



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de
amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado
en San Luis Potosí**

Tesis que presenta

Cecilia Silva Sánchez

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Codirector de tesis

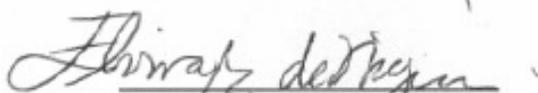
Dra. Elvira González de Mejía

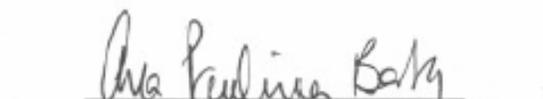
San Luis Potosí, S.L.P., Marzo 2007.



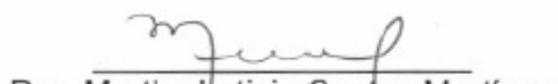
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí**" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Cecilia Silva Sánchez** y aprobada el **07 de enero de 2008** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.


Dra. Elvira González de Mejía
Presidente


Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Secretario


Dr. Antonio de León Rodríguez
Vocal


Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Vocal



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y también en Laboratorio de la Dra. Elvira González de Mejía del Departamento de Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. Durante la realización del proyecto el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca No. 172330), así como del TIES-Training Program perteneciente al US-AID program, Joint Program in Value-Added Foods at the UIUC.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 015 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 7 días del mes de enero del año 2008, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|-------------------|--------------------------------|
| Dra. Elvira González de Mejía | Presidente | Universidad de Illinois |
| Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa | Secretaria | IPICYT |
| Dr. Antonio De León Rodríguez | Sinodal | IPICYT |
| Dra. Martha Leticia Santos Martínez | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Cecilia Silva Sánchez

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización Bioquímica y Nutracéutica de Semillas de Amarantho (Amaranthus hypochondriacus) Cultivado en San Luis Potosí

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 7 días del mes de enero de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|---------------|
| Resumen. | i |
| Abstract. | ii |
| I. Introducción. | |
| 1.1 Generalidades del amaranto y péptidos bioactivos. | 1 |
| II. Revisión de literatura. | |
| 2.1 Historia, origen, distribución, producción y clasificación del amaranto. | 4 |
| 2.1.1 Historia. | 4 |
| 2.1.2 Origen, distribución y producción. | 5 |
| 2.1.3 Clasificación. | 5 |
| 2.1.4 Características del cultivo. | 7 |
| 2.2 Características generales de la semilla de amaranto. | 8 |
| 2.2.1 Tamaño y estructura. | 8 |
| 2.2.2 Composición química. | 10 |
| 2.2.3 Proteínas de reserva y su función. | 11 |
| 2.2.3.1 Tipos de proteínas de reserva. | 12 |
| 2.2.3.2 Síntesis de proteínas de reserva. | 13 |
| 2.2.3.3 Localización de la traducción de proteínas de reserva. | 15 |
| 2.3 Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. | 15 |
| 2.3.1 Clasificación de péptidos activos en proteínas de reserva. | 15 |
| 2.3.2 Lunasin. | 17 |
| 2.3.2.1 Caracterización y función en plantas. | 17 |
| 2.3.2.2 Función biológica en células de mamífero. | 18 |
| 2.4 Características generales del almidón de amaranto. | 19 |
| 2.4.1 Generalidades del almidón. | 19 |
| 2.4.2 El gránulo de almidón. | 19 |
| 2.4.3 Composición química del almidón. | 20 |
| 2.4.4 Biosíntesis del almidón. | 21 |
| 2.4.5 Proteómica en gránulos de almidón. | 22 |
| 2.4.6 Caracterización física de los gránulos de almidón. | 23 |
| 2.4.7 Microscopia de fuerza atómica. | 24 |

