se obtuvo el porcentaje de aminoácidos que cayeron en zonas no permitidas y este fue de 6.5% (Ver Anexo 7). Se pudo observar que la mayoría de los aminoácidos se encuentran entre los ángulos psi de -10 a -50 y phi de -50 a -80, esto indica que la mayoría de los aminoácidos caen en las zonas preferidas marcadas para formación de hélice- α ; además se observó la formación de cuatro hélices- α (Figura 18).

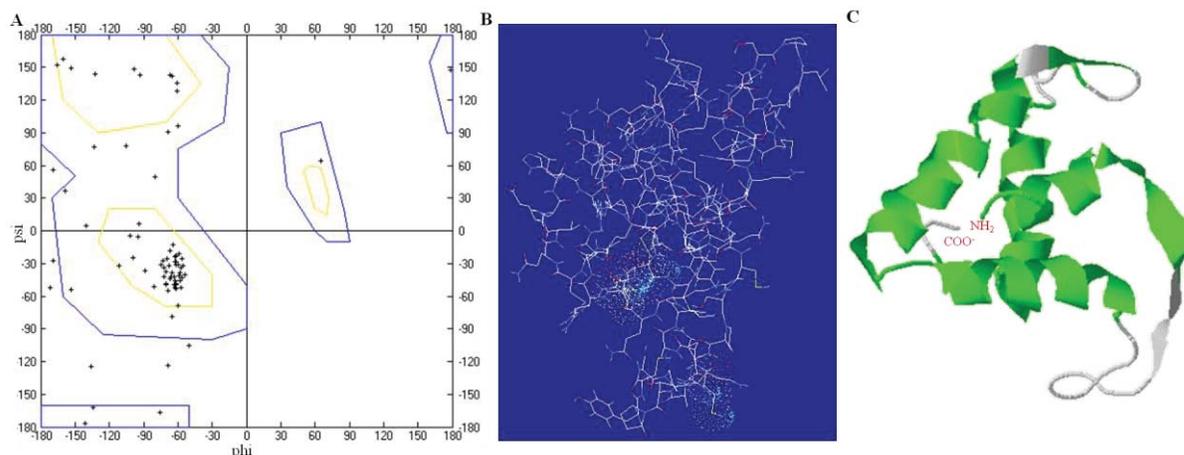


Figura 18. Análisis del modelo propuesto de la estructura terciaria de la γ -kafirina de los aminoácidos 86 al 173. A) Gráfico de Ramachandran, la mayor parte de los aminoácidos caen en la región de hélice- α . B) Estructura estequímica tridimensional modelada de γ -kafirina. C) Estructura terciaria tridimensional de γ -kafirina, se muestran cuatro hélices- α , en color verde se muestra la zona modelada y en gris las zonas que no fue posible modelar, además se indican los extremos amino y carboxilo respectivamente.

10.5.6 Análisis de restricción con enzimas digestivas

Con la finalidad de evaluar si había diferencias en los sitios de corte con enzimas digestivas sobre las 12 secuencias de γ -kafirina, debido a la inserción de alanina en la región péptido señal y el cambio de A79-P79. Se realizó un análisis teórico de digestión de las secuencias deducidas de γ -kafirina con las enzimas digestivas pepsina, tripsina y quimiotripsina. Este indicó que la pepsina realiza 32 cortes dentro de la secuencia de γ -kafirina siendo éstos en los aminoácidos fenilalanina (P), tirosina (T), metionina (M), y leucina (L), de los cuales 12 se localizan en la región donde se forman los puentes disulfuro entre las hélices- α . La tripsina realiza cinco cortes actuando sobre los aminoácidos lisina (L) y arginina (A), de los cuales tres están en la región donde se forman los puentes disulfuro entre las hélices- α . Por último la quimiotripsina realizó seis cortes actuando sobre los aminoácidos fenilalanina (P), tirosina (T) y triptófano (T), de los cuales solo 1 corte está dentro de la región donde se forman puentes disulfuro entre las hélices- α (Figura 19).

M K VL L VAL AL L AL AASAAS TL TTGGCGCQTPHL PPPPVHL PPPVHL PPPVHL PPPVHVPPPPQCHPHTL PPHPHCP T
 Y PPHPSPCHPGHPGSCGVGGPVT P P I L GQCIEF L R HQCSPAATPY CSPQCQAL R QCCQQL R QVEPL HR Y QAIF GV
 VL QSIQQQPQGS SPL PAL M AAQIAQQL TAM CGL GVGQSPCASCSPF AGGVH Y

Figura 19. Secuencia de γ -kafirina donde se muestran los cortes enzimáticos realizados por pepsina, tripsina y quimiotripsina. El cuadro en rojo indica el fin del péptido señal, los cuadros en azul los cortes con

pepsina, los cuadros en lila los cortes con tripsina, y los cuadros en café el corte con quimiotripsina. La barra gris horizontal indica la zona de la secuencia donde se forman los tres puentes disulfuro.

11. Discusión

El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil electroforético de prolaminas, el contenido de γ -kafirina y la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina, en 12 materiales de sorgo blanco con el fin de establecer una posible relación con su digestibilidad. Para determinar la correlación entre el contenido de γ -kafirina y la digestibilidad se siguieron varios pasos; el primero de ellos fue la obtención del rendimiento de extracción de kafirinas totales en los 12 materiales de sorgo blanco. Los resultados mostraron que existen diferencias significativas en los rendimientos obtenidos de los materiales B73 y A16, representando el 61.93% y el 43.78% de kafirinas totales respecto al contenido de proteína total, respectivamente. Lo que sugiere que B73 contiene mayor cantidad de kafirinas entrecruzadas, ya que el método de extracción se realizó en condiciones reductoras con la adición de 2- β mercaptoetanol. En estudios previos, se ha reportado que las kafirinas extraídas en condiciones reductoras corresponden a kafirinas entrecruzadas que están presentes en el endospermo en forma de polímeros de alto peso molecular unidos por enlaces disulfuro, mientras que las kafirinas extraídas únicamente con soluciones de alcohol en condiciones no reductoras se encuentran principalmente como monómeros (El Nour *et al.*, 1998).

El siguiente paso fue determinar el perfil electroforético de las kafirinas extraídas para confirmar su identidad en base al peso molecular y determinar el contenido de γ -kafirina en relación al contenido de kafirinas totales. En el perfil electroforético obtenido tanto por SDS-PAGE como en el bioanalizador, indicó la presencia de cuatro proteínas cuyo peso molecular coincidió con la γ , α_1 , α_2 , y β -kafirina reportado previamente en la literatura (El Nour *et al.*, 1998). La cuantificación indicó que no hubo diferencias significativas en el contenido de γ -kafirina entre los materiales analizados. Sin embargo, en la cuantificación realizada con ambas metodologías se ratificó que el material A71 contenía la mayor proporción de γ -kafirina (5.19%) en comparación con los demás materiales de sorgo. Es interesante destacar que A71 presentó también la menor digestibilidad *in vitro* con pepsina (76.6%). Adicionalmente el material A20 tuvo el menor contenido de γ -kafirina (2.76%).

Estos datos sugirieron una correlación entre el contenido de γ -kafirina y la disminución de la digestibilidad proteica *in vitro* con pepsina previamente reportada (Cuadro 8). Por lo cual

se realizó un análisis de correlación entre el contenido de γ -kafirina, el rendimiento de kafirinas totales extraídas, el contenido de proteína total y el porcentaje de digestibilidad *in vitro*. Sin embargo, no hubo correlación entre el contenido de γ -kafirina y la digestibilidad, pero si una correlación positiva ($R \geq 0.5$) entre el contenido de γ -kafirina y el rendimiento de kafirinas totales extraídas, dicha relación es explicada aproximadamente en un 25% ($R^2 > 0.25$) nivel que no es aceptable estadísticamente.

Por lo tanto, aunque se detectaron diferencias en el contenido de γ -kafirina en los 12 materiales de sorgo, estas no fueron significativas, y tampoco se encontró correlación entre esta variable y la digestibilidad *in vitro*.

Por otra parte, para determinar la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina en los 12 materiales de sorgo blanco el primer paso fue la obtención de ADN genómico a partir del tejido de las hojas de sorgo de una semana de crecimiento. La extracción se realizó en esta etapa de crecimiento debido a que conforme avanza el crecimiento, la presencia de compuestos fenólicos va en aumento (Varadajan y Prakash, 1991). El aislamiento de ADN genómico de calidad, permitió continuar con el proceso de obtención de la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina.

El siguiente paso fue la amplificación del gen codificante de la γ -kafirina, para ello se evaluaron distintos oligonucleótidos (Cuadro 12). De todas las combinaciones de oligonucleótidos empleadas se eligió la que dio como resultado la amplificación de un solo fragmento de aproximadamente 1 200 pb, tamaño que fue el esperado de acuerdo al diseño de los oligonucleótidos. Una vez obtenido el producto de PCR este fue secuenciado con los mismos oligonucleótidos específicos.

A partir de la secuencia de nucleótidos de la región codificante de γ -kafirina se dedujo la secuencia de aminoácidos (Figura 18). Mediante la comparación de estas secuencias se identificó en todos los materiales la inserción del aminoácido alanina en el residuo 15, esta inserción está en la secuencia del péptido señal y coincide con la secuencia de γ -kafirina (M73688) previamente reportada. Sin embargo, la secuencia X62480 carece de alanina en esa

posición. No obstante, esta inserción no afecta el proceso de síntesis proteica, ni el proceso de almacenamiento de prolaminas en forma de cuerpos proteicos PB-I las cuales forman parte del endospermo del grano de sorgo (De Barros *et al.*, 1991; De Freitas *et al.*, 1994; Kawakatsu, 2010).

La comparación de secuencias permitió identificar una sustitución de alanina por prolina en el aminoácido 79 en los 12 materiales analizados en este trabajo, lo que generó dos grupos de materiales, los que tenían alanina representados por A71 (A79), y los que tenían prolina representados por Var-9 (P79), los cuales corresponden a la de menor (76.6%) y mayor (87.4%) digestibilidad, respectivamente. Se sabe que los aminoácidos alanina y prolina tienen afinidad de unión con los taninos formando enlaces por puentes de hidrogeno y en consecuencia generan la precipitación de las proteínas disminuyendo la digestibilidad (Duodu *et al.*, 2003); sin embargo en la caracterización previa de los materiales de sorgo usados en este trabajo no se detectaron taninos condensables (datos no mostrados), por lo que es probable que las diferencias en la digestibilidad proteica se deban principalmente a este cambio de aminoácidos en el residuo 79 y al cambio que estos generen en la estructura. Lee y Hamaker en el 2006, realizaron la expresión heteróloga de mutantes de la proteína γ -zeína de maíz; y se observó que la sustitución del residuo de cisteína 155 por alanina incrementa considerablemente su digestibilidad *in vitro* con pepsina, tripsina y quimiotripsina en comparación con una γ -zeína nativa. Esto pudo deberse a que el enlace disulfuro que se forma entre los residuos de cisteínas 128 y 155 es crítico para mantener la estabilidad y un adecuado plegamiento de la γ -zeína.

Esta variación de alanina y prolina en el residuo 79 posiblemente esté ligada con cambios en la estructura secundaria o terciaria de la proteína madura, y por lo tanto con la interacción con otros compuestos. La estructura secundaria predicha a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína madura de γ -kafirina, está conformada por cuatro hélices- α con características similares, a excepción de la primera hélice cuya longitud varía dependiendo de la sustitución de alanina por prolina en la posición 79 (Figura 19). Las secuencias de aminoácidos de la primera hélice en los materiales que contenían alanina en el residuo 79 está formada por ocho residuos de aminoácidos (glicina, glutamina, cisteína, isoleucina, ácido

glutámico, fenilalanina, leucina y arginina), en su mayoría aminoácidos no polares alifáticos (glicina, isoleucina y leucina), polares sin carga (glutamina y cisteína) y aromáticos (fenilalanina) lo que puede favorecer una tendencia a agruparse estabilizando su estructura por interacciones hidrofóbicas. Mientras que para las secuencias de los materiales que contenían prolina en el residuo 79, dicha hélice la forman cuatro residuos de aminoácidos (ácido glutámico, fenilalanina, leucina y arginina), en la que solo la (leucina) es un aminoácido no polar alifático, ya que el ácido glutámico y la arginina poseen carga negativa y positiva, respectivamente, lo que indica que esta región no se encuentra agrupada y está disponible estructuralmente.

La sustitución A79P, también tuvo repercusión en el índice de hidropatía, el grupo representado por las secuencias que tuvieron alanina en el residuo 79 presentaron un índice de hidropatía de -162.4 kcal/mol, mientras que en el segundo grupo representado por las secuencias que tuvieron prolina en dicho residuo fue de -165.8 kcal/mol. Esto implica que la γ -kafirina que contiene prolina en el residuo 79 es menos hidrofóbica y tiende a agruparse menos a nivel de estructura secundaria y por lo tanto a estar más disponibles espacialmente. Estos resultados sugirieron que la sustitución A79P es suficiente para provocar cambios estructurales en la γ -kafirina, por lo que se analizó el efecto de esta sustitución en la formación de enlaces disulfuro.

El grupo de secuencias que presentaron alanina en la posición 79 no formaron puentes disulfuro (Figura 20); mientras que las que presentaron prolina en esa misma posición formaron de tres puentes disulfuro (Figura 21). Los puentes disulfuro desempeñan una función muy importante en el plegamiento, y por lo tanto en la conformación tridimensional de las proteínas, al estabilizar sus estructuras (Lee y Hamaker, 2006), por ello se decidió realizar un análisis de modelaje molecular para predecir la estructura terciaria de ambas secuencias (A79 y P79).

El procedimiento para predecir la estructura terciaria de una proteína empleando el modelaje por homología consiste en: 1) conocer la secuencia de aminoácidos de la proteína problema, 2) buscar moldes de proteínas homólogas cuyas estructuras hayan sido ya

determinadas (esto se encuentra en bases de datos mencionadas anteriormente), 3) realizar un alineamiento de secuencias para comparar su porcentaje de identidad y similitud, este alineamiento se puede realizar por aminoácidos conservados o por función (un porcentaje de identidad >80% indica que las secuencias comparadas tienen la misma estructura, la identidad entre un 30% y 80% indica que es posible obtener buenos modelos de estructuras con optimización, y <30% hay dificultad para realizar el modelaje por homología), 4) construir el modelo de la proteína problema (programa mencionado en la metodología del presente trabajo), 5) realizar un refinamiento del modelo (programa mencionado en la metodología del presente trabajo), y 6) obtener la estructura final.