| | | |
|-------------|--|----|
| III. | Justificación, hipótesis y objetivos. | |
| 3.1 | Justificación. | 26 |
| 3.2 | Hipótesis. | 27 |
| 3.3 | Objetivos. | 28 |
| 3.3.1 | Objetivo general. | 28 |
| 3.3.2 | Objetivos específicos. | 28 |
| IV | Materiales y métodos. | |
| 4.1 | Materiales. | 29 |
| 4.1.1 | Material biológico. | 29 |
| 4.1.2 | Reactivos. | 29 |
| 4.2 | Métodos. | 30 |
| 4.2.1 | Caracterización de la semilla de amaranto. | 30 |
| 4.2.1.1 | Rendimiento en campo. | 30 |
| 4.2.1.2 | Tamaño de semilla. | 30 |
| 4.2.1.3 | Peso de 100 granos. | 30 |
| 4.2.1.4 | Composición proximal. | 30 |
| 4.2.2 | Caracterización de proteínas de reserva. | 31 |
| 4.2.2.1 | Extracción de proteínas. | 31 |
| 4.2.2.2 | Cuantificación de proteínas solubles. | 31 |
| 4.2.2.3 | Determinación de aminoácidos. | 32 |
| 4.2.2.4 | Electroforesis de proteínas unidimensional. | 32 |
| 4.2.2.5 | Electroforesis de proteínas bidimensional. | 32 |
| 4.2.2.6 | Ensayos RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). | 33 |
| 4.2.3 | Caracterización de péptidos activos en proteínas de reserva de amaranto. | 34 |
| 4.2.3.1 | Predicción de péptidos activos en proteínas de reserva de amaranto. | 34 |
| 4.2.3.2 | Identificación de péptidos activos en la fracción glutelinas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC MS/MS). | 35 |
| 4.2.3.2 | Caracterización de lunasin. | 36 |
| 4.2.3.2.1 | Cuantificación por ensayos de ELISA. | 36 |
| 4.2.3.2.2 | Identificación por Western blot. | 37 |
| 4.2.3.2.3 | Ensayo de inmunoprecipitación. | 38 |
| 4.2.3.2.4 | MALDI-TOF(Matrix assisted laser desorption ionization). | 38 |

| | Página | |
|------------|---|-----------|
| 4.2.4 | Caracterización de gránulos de almidón de amaranto. | 39 |
| 4.2.4.1 | Extracción de almidón. | 39 |
| 4.2.4.2 | Extracción de proteínas asociadas a gránulos de almidón. | 39 |
| 4.2.4.3 | Caracterización física del gránulo de almidón de amaranto. | 40 |
| 4.2.5 | Análisis estadístico. | 40 |
| V. | Resultados y discusión. | |
| 5.1 | Caracterización fisicoquímica de las semillas de amaranto cultivadas en San Luis Potosí. | 41 |
| 5.1.1 | Propiedades físicoquímicas de la semilla de amaranto. | 41 |
| 5.1.1.1 | Variabilidad genética intra especie mediante análisis de RAPD. | 42 |
| 5.1.2 | Composición química de las semillas de amaranto. | 43 |
| 5.1.3 | Patrón electroforético de las proteínas de reserva de amaranto. | 46 |
| 5.1.3.1 | Caracterización de glutelinas de amaranto mediante electroforesis bidimensional. | 48 |
| 5.1.3.2 | Identificación de glutelinas por LC MS/MS. | 52 |
| 5.2 | Caracterización de péptidos bioactivos en proteínas de reserva de amaranto. | 54 |
| 5.2.1 | Predicción de péptidos con actividad biológica potencial en proteínas de reserva. | 54 |
| 5.2.1.1 | Identificación de péptidos activos en la fracción glutelinas de amaranto. | 56 |
| 5.2.2 | Caracterización del péptido tipo Lunasin en proteínas de reserva de amaranto. | 59 |
| 5.2.2.1 | Contenido de Lunasin en proteínas de reserva de amaranto. | 59 |
| 5.2.2.2 | Detección del péptido tipo Lunasin mediante Western blot. | 61 |
| 5.2.2.3 | Purificación del péptido tipo Lunasin por ensayos de inmunoprecipitación. | 64 |
| 5.2.2.4 | Identificación del péptido tipo Lunasin por MALDI-TOF. | 64 |
| 5.2.2.5 | Caracterización de Lunasin en glutelinas de amaranto mediante electroforesis bidimensional. | 66 |
| 5.3 | Caracterización de almidón de amaranto | 66 |
| 5.3.1 | Caracterización bioquímica de las proteínas asociadas a gránulos de almidón. | 66 |
| 5.3.1.1 | Proteínas asociadas a gránulos de almidón mediante electroforesis unidimensional. | 66 |
| 5.3.1.2 | Caracterización de las proteínas asociadas a gránulos de almidón mediante electroforesis bidimensional. | 67 |