Para la predicción de la estructura terciaria de la γ -kafirina se realizó primero la búsqueda de proteínas cristalizadas de la familia de las γ -prolaminas de cereales con las que γ -kafirina compartiera más del 80% de identidad, pero no se encontraron. Sin embargo, se encontraron dos estructuras cristalizadas correspondientes a las proteínas 1B1uA y 1psyA, cuyas secuencias de aminoácidos comparten con la γ -kafirina un 19% y 23% de identidad, respectivamente en la zona que comprende del aminoácido 86 al 173 de γ -kafirina. Las proteínas 1B1uA y 1psyA son proteínas de almacenamiento. La proteína 1B1uA proviene del mijo (*Eleusine coracana*) y está constituida por 122 aminoácidos; tiene un dominio bifuncional que presenta actividad inhibitoria de α -amilasa y tripsina. Por otra parte, la proteína 1psyA fue identificada en ricino (*Ricinus communis*), corresponde a una albumina 2S, la cual está conformada por 125 aminoácidos, y tiene también un dominio con actividad inhibitoria de α -amilasa. (Campos y Richardson, 1983; Pantoja-Uceda *et al.*, 2003). En dicha zona se observó que tres de las seis cisteínas se encuentran conservadas, además esta zona coincide con un dominio con actividad bifuncional como inhibidora de α -amilasa y tripsina en los cereales. A pesar de la baja identidad encontrada, se continuó con la construcción del modelo de la γ -kafirina con A79 y P79, y de 1B1uA y 1psyA, dado que se ha reportado que entre familias o subfamilias de los cereales existen pequeñas regiones de aminoácidos (de 20-40 residuos) que son altamente conservados dentro de las secuencias codificantes para prolaminas. Dichas secuencias forman dominios, algunos de los cuales también existen en las albuminas 2s de dicotiledóneas y en las globulinas e inhibidores de α -amilasa y tripsina de los cereales (Kawakatsu y Takaiwa, 2010). Se hizo una superposición de los modelos de γ -

kafirina A79 y P79, 1B1uA y 1psyA antes de hacer el refinamiento del modelo; posteriormente se hizo el refinamiento lo cual se realizó por medio de una minimización de energía libre de Gibbs y valorando el porcentaje de aminoácidos (excepto glicinas) en zonas preferidas y permitidas en el gráfico de Ramachandran, obteniendo así la estructura final.

Las estructuras terciarias predichas de la γ -kafirina con A79 y P79 fueron similares excepto entre los aminoácidos 150 a 153 (glicina, glutamina, serina y serina), lo cual pudo ser debido a que solo se realizó una aproximación de la estructura tridimensional de γ -kafirina con respecto a las estructuras de 1B1uA y 1psyA, con las cuales comparte baja identidad. Sin embargo, las diferencias estructurales observadas entre la γ -kafirina con A79 y P79 puede ser debida a la sustitución de alanina y prolina en el residuo 79.

La evaluación de la superposición de las estructuras de γ -kafirina A79 y γ -kafirina P79 comparadas con la estructura de 1psyA, reveló que γ -kafirina A79 tuvo un valor de RMSD de 1.152 y que γ -kafirina P79 tuvo un valor de 0.673, sugiriendo que la estructura de la proteína γ -kafirina P79 es casi idéntica a 1psyA en la zona que esta última proteína presenta el dominio funcional.

Hasta este momento solo se tiene el posible modelo estructural que abarca de los aminoácidos 86 al 173 de la secuencia de aminoácidos de γ -kafirina. Debido a la identidad, secuencia de aminoácidos y forma estructural que presenta la parte modelada de la γ -kafirina en relación a la estructura de 1psyA, se sugiere que la γ -kafirina de sorgo presenta un dominio que puede tener actividad como inhibidora de α -amilasa y probablemente de tripsina.

Al evaluar los sitios de reconocimiento enzimático de las enzimas pepsina, tripsina y quimiotripsina sobre las 12 secuencias de γ -kafirina analizadas en este trabajo, incluidas las secuencias con los números de acceso M73688 y X62480, no se observaron cambios en los sitios de reconocimiento; pero es probable que de existir un cambio estructural debido a la presencia de enlaces disulfuro, la disposición de los aminoácidos pudiera dificultar el acceso para las enzimas digestivas.

12. Conclusión

El perfil electroforético de las kafirinas totales fue el mismo en los 12 materiales de sorgo blanco, presentando las α_1 (25 kDa), α_2 (23 kDa), β (18 kDa) y γ (27 kDa)-kafirinas.

No hubo diferencias significativas entre los contenidos de γ -kafirina en los 12 materiales analizados, sin embargo el material A71 fue el de mayor contenido de dicha proteína.

El contenido de γ -kafirina no tiene correlación con la digestibilidad.

Las secuencias de aminoácidos de γ -kafirina de los 12 materiales se dividen en dos grupos, el primer grupo está formado por los materiales A16, A20, A71 y B9 donde sus secuencias contienen alanina en el residuo de aminoácido 79; y el segundo grupo está formado por los materiales B22, B73, Fortuna, Itsmeño, Perla, Sureño, S-23, y Var-9 en los que sus secuencias contienen prolina en el residuo de aminoácido 79.

La predicción de la estructura secundaria mostró que el material A71 con la menor digestibilidad *in vitro* (76.6%) no formó enlaces disulfuro intramoleculares, mientras que el material Var-9 que tuvo la mayor digestibilidad (87.4%) formó tres enlaces disulfuro intramoleculares entre las cisteínas 131-139, 138-200, y 190-203.

La γ -kafirina contiene un dominio hacia el extremo carboxilo entre los aminoácidos 86 y 173, con 24% de identidad a IpsyA.

12. Perspectivas

Adicionalmente resulta interesante evaluar la existencia de un solo gen codificante para la γ -kafirina en los materiales A71 y Var-9, esta hipótesis surge del resultado obtenido en la secuencia de aminoácidos de estos materiales en donde solo se observó el cambio de aminoácidos en el residuo 79 de alanina o prolina; esta idea surge debido a que en el presente trabajo se observó un cambio a nivel de ADN genómico, y existe la probabilidad de que haya dos copias del gen codificante para la γ -kafirina, o de que uno de ellos no sea funcional y solo se exprese una de esas copias.

Y por otro lado queda la pregunta: ¿ γ -kafirina tiene actividad como inhibidor de α -amilasas y tripsina?, lo cual falta por terminar de elucidar.

14. Bibliografía

- Agrobit. 2010. **Manual del cultivo de sorgo**. Cargill. [en línea]. Disponible en: <http://www.agrobit.com/>. (Ingreso 8 de enero de 2010).
- Belton, P. S. Delgadillo, I. Halford, N. G. y Shewry, P. R. 2006. **Kafirin structure and functionality**. *J. Cereal Science*. 44: 272-286.
- Byaruhanga, Y. B. Emmambux, M. N. Belton, P. S. Wellner, N. y Ng, K. G. 2006. **Alteration of kafirin and kafirin film structure by heating with microwave energy and tannin complexation**. *J. Agriculture and Food Chemistry* 54: 4198-4207.
- D'Alessandro, J. Barlocco, N. Peinado, M. R. y Garin, D. 1997. **Digestibility, nitrogen balance and energy content of high and low tannin sorghum grain in pigs**. 1er Congreso de producción animal Argentina-Uruguay. 1-10.
- De Barros, E. G. Takasaki, K. Kirleis, A. W. y Larkins, B. A. 1991. **Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding gamma-kafirin from sorghum bicolor**. *Plant physiol.* 97: 1606-1607.
- De Freitas, F. A. Yunes, J. A. Da Silva, M. J. Arruda, P. y Leite, A. 1994. **Structural characterization and promoter activity analysis of gamma-kafirin gene from sorghum**. *Mol. Gen. Genet.* 245: 177-186.
- Domanski, C. Giordia, L. M. y Feresin, O. 1997. **Composición y calidad del grano de sorgo**. EEA INTA Manfredi, Arg., Cuaderno de actualización No. 7: 47-50. [en línea]. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/informaciontecnica/suplementacion/42calidad_y_composicion_del_grano_de_sorgo.htm. Fecha de ingreso: 8 de enero de 2008.
- Doyle, J. J y Doyle J. L. 1990. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*. 12: 13-15
- Duodu, K. G. Tang, H. Grant, A. Wellner, N. Belton, P. S. y Taylor, J. R. N. 2001. **FTIR and solid state ¹³C NMR spectroscopy of proteins of wet cooked and popped sorghum and maize**. *J. Cereal Science*. 33: 261-269.
- Duodu, K. G. Nunes, A. Delgadillo, I. Parker, M. L. Mills, E. N. C. Belton, P. S. y Taylor, J. R. N. 2002. **Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize *in vitro* protein digestibility**. *J. Cereal Science*. 35: 161-174.

- Duodu, K. G. Taylor, J. R. N. Belton, P. S. y Hamaker, B. R. 2003. **Factors affecting sorghum protein digestibility.** *J. Cereal Science.* 38: 117-131.
- El Nour, I. N. A. Peruffo, A. D. B. y Curioni, A. 1998. **Characterisation of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behaviour.** *J. Cereal Science.* 28: 197-207.
- Elkin, R. G. Freed, B. M. Hamaker, B. R. Zhang, Y. y Parsons, M. C. 1996. **Condensed tannins are only partially responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars.** *J. Agric. Food. Chem.* 44: 848-853.
- Esen, A. 1986. **Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility.** *Plant Physiology.* 80: 623-627.
- Esen, A., 1987. **Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.).** *J. Cereal Science.* 5: 117-128.
- Espinosa-Pozo, M. García-jurado, A. Cervantes-Macswiney, A. Ebel-Fonseca, A. Lima-Espinosa, C. y Guillen-Gutiérrez, A. C. 2008. **Informe sobre la cadena productiva de sorgo.** Fundación Guanajuato Produce. 1-20.
- Ezeogu, L. I. Duodu, K. G. y Taylor, J. R. N., 2005. **Effects of endosperm texture and cooking conditions on the in vitro starch digestibility of sorghum and maize flours.** *J. Cereal Science.* 42: 33-44.
- Ezeogu, L. I. Duodu, G. K. Emmambux, N. M. y Taylor, J. R. N. 2008. **Influence of cooking conditions on the protein matrix of sorghum and maize endosperm flours.** *Cereal Chemistry.* 85: 397-402.
- Farré, I. y Faci, J. M. 2006. **Comparative response of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) to deficit irrigation in a Mediterranean environment.** *Agricult. Water Manag.* 83: 135-143.
- Garin, D. Barlocco, N. D'Alessandro, J. y Peinado, R. 2007. **Digestibilidad de granos de cereales en cerdos de terminación. IX Encuentro de nutrición y producción de animales monogástricos.** *Agrociencia.* 93-96.
- Garrat, R. Oliva, G. Caracelli, I. Leite, A. y Arruda, P. 1993. **Studies of the zein-like α -prolamins based on an analysis of amino acid sequences: implications for their evolution and the three-dimensional structure.** *Proteins: Structure, Function, and Genetics.* 15: 88-99.

- Gao, C. Taylor, J. Wellner, N. Byaruhanga, Y. B. Parker, M. L. Mills, E. N. C. y Belton, P. S. 2005. **Effect of preparation conditions on protein secondary structure and biofilm formation of kafirina.** *J. Agricultural and Food Chemistry*. 53: 306-312.
- Hamaker, B. R. Kirleis A.W. Butler, L. G. Axtell, J. D. y Mertz, E. T. 1987. **Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84: 626-628.
- Hamaker, B. R. y Griffin, V. K. 1993. **Effect of disulphide bond-containing protein on rice starch gelatinization and pasting.** *Cereal Chemistry*. 70: 377-380.
- Ioerger, B. Bean, S. R. Tunistra, M. R. Pedersen, J. F. Erpelding, J. Lee, K. M. y Herman, T. J. 2007. **Characterization of polymeric proteins from vitreous and floury sorghum endosperm.** *J. Agricultural and Food Chemistry*. 55: 0232-10239.
- Jaramillo, M. León, A. Angulo, I. y Peña, M. 1994. **Valor nutricional de cultivares de sorgo granifero (*Sorghum* (L) Moench) altos en taninos producidos en Venezuela.** *Zootecnia Trop*. 12: 23-53.
- Johns, C. O. y Brewster, J. F. 1916. **Kafirin, an alcohol-soluble protein from kafir, andropogon sorghum.** *J. Biological Chemistry*. 28: 59-65.
- Kawakatsu, T. y Takaiwa, F. 2010. **Cereal seed storage protein synthesis: fundamental processes for recombinant protein production in cereal grains.** *J. Plant Biotechnology* 8: 939-953.
- Koenig, W. D. 1991. **The effects of tannins and lipids on digestion of acorns by acorn woodpeckers.** *The auk*. 8: 79-88.
- Latorre-Ramírez, J. S. y Calderón-Araque, C. A. 1998. **Evaluación fisiológica y nutricional del efecto de los taninos en los principales sorgos graníferos (*Sorghum bicolor* (L) Moench) cultivados en Colombia.** Corporación agropecuaria de investigación colombiana.
- Laemmli, U. K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*. 227:680-685.
- Lee, S. H. y Hamaker, B. R. 2006. **Cys155 of 27 kDa maize γ -zein is a key amino acid to improve its in vitro digestibility.** *FEBS Letters*. 580: 5803-5806.
- Nunes, A. Correira, I. Barros, A. y Delgadillo, I. 2005. **Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate-poliacryamide gel electrophoresis.** *J. Agricultural and Food Chemistry*. 53: 639-643.