| | | Página |
|--------------|---|---------------|
| 5.3.1.3 | Análisis de las proteínas asociadas a gránulos de almidón mediante MALDI-TOF. | 68 |
| 5.3.2 | Caracterización física de los gránulos de almidón de amaranto. | 70 |
| VI. | Conclusiones y perspectivas. | |
| 6.1 | Conclusiones. | 74 |
| VII. | Referencias. | 75 |
| VIII. | Anexos | |
| Anexo I | Capítulo en libro “Characterization of bioactive peptides in <i>Amaranthus hypochondriacus</i> seed storage proteins” | 85 |
| Anexo II | Artículo de investigación “Bioactive peptides in <i>Amaranthus hypochondriacus</i> ” | 93 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | Página |
|------------------|---|--------|
| Tabla 1 | Rendimiento en campo de amaranto, algunos cereales y leguminosas. | 8 |
| Tabla 2 | Comparación de la composición proximal entre amaranto y algunos cereales. | 10 |
| Tabla 3 | Composición de aminoácidos esenciales de semillas de tres especies de amaranto en (g/100g de proteína). | 11 |
| Tabla 4 | Mezcla de reacción para PCR. | 33 |
| Tabla 5 | Condiciones de PCR para RAPD. | 34 |
| Tabla 6 | Oligonucleótidos para RAPD. | 34 |
| Tabla 7 | Propiedades físicas de las semillas de amaranto cultivadas en San Luis Potosí. | 41 |
| Tabla 8 | Análisis proximal de las semillas de amaranto cultivadas en San Luis Potosí. | 44 |
| Tabla 9 | Fracciones proteínicas de amaranto cultivado en San Luis Potosí. | 44 |
| Tabla 10 | Identificación de proteínas de glutelinas de amaranto mediante espectrometría de masas. | 53 |
| Tabla 11 | Biopéptidos identificados en la digestión trípica de las glutelinas de amaranto mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas. | 58 |
| Tabla 12 | Concentración del péptido tipo Lunasin en extractos totales de proteína y fracciones de proteínas en $\mu\text{g/g}$ de proteína total cuantificados por ELISA. | 60 |
| Tabla 13. | Concentración del péptido tipo Lunasin en extractos totales de proteína y fracciones de proteínas en $\mu\text{g/g}$ de harina cuantificados por ELISA. | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Apariencia del cultivo de amaranto. | 6 |
| Figura 2. Micrográfica electrónica del grano de amaranto. | 9 |
| Figura 3. Síntesis de glicina en cotiledones de soya. | 14 |
| Figura 4. Ruta biosintética de almidón mediante ADP-glucosa. | 21 |
| Figura 5. Organización de amilopectina para formar el gránulo de almidón. | 24 |
| Figura 6. Productos de amplificación de las cuatro variedades de amaranto para el ensayo RAPD. | 42 |
| Figura 7. Composición de aminoácidos de harinas de amaranto cultivado en San Luis Potosí. | 45 |
| Figura 8. Composición de aminoácidos de las fracciones de proteínas de reserva de amaranto cultivado en San Luis Potosí. | 46 |
| Figura 9. Patrón electroforético de la fracciones de proteínas de reserva de amaranto cultivado en San Luis Potosí. | 47 |
| Figura 10. Patrón bidimensional de glutelinas de amaranto pH 3-10 lineal. | 49 |
| Figura 11. Comparación de glutelinas Criolla vs. Nutrisol pH 3-10 mediante Image Master (GE Healthcare). | 49 |
| Figura 12. Patrón bidimensional de glutelinas de amaranto pH 4-7. | 50 |
| Figura 13. Comparación de glutelinas Criolla vs. Nutrisol pH 4-7 mediante Image Master (GE Healthcare). | 50 |
| Figura 14. Patrón bidimensional de glutelinas de amaranto pH 6-11. | 51 |
| Figura 15. Comparación de glutelinas Criolla vs. Nutrisol pH 6-11 mediante Image Master (GE Healthcare). | 51 |
| Figura 16. Glutelinas de amaranto variedad Criolla que fueron analizadas por LC MS/MS. | 52 |
| Figura 17. Predicción de péptidos con potencial actividad biológica en proteínas de amaranto. | 55 |
| Figura 18. Curva estándar de Lunasin sintético mediante ELISA. | 59 |
| Figura 19. Detección del péptido tipo lunasin mediante Western blot. | 62 |
| Figura 20. Western blot de extractos totales de proteínas de amaranto mezcladas con Lunasin de soya. | 63 |
| Figura 21. Western blot después de la inmunoprecipitación de glutelinas | 64 |
| Figura 22. Masas monoisotópicas de cuatro fragmentos detectados por análisis de MALDI-TOF y sus secuencias esperadas. | 65 |
| Figura 23. Identificación del péptido tipo lunasin mediante electroforesis bidimensional. | 66 |
| Figura 24. Patrón electroforético de proteínas asociadas a gránulos de almidón. | 67 |