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO, 2007. [en línea]. Disponible en <http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/water.htm>. Fecha de ingreso: 8 de enero de 2008.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAOSTAT, 2007. [en línea]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es>. Fecha de ingreso: 8 de enero de 2008.
- Oria, M. P. Hamaker, R. B. Axtell, J. D. y Huang, C. P. 2000. **A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5065-5070.
- Oria, M. P. Hamaker, B.R. y Schull, J.M. 1995a. **In Vitro protein digestibility of developing and mature sorghum grain in relation to α -, β -, and γ -kafirin disulfide crosslinking.** *J. Cereal Sci.* 22: 85-93.
- Oria, M. P. Hamaker, B.R. y Shull, J.M. 1995b. **Resistance of sorghum α -, β - and γ -kafirins to pepsin digestion.** *J. Agricultural and Food Chemistry.* 43: 2148-2153.
- Ottman, M. J. Kimball, B. A. Pinter, P. J. Wall, G. W. Vanderlip, R. L. Leavitt, S. W. LaMorte, L. R. Matthias, A. D. y Brooks, T. J. 2001. **Elevated CO₂ increases sorghum biomass under drought conditions.** *New Phytologist.* 150: 261-273.
- Quintana-Hernández, P. A. Villalobos-Oliver, B. E. Cornejo-Serrano, M.C. (2000). **Métodos numéricos con aplicaciones en Excel.** *Instituto Tecnológico de Celaya.* 93-95.
- Rezende, T. y Figueira, S. 2008. **Evolution of the genes encoding seed storage proteins in sugar cane and maize.** *Tropical Plant Biology.* 1:108-119.
- Rooney, L. W. y Pflugfelder, R. L. 1986. **Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn.** *J. of animal Sci.* 63: 1607-1623.
- Sabelli, P. A. y Larkins, A. B. 2009. **The Development of Endosperm in Grasses.** *Plant Physiology.* 149: 14-26.
- SAGARPA. 2009. Estadísticas de producción de granos forrajeros. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Estadisticas/Paginas/default.aspx> (Ingreso 8 de marzo de 2009).
- Salinas, I. Pró, A. Salinas, Y. Sosa, E. Becerril, C. M. Cuca, M. Cervantes, M. y Gallegos, J. 2006. **Compositional variation amongst sorghum hybrids: Effect of kafirin concentration on metabolizable energy.** *J. Cereal Science.* 44: 342-346.

- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory NY: Cold Spring Harbor. A1.26.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 5463-5467.
- Shewry, P. R. y Halford, G. N. 2002. **Cereal seeds storage proteins: structures, properties, and role grain utilization**. *J. experimental botany*. 53: 947-958.
- Shewry, P. R. y Tatham, A. S. 1990. **The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution**. *Biochemical Journal*. 267: 1-12.
- Shull, J. M. Watterson, J. J. y Kirleis, A. W. 1991. **Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L. Moench) based on molecular weight, solubility, and structure**. *J. Agricultural and Food Chemistry*. 39: 83-87.
- Singh, R. y Axtell, J. D. 1973. **High lysine mutant gene (*hl*) that improves protein quality and biological value of grain sorghum**. *Crop Science*. 13: 535-539.
- Sistema Agropecuario de Consulta (SIACON) 1980-2005, SAGARPA, D. F., México.
- Taylor, J. Bean, S. R. Ioerger, B. P. y Taylor, J. R. N. 2007. **Preferential binding of sorghum tannins with γ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation**. *J. Cereal Science*. 46: 22-31.
- UGRJ. 2010. Unión ganadera regional de Jalisco. <http://www.ugrj.org.mx> (Ingreso Febrero del 2010)
- Varadajan G. S. y Prakash, C. S. 1991. **A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species**. *Plant Mol. Biol.* 9:6-12.
- Watterson, J. J. Schull, J. M. y Kirleis, A. W. 1993. **Quantitation of α -, β -, γ -kafirins in vitreous and opaque endosperm of *Sorghum bicolor***. *Cereal Chemistry*. 70: 452-457.
- Woo, Y. M. Hu, D. W. N. Larkins, B. A. y 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: 2297- 2317.
- Zhang, G. y Hamaker, B. R., 1998. **Low α -amilase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein**. *Cereal Chemistry*. 75: 710-713.

Referencias de programas empleados

- Advance Protein Secondary Structure Prediction (**APSSP**). [en línea]. Disponible en: <http://imtech.res.in/raghava/apssp/> (Ingreso en Enero de 2011).
- Bendtsen, J. D. Nielsen, H. Von Heijne, G. Brunak, S. 2004. **Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0**. *J. Molecular Biology* 340: 783-795. SignalP 3.0 Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Deep View**. [en línea]. Disponible en: <http://www.expasy.org/spdbv/> (Ingreso en Enero 2011).
- DISULFIND**. [en línea]. Disponible en: <http://disulfind.dsi.unifi.it/> (Ingreso en Enero 2011).
- DNASTAR Lasergene** [en línea]. Disponible en: www.dnastar.com (Ingreso en Enero 2009).
- Patterson, J. Chamberlain, B. y Thayer, D. s.f. (sin fecha). **Finch TV versión 1.4.0**.
- PeptideCutter**. [en línea]. Disponible en: <http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/> (Ingreso en Enero 2011).
- PDBe Fold**. [en línea]. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/> (Ingreso en Enero 2011).
- Rasband, W. s. f. (sin fecha). **Image J 1.43u**. Disponible en: <http://rsb.info.nih.gov/ij> (Ingreso en Junio 2010).
- Swiss Model**. [en línea]. Disponible en: <http://swissmodel.expasy.org/> (Ingreso en Enero 2011).
- The Protein Model Portal**. [en línea]. Disponible en: <http://www.proteinmodelportal.org/> (Ingreso en Enero 2011).

ANEXOS

A1. ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE O MÉTODO LAEMMLI

1. Limpie los vidrios perfectamente con jabón y enjuague con agua corriente. Posteriormente, lávelos con agua desionizada, deje secar al aire. De acuerdo al modelo y tipo de cámara de electroforesis, arme los vidrios para poder elaborar el gel.
2. En dos recipientes limpios, se colocan en el siguiente orden los reactivos que a continuación se enlistan para preparar los geles de separación y concentración. Es recomendable preparar primero el gel de separación y una vez elaborado este, preparar el gel de concentración.

Gel de separación 17%

Acrilamida/Bisacrilamida(30% / 2.67 %)	5.7 ml
Amortiguador I (Tris 1.5 M pH 8.8)	2.5 ml
Agua desionizada	1.7 ml
Dodecil sulfato de sodio 10% (SDS)	100 ul
N,N,N', N Tetrametil etilen diamina (TEMED)	5 ul
*Persulfato de amonio 10%	50 ul

Gel de concentración 8%

Acrilamida/Bisacrilamida (30% / 2.67%)	1.35 mL
Amortiguador I (Tris 0.5 M pH 6.8)	1.25 mL
Agua desionizada	2.35 mL
Dodecil sulfato de sodio 10% (SDS)	50 ul
N,N,N', N Tetrametil etilen diamina (TEMED)	5 ul
*Persulfato de amonio 10%	25 ul

*Se prepara y agrega una vez que se va a colocar la mezcla, ya que una vez adicionado el proceso de polimerización es muy rápido.

3. Se coloca la mezcla del gel de separación entre las dos placas de vidrio, cuidando de no producir burbujas. Se llena hasta aprox. 2 cm. antes de llegar a la parte superior del vidrio. Se deja polimerizar, esto se visualiza por la formación de una línea de

polimerización. Se puede adicionar encima una pequeña capa de alcohol o de SDS para favorecer la polimerización y evitar la formación de burbujas.

- Una vez elaborado el gel de separación se procede con el gel de concentración. Se elimina el alcohol o SDS de la superficie y se adiciona la mezcla correspondiente al gel de concentración. Se coloca el peine para formar los pozos, cuidando no formar burbujas. La base del peine debe quedar aprox. 0.5 cm. por encima del inicio del gel de separación.
- Una vez que ambos geles se han elaborado, el siguiente paso es preparar la muestra que se quiere analizar. Para tal efecto, la muestra se resuspende en un volumen y concentración conocida y se le adicionan 2 volúmenes del buffer de desnaturalización, el cual se prepara con los siguientes reactivos:

Para 10 ml

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.25 ml
SDS 10%	2.00 ml
Glicerol	2.50 ml
2 β-mercaptoetanol	0.50 ml
Azul de bromofenol	0.20 ml
Agua desionizada	3.55 ml

Almacenar a 4 °C

- Las muestras se desnaturalizan por cuatro minutos en agua hirviendo. Posteriormente, se centrifugan por un min a 12 000 rpm para descartar el material insoluble que pudiera ver quedado.
- Una vez preparadas las muestras, estas se cargan en el gel mediante la ayuda de una micropipeta. La electroforesis se realiza a 50 V por 30 min. y posteriormente a 100 V 1-2 h, dependiendo del tipo de cámara. El buffer de corrida es el siguiente: Tris-HCl 0.25 M, Glicina 1.92 M, SDS 1 % a pH 8.3.
- Finalmente, una vez terminada la electroforesis el gel se desmonta de la cámara y se tiñe con azul de coomassie preparado de la siguiente manera:

Azul brillante de coomassie	250 mg
Metanol	45 ml
Acido acético	9 ml
Agua	46 ml

Una vez alcanzada la tinción deseada, el gel se destiñe adicionando la solución de destinción, la cual contiene lo siguiente: Acido acético 75 ml, metanol 50 ml, agua 875 ml. El gel se

registra mediante una fotografía y se puede almacenar en agua o bien secándolo entre dos pliegues de papel celofán dulce.

A2. METODOLOGÍA DEL USO DEL BIOANALIZADOR AGILENT 2100

1. Preparación del Gel Dye Mix

Tomar 650 uL de Agilent Protein 80 Gel y colocar en un filtro-columna, centrifugar a 7 000 rpm por 15 min, al filtrado adicionar 25 uL de colorante Dye concentrado, mezclar en vortex hasta que se homogenice el color, almacenar a 4 °C protegida de la luz, esta mezcla tiene un tiempo de vida de un mes máximo.

2. Preparación de la solución de destinción

Tomar 650 uL de Agilent Protein 80 Gel y colocar en un filtro-columna, centrifugar a 7 000 rpm por 15 min, almacenar a 4 °C, esta mezcla tiene un tiempo de vida de un mes máximo.

3. Preparación de la solución de desnaturalización para condiciones reductoras

Adicionar 3.5 volúmenes de ditiotreititol al 1M o 2 β-mercaptoetanol a una alícuota del buffer para muestras que contiene el kit.

4. Preparación de las muestras y el marcador

Mezclar 4 uL de la muestra problema más 2 uL de la solución de desnaturalización en un tubo eppendorf, en otro tubo eppendorf colocar 6 uL de marcador de proteínas (Protein 80 Ladder), desnaturalizar las muestras contenidas en ambos tubos durante 5 min a 95 °C, colocar inmediatamente en hielo. Centrifugar 15 seg a 10 000 rpm. Adicionar 84 uL de agua desionizada estéril a ambos tubos y mezclar cada tubo. Mantener en hielo.

5. Preparación del chip Protein 80

5.1 Ajustar la base del palto en la posición A con el Chip Priming Station

5.2 Tomar un Chip Protein 80 nuevo

5.3 Tomar 12 uL del Gel Dye Mix y colocar en los pozos rotulados con “G”

5.4 Colocar el embolo de la jeringa en 1 mL y cerrar la tapa presionando hasta escuchar un clip, bajar el embolo presionando fuertemente, esperar 90 seg en esta posición, soltar el embolo y dejar que este suba hasta la posición original (no debe tardar más de 5 seg).

5.5 Tomar 12 uL de Gel Dye Mix y colocar en los pozos rotulados con “G”

5.6 Tomar 12 uL de solución de destinción y colocar en los pozos rotulados con “DS”

5.7 Tomar 6 uL de las muestras problema y colocar en los pozos rotulados del 1 al 10

5.8 Tomar 6 uL del marcador Protein 80 Ladder preparado y colocar en el pozo rotulado “#”

5.9 Llevar el Chip preparado al Bionalizador Agilent 2100 el cual debe estar previamente preparado para recibir el chip e iniciar el ensayo inmediatamente.

Nota: El tiempo de preparación del Chip no debe exceder los 6 min, debido a que el gel que sirve como matriz se seca muy rápidamente. Además se debe tener

extremo cuidado en la preparación de este principalmente vigilando que no se produzcan burbujas y que no se toquen las paredes de los pozos y la matriz de gel.

A3. MÉTODO DE BRADFORD PARA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN MICROPLACA

1. Preparación del reactivo de Bradford:

Reactivo	Volumen
H ₃ PO ₄ al 85% (Comercial)	5mL
Etanol Absoluto	2.5mL
Azul de comassie R250 (Sigma)	5mg
H ₂ O cbp	50mL

Nota: El azul de comassie debe agregarse poco apoco, una vez preparado se filtra en papel Whatman de 3mm. La solución se guarda a 4 °C cubierta con papel aluminio y esta tiene un tiempo de vida máximo de 1 mes.

2. Construcción de la curva estándar de albumina sérico bovina (BSA):

El stock está a una concentración de 10 mg/mL, hay que diluirlo 1:100 en agua para tener 100 ug/mL, de este último se toman los microlitros necesarios para la concentración requerida en un volumen final de 150 uL de agua. A continuación se muestra un ejemplo:

Volúmenes de reactivos necesarios para la construcción de la curva estándar

BSA en 150uL (ug)	Tomar uL de BSA	Toma uL de Agua	NaOH 1N (Esperar 10 min)	Tomar uL de reactivo de Bradford
10	100	50	12	150
8	80	70	12	150
5	50	100	12	150
4	40	110	12	150
2	20	130	12	150
1	10	140	12	150
0	0	150	12	150

3. Todos los reactivos mostrados en el Cuadro X se homogenizan antes de adicionar el reactivo de Bradford.
4. Se añade el reactivo de Bradford, se homogeniza y se coloca por triplicado de 100 mL en cajas de 96 pozos.
5. Se lee a 595 nm en un espectrofotómetro (se construye la curva estándar hasta que esta sea ajustada con un valor de R² mayor a 95%, una vez estandarizado esto se harán las lecturas de las muestras problema).
6. Para la muestra problema solo se lee en un pozo que contendrá: 10 uL de muestra, 65 uL de agua, 6 uL de NaOH, y 75 uL del reactivo de Bradford.
7. Para conocer la concentración de la muestra problema se extrapola de D.O. con la de la curva estándar, o bien se calcula mediante regla de tres.

Nota: Para cuantificar las muestras de medios se añaden distintos volúmenes que se dejan incubando con la NaOH 10 min; en el caso de lisados celulares se deja 60 min a temperatura ambiente.

A4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO CTAB

Molienda del tejido de sorgo con N₂ líquido en mortero hasta polvo fino.