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 25. Electroforesis bidimensional de proteínas asociadas a gránulos de almidón variedad Criolla. | 64 |
| Figura 26. Identificación de proteínas asociadas a gránulos de almidón por MASCOT. | 69 |
| Figura 27. Fragmento de los resultados de BLAST proteína-proteína para la sintetasa unida a gránulos de almidón. | 70 |
| Figura 28. Microscopia Electrónica de Barrido de gránulos completos de almidón de amaranto variedad Criolla. | 71 |
| Figura 29. Imágenes de gránulos enteros de almidón de amaranto mediante Microscopía de Fuerza Atómica | 72 |
| Figura 30. Corte transversal de gránulos de almidón de amaranto variedad criolla mediante Microscopía de Fuerza Atómica. | 72 |
| Figura 31. Geometría del gránulo de almidón de amaranto mediante Microscopía de Fuerza Atómica. | 73 |

RESUMEN.

La caracterización de cultivos alimenticios subutilizados es una estrategia para incrementar y diversificar las fuentes de cultivos mundiales. El amaranto es una planta tradicional mexicana que provee tanto hojas y semillas comestibles con un alto valor nutritivo pero ha permanecido subutilizado. Dos variedades comerciales (Criolla y Nutrisol) y dos variedades nuevas (DGETA y Gabriela) de semillas de *A. hypochondriacus* se cultivaron en San Luis Potosí como un esfuerzo para introducir cultivos alternativos en regiones donde las condiciones climáticas son adversas para los cultivos más comunes. El objetivo de este trabajo fue estudiar la adaptabilidad de amaranto a las condiciones extremas de cultivo, así como también caracterizar los péptidos bioactivos presentes en las proteínas de reserva y la caracterización del almidón, el mayor componente de la semilla. Los resultados mostraron que Criolla y DGETA tuvieron el mayor rendimiento en campo (1474.7 y 1421.9 kg/ha respectivamente). La variedad con mayor contenido de proteína de Gabriela (17.3 %) seguido de Criolla y Nutrisol (15.0 aproximadamente). Un modelo de predicción de los péptidos activos en proteínas de semilla mostró que las principales actividades de péptidos bioactivos fueron antihipertensión (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I) e inhibidor de proteasas (Dipeptidil aminopeptidasa IV). El lunasin, un péptido anticáncer de soya, fue encontrado en proteínas de reserva de amaranto. La concentración promedio en los extractos totales de proteínas fue de 11.1 µg de Lunasin/g de proteína total, el cual es más bajo al valor reportado en soya. Un ensayo de Western blot permitió la identificación de Lunasin con un peso molecular de 18.5 kDa, diferente que el de soya con un tamaño de 5.4 kDa, el cual no se detectó. Mediante MALDI-TOF se observó que el péptido tipo Lunasin corresponde a más del 60% de la secuencia del péptido Lunasin de soya. Por medio de electroforesis bidimensional se caracterizó el patrón de proteínas asociadas a gránulos de almidón y con el cual fue posible la identificación de una enzima sintetasa asociada al gránulo. La caracterización morfológica de los gránulos de almidón de amaranto mostró que tenían una forma hexagonal.

ABSTRACT

Characterization of underutilized food crops is a strategy to increase and diversify the world's sources of crops. Amaranth is a traditional Mexican plant, which provides both grains and tasty leaves of high nutritional value but has remained underutilized. Two commercial (Criolla and Nutrisol) and two new varieties (DGETA and Gabriela) of *A. hypochondriacus* seeds were grown in San Luis Potosí, as an effort to introduce alternative crops in regions where climate conditions are adverse for most of the common crops. The aim of this work was to study the adaptability of amaranth to extreme conditions of culture, as well as, characterize the bioactive seed storage proteins and amaranth starch; the major seed component. The results showed that Criolla and DGETA varieties had the higher seed yield (1474.7 and 1421.9 kg/ha respectively). The variety with higher protein content was Gabriela (17.3 %) followed by Criolla and Nutrisol (15.0% approximately). Prediction model of other active peptides in amaranth seed proteins showed that the main bioactive peptides were antihypertensive, protease inhibitors and opioid. Lunasin, an anticancer peptide from soy was found in amaranth seed storage proteins. The average concentration in the whole seed protein extract was 11.1 µg lunasin/g total protein, which is lower than that in soybean. Western blot allowed lunasin identification with a molecular weight of 18.5 kDa, different than the soybean size of 5.4 kDa, which was not detected. MALDI-TOF revealed that amaranth lunasin-like peptide corresponded to more than 60% of the soybean lunasin peptide sequence. By 2D electrophoresis was characterized the pattern of amaranth starch granule-associated proteins in which was possible to identify a syntase granule-bound enzyme. The morphological characterization of amaranth starch granules showed a hexagonal shape.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 GENERALIDADES DEL AMARANTO Y PÉPTIDOS BIOACTIVOS.