1. Se añade 300 µl de buffer CTAB a temperatura ambiente.
2. Se colocan los tubos a baño maría a 65 °C durante 45 min después de una agitación manual.
3. Se enfrían los tubos abiertos por 5 min.
4. Se añade 400 µl de cloroformo-octanol 24:1
5. Los tubos son agitados en vortex.
6. Se centrifugan a 10 000 rpm por 10 min a 25 °C.
7. Se recupera el sobrenadante y se traslada a un nuevo tubo (600 µl de sobrenadante aprox.).
8. Se añade RNAasa 10 µl a 10 ng/µl.
9. Los tubos son incubados por 1 h a 37 °C.
10. Se añade 400 µl de cloroformo octanol 24:1.
11. Los tubos son agitados en vortex.
12. Se centrifugan a 10 000 rpm por 10 min a 25 °C
13. Se recupera el sobrenadante y se traslada a un nuevo tubo.
14. Se agrega 600 µl de etanol absoluto y se agita por inversión.
15. Se deja reposar a -20 °C toda la noche.
16. Se centrifuga a 10 000 rpm por 1 min.
17. El contenido se decanta y posteriormente se lava la pastilla con etanol al 70% frío, 500 µl con agitación manual.
18. Se centrifuga a 10 000 rpm por 1 min.
19. El contenido se decanta y se deja escurrir boca abajo sobre sanitas hasta secar pastilla completamente.
20. Se resuspende la pastilla añadiendo 150 µl de TE 1X.

21. Se mezcla hasta disolver agitando a mano.

22. Se almacena a -20 °C.

Preparación de Buffer CTAB**200ml**

3%	Alquil-Trimetil-Amonio-Bromuro (CTAB)	6.0gr
1.4M	NaCl	16.36gr
0.2%	2-Mercaptoetanol	400µl
20mM	EDTA	1.49gr
100mM	Tris pH 8.0	2.42gr

A5. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE γ -KAFIRINA

ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGC--GAGGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC M73688
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC X62480
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC A16
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC A20
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC A71
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC B9
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC B22
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC B73
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC Fortuna
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC Itsmehño
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC Perla-T
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC Sureño
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC S-23
 ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCTGGCTCTCGCggGAGCGCGCCCTCCACGGTTACAACCGGGGGCTGGGCTGCCAGACACCTCATCTACCACCACC Var-9

 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTGC M73688
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC X62480
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC A16
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC A20
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC A71
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC B9
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC B22
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC B73
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC Fortuna
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC Itsmehño
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC Perla-T
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC Sureño
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC S-23
 GCCGGTTCACTGCCGCGCGGGTGCATCTGCCACCGCCGGTGCACCTGCCGCGCGGGTTCAGTGGCCACCGCCACGACCAATGCCACCCACACCCCTACTCTAC Var-9

 CGCCACCCACATCCATGCCCTACATACCgCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGCTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC M73688
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGCGGGCCCGCTCACCCGCCGATC X62480
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGCGGGCCCGCTCACCCGCCGATC A16
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGCGGGCCCGCTCACCCGCCGATC A20
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGCGGGCCCGCTCACCCGCCGATC A71
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGCGGGCCCGCTCACCCGCCGATC B9
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC B22
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC B73
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC Fortuna
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC Itsmehño
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC Perla-T
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC Sureño
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC S-23
 CGCCACCCACATCCATGGCTACATACCcCGGCATCCAAGCCCGTGCACCCAGGGCATCCGGATCCTGGGGTGTGGGGTGGCCCGCTCCTCGCCAAATC Var-9

A6. FORMACION DE ENLACES DISULFURO

A

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....
A.A: TLTTGGCGCQTPHLPPPPVHLPPPVHLPPPVHLPPPVHVPPPPQCHPHPTLPPHPHPCGTYPHPSPCHPGHPSGCGV
DBs:      0 0                                0      0      0      0
DBc:      3 3                                2      1      1      1

```

```

+-----+
|-----|+
|       ||
80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....
A.A: GGGPVTTPILGQCIEFLRHQCSPAATPYCSPQCQALRQCCQQLRQVEPLHRYQAIFGVVLSIQQQQPQGGSSPLPAL
DBs:      0      0      0  1      11
DBc:      0      0  2      22

```

```

-----+
+-----|--+
|       | |
.160.....170.....180.....190.
A.A: MAAQIAQQLTAMCGLGVGQSPCASCSPFAGGVHY
DBs:      1      1  1
DBc:      2      2  1

```

B

```

      10      20      30      40      50      60      70
A.A: TLTTGGCGCQTPHLPPPPVHLPPPVHLPPPVHLPPPVHVPPPPQCHPHPTLPPHPHPCITYPHPSPCHPGHPSGCGV
DBs:      0 0                                0      0      0      0
DBc:      7 8                                7      7      7      7

```

```

      80      90      100      110      120      130      140      150
A.A: GGGPVTTPILGQCIEFLRHQCSPAATPYCSPQCQALRQCCQQLRQVEPLHRYQAIFGVVLSIQQQQPQGGSSPLPAL
DBs:      0      0      0  0      00
DBc:      7      7      7  6      66

```

```

      160      170      180      190
A.A: MAAQIAQQLTAMCGLGVGQSPCASCSPFAGGVHY
DBs:      0      0  0
DBc:      5      5  6

```

C

```

      10      20      30      40      50      60      70
A.A: TLTTGGCGCQTPHLPPPPVHLPPPVHLPPPVHLPPPVHVPPPPQCHPHPTLPPHPHPCLTYPHPSPCHPGHPSGCGV
DBs:      0 0                                0      0      0      0
DBc:      7 8                                7      7      7      7

```

```

      80      90      100      110      120      130      140      150
A.A: GGGPVTTPILGQCIEFLRHQCSPAATPYCSPQCQALRQCCQQLRQVEPLHRYQAIFGVVLSIQQQQPQGGSSPLPAL
DBs:      0      0      0  0      00
DBc:      7      7      7  6      66

```