El amaranto es un pseudocereal de origen americano que fue cultivado por las antiguas civilizaciones Mesoamericanas. Se empleaba en la dieta básica de los aztecas junto con el maíz y el frijol, y tenía gran importancia económica. A la llegada de los españoles el cultivo de amaranto fue prohibido debido a que se asociaba a cultos religiosos; dando como resultado que amaranto pasara a ser un cultivo subutilizado. En 1979, la Academia Nacional de Ciencias y la FAO propusieron que debido a su alta calidad nutricional, amaranto podría ser un grano con gran potencial para su explotación comercial [1].

El amaranto es una planta C4 y una de las pocas dicotiledóneas en las cuales el primer producto de fotosíntesis es un producto de cuatro carbonos. La combinación de características anatómicas y el metabolismo C4, da como resultado un incremento de la eficiencia del uso del CO₂ bajo una amplia variación de temperaturas y humedad que le permiten una mejor adaptación, considerándose un cultivo alternativo en lugares donde cereales y otros cultivos de interés comercial no pueden crecer [2]. Este cultivo se puede aprovechar de manera más eficiente puesto que ofrece tanto granos y hojas comestibles con alta calidad nutricional. Las semillas de amaranto tienen un alto contenido de proteína (13-17%) y su composición de aminoácidos es cercana al balance óptimo requerido en la dieta humana [2]. Las hojas también contienen niveles altos de proteína (28 a 49%), grasas insaturadas (45% de ácido linoléico), fibra (11 a 23%) y minerales como hierro, magnesio y calcio [3].

Los trabajos de investigación en amaranto van desde la caracterización bioquímica de proteínas de reserva del grano [4, 5], el mejoramiento de la calidad nutricional de otros cultivos de interés como la papa y el maíz sobreexpresan alguna de las proteínas de reserva de amaranto [6, 7]; la sobreexpresión de la globulina 11S recombinante en sistemas como *Escherichia coli*,

Pichia pastoris y tabaco [8, 9, 10], la utilización de amaranto para la preparación de alimentos [11, 12, 13], la suplementación de dietas en pacientes con hipercolesterolemia, mal nutrición o alergia al gluten [14, 15, 16], sustitución de proteína animal por proteínas de amaranto en alimentación de pollos y cerdos de engorda [17, 18], desarrollo de productos novedosos como lo son películas comestibles para empaque de alimentos [19], o en la preservación de granos en silos [20], aprovechamiento de otros componentes como lo es el almidón [21], y en bioremediación de suelos contaminados con metales pesados o hidrocarburos cíclicos tóxicos [22, 23].

Las investigaciones en alimentos van enfocadas al estudio de alimentos funcionales, que proporcionen además de nutrición varios beneficios a la salud. Hay una gran variedad de péptidos de interés general tanto para nutrición y salud. Entre los más importantes se encuentran aquellos que ayuden a controlar o disminuir los riesgos a la salud en enfermedades ampliamente distribuidas en el mundo como son cáncer, obesidad, hipertensión y diabetes. Los grupos de péptidos con actividad biológica son: antimicrobianos y antifúngicos, antihipertensión, reguladores de colesterol, antitrombóticos, reguladores de absorción de minerales, inmunomoduladores, opioides y reguladores de funciones gastrointestinales [24]

Aunque existen algunos reportes de la presencia de algunos péptidos antifúngicos, antimicrobianos y antivirales; así como también de algunas enzimas que actúan en respuesta a estrés biótico y abiótico en la planta [25, 26, 27, 28], no existen reportes de caracterización de péptidos con diversas actividades biológicas que sean de interés para mejorar la salud humana y que den al amaranto un valor agregado para su explotación comercial.