```

      160      170      180      190
A.A: MAAQIAQQLTAMCGLGVGQSPCASCSPFAGGVHY
DBs:      0      0  0
DBc:      5      5  6

```

D

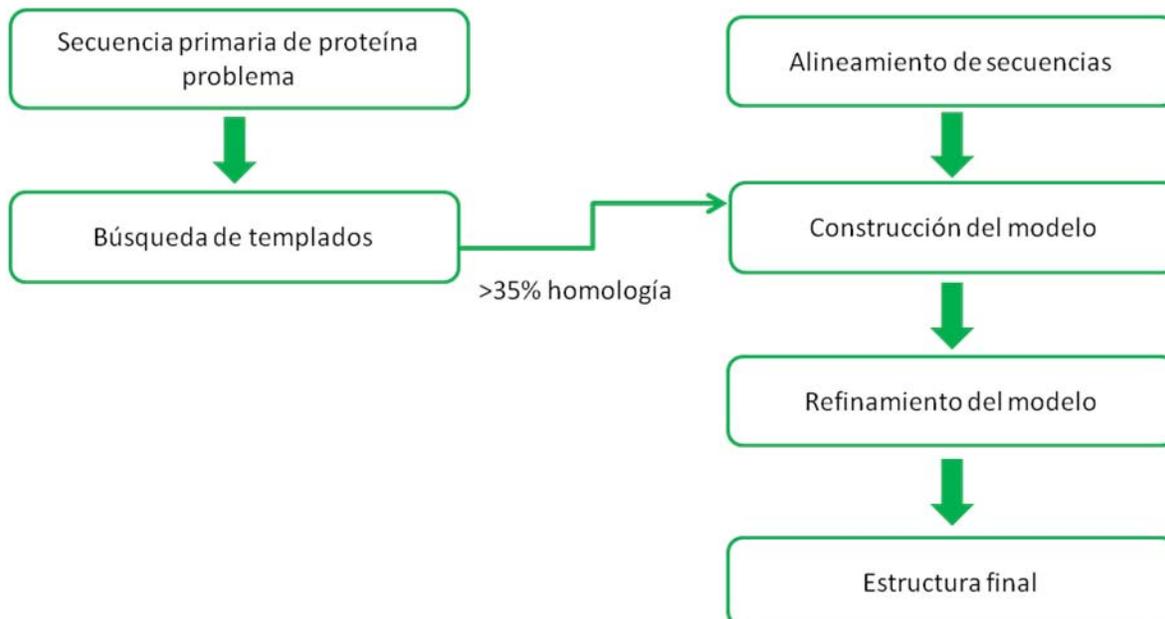
	10	20	30	40	50	60	70
A.A:	TLTTGGCGCQTPHLPPPPVHLPPPVHLPPPVHLPPVHVPPPPQCHPHPTLPPHPHC	M	TYPPHPSPCHPGHPGSCGV				
DBs:	0 0			0		0	0 0
DBc:	7 8			7		7	7 7
	80	90	100	110	120	130	140 150
A.A:	GGGPVTPPILGQCIEFLRHQCS	PAATPYCS	QQC&LRQCCQQLRQVEPLHRYQ&IFGVVLSIQQQQPQGSSPLP&L				
DBs:	0	0	0 0	00			
DBc:	7	7	7 6	66			
	160	170	180	190			
A.A:	MAAQIAQQLTAMCGLGVGQPSPCASCSPFAGGVHY						
DBs:	0	0 0					
DBc:	5	5 6					

E

	10	20	30	40	50	60	70
A.A:	TLTTGGCGCQTPHLPPPPVHLPPPVHLPPPVHLPPVHVPPPPQCHPHPTLPPHPHC	V	TYPPHPSPCHPGHPGSCGV				
DBs:	0 0			0		0	0 0
DBc:	7 8			7		7	7 7
	80	90	100	110	120	130	140 150
A.A:	GGGPVTPPILGQCIEFLRHQCS	PAATPYCS	QQC&LRQCCQQLRQVEPLHRYQ&IFGVVLSIQQQQPQGSSPLP&L				
DBs:	0	0	0 0	00			
DBc:	7	7	7 6	66			
	160	170	180	190			
A.A:	MAAQIAQQLTAMCGLGVGQPSPCASCSPFAGGVHY						
DBs:	0	0 0					
DBc:	5	5 6					

Predicción de la formación de puentes disulfuro en la secuencia de γ -kafirina realizando sustitución del aminoácido 79 por aminoácidos con características fisicoquímicas iguales. A) Predicción con glicina, B) Predicción con isoleucina, C) Predicción con leucina, D) Predicción con metionina, E) Predicción con valina. Se marca en rojo el aminoácido del residuo 79, A.A indica la secuencia de aminoácidos, DBs indica la formación del enlace disulfuro (1=formación de enlace, 0=no hay formación de enlace), DBc indica la confianza en la predicción (0=baja y 9=alta).

A7. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA MODELADO POR HOMOLOGÍA



Refinamiento del modelo:

- 1) desviación de la raíz cuadrada media (RMSD), superposición de modelos a partir del carbono α (% identidad >50%, RMSD < 0.5 Å; %identidad 35-50%, RMSD 1.0 - 1.5 Å).
- 2) valores estereoquímicos para la longitud de los enlaces y ángulos (“Threading Energy” y “Force Field”); valores positivos indican ambientes energéticos desfavorables, valores negativos indican ambientes energéticos favorables.
- 3) Evaluación de los ángulos de torsión phi y psi gráfico de Ramachandran.

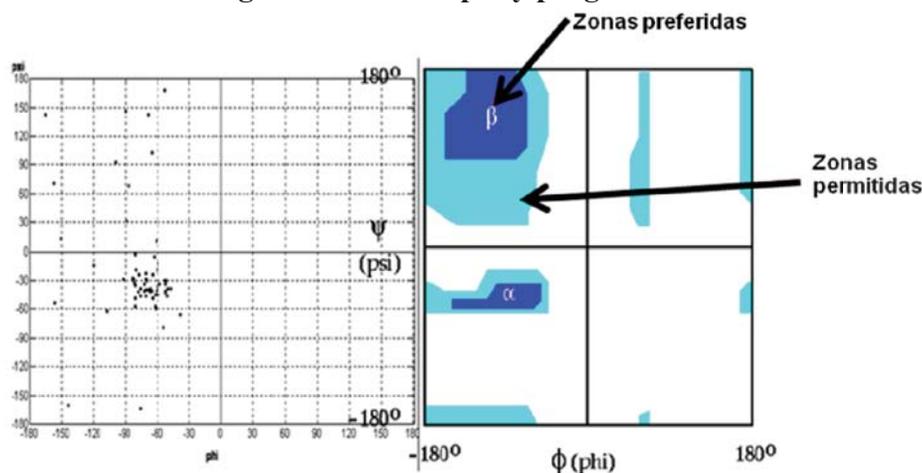


Gráfico de Ramachandran. Permite visualizar los ángulos entre los residuos de aminoácidos e indica las zonas preferidas (azul marino) y permitidas (azul aqua) para formación de hoja β y hélice α .

A8. SOLUCIONES EMPLEADAS***Cloroformo-Octanol***

Se prepara en relación 24: 1. Para ello medir 24 ml de Cloroformo y adicionar 1ml de Octanol.

Acetato de sodio 3M a pH5.2

Para 100 ml de solución se pesan:

24.61 g de acetato de sodio

Se disuelven en aprox. 80 ml de agua destilada y posteriormente se ajusta el pH y se afora.

Acetato de potasio 5M a pH4

Para 100 ml de solución se pesan:

49.07 g de acetato de potasio

Se disuelven en aprox. 80 ml de agua destilada y posteriormente se ajusta el pH y se afora.

SDS 20 %

Para 100 ml de solución:

Pesar 20 g de SDS y disolver en 80 ml de agua destilada.

Etanol 70%

Para 100 ml de solución:

Tomar 70 ml de etanol y adicionar 30 ml de agua destilada.

RNAsa [1mg /ml]

Tomar 50 µl de RNAsa a una concentración de 20 mg/ml y adicionar 950 µl de agua destilada estéril.

Fenol-Cloroformo-Isoamilico

Para 50ml de solución se requiere:

Tomar 24 ml de Cloroformo, adicionar 1ml de alcohol Isoamilico y 25 ml de Fenol; mezclar, cubrir de la luz con papel aluminio y dejar reposar a -20 °C.

TAE 50X

Pesar 242,0 g de Tris

Medir 57,1 ml Ácido acético glacial

Medir 100 ml EDTA 0.5M pH 8.0

Se disuelve el Tris- base poco a poco para evitar saturar la solución, se adiciona el EDTA y el ácido acético glacial. Aforar la solución a 1L.