Este trabajo fue enfocado a la caracterización física y bioquímica de dos variedades nuevas de amaranto (DGETA y Gabriela) comparadas con dos variedades comerciales (Criolla y Nutrisol) que fueron cultivadas en San Luís

Potosí, como un esfuerzo para introducir un cultivo alternativo en esta región del país enfocándose en evaluar la adaptabilidad del cultivo a un clima con altas temperaturas y pocas precipitaciones pluviales. Se llevó a cabo una predicción de diversos péptidos con probables actividades biológicas presentes en las proteínas de reserva de amaranto así como la identificación y caracterización de un péptido tipo Lunasin (hasta ahora sólo reportado en soya y cebada); el cual posee actividad anticancerígena. Se realizó la caracterización de las proteínas asociadas a gránulos de almidón de amaranto.

El amaranto es un alimento funcional que puede aportar muchos beneficios a la salud y además puede explotarse comercialmente como un producto de alto valor agregado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 HISTORIA, ORIGEN, DISTRIBUCIÓN, PRODUCCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL AMARANTO.

2.1.1 HISTORIA.

El amaranto fue cultivado en América desde hace 5000 a 7000 años y junto con el maíz y el frijol, fue un cultivo fundamental para las civilizaciones Mesoamericanas y Sudamericanas. Los mayas lo nombraban “xtes”, apreciaban principalmente su valor alimenticio y probablemente fueron los primeros en utilizarlo como un cultivo de alto rendimiento. Los aztecas lo conocían como “huautli” y lo ligaban con sus ritos religiosos. Por su parte los Incas lo denominaron “kiwicha” (pequeño gigante) y lo respetaban principalmente por sus poderes curativos. A la llegada de los españoles se le denominó amaranto que proviene del latín y significa “flor que nunca muere” [29].

El amaranto fue un cultivo ampliamente distribuido en la cultura Azteca jugando un papel importante en su economía. Este grano se otorgaba como tributo al rey azteca y cada año se percibían por este concepto alrededor de 20000 toneladas, provenientes de 17 provincias dominadas por Tenochtitlán [30]. En la alimentación lo empleaban en preparación de alimentos como atole, tamales, pinole y tortillas; y las hojas eran consumidas como verduras. Con la semilla de amaranto se preparaba una harina que era mezclada con miel o melazas para preparar una masa llamada “tzoalli” con la cual se elaboraban figurillas e ídolos (en algunas referencias se dice que también se mezclaba sangre de niños y adultos sacrificados). Estas figurillas era empleado para tradiciones religiosas donde los grandes sacerdotes lo utilizaban como fuente de fuerza e iluminación mística. A la llegada de los españoles y debido a las costumbres religiosas, los sacerdotes de aquella época ordenaron la exterminación del cultivo debido a que consideraban que era una forma de perversión de la “comuni3n cristiana” [31].

De esta manera casi se logra el exterminio del cultivo. Sólo pocas personas conservaron la tradición del cultivo de amaranto en pequeñas parcelas y para consumo familiar. Hasta la década de los 80's el amaranto fue redescubierto y desde entonces han aparecidos numerosos reportes en los cuales se estudia las cualidades agronómicas y nutricionales de este grano.

2.1.2 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y PRODUCCIÓN.

Aunque el amaranto es un cultivo de origen mesoamericano; actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo. Los primeros reportes de amaranto en Europa datan de los años 1600, éste fue llevado como parte de las pruebas de la conquista del nuevo mundo y eran principalmente plantas de ornato. Hay algunos reportes de que el amaranto fue cultivado por primera vez en Nepal y en África del este por los años 1700 y su cultivo fue extendido a Asia media y Asia oriental [29].

El amaranto es cultivado en varios estados de la República Mexicana como lo son: Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, y Tlaxcala con una producción anual de 2959.98 ton, y un rendimiento de 1.295 ton/ha. El principal productor mundial de amaranto es la India, en particular en el valle de Sutlej y el estado de Himachal Pradesh. En América del sur, Perú es uno de los más importantes países productores. [32].

2.1.3 CLASIFICACIÓN.

La familia *Amaranthaceae* esta comprendida por más de 60 géneros y 800 especies de plantas herbáceas anuales o perennes. Solo tres especies del género *Amaranthus* son cultivadas para la producción de semillas comestibles: *A. hypochondriacus* y *A. cruentos* que son cultivadas en México y Guatemala, respectivamente, y *A. caudatos*, que es cultivada en Perú [2].

El amaranto es una planta dicotiledónea que produce semillas tipo cereal (generalmente clasificadas como monocotiledóneas) por lo que se le ha denominado como un pseudo cereal puesto que produce granos tipo cereal. Su clasificación taxonómica es inexacta debido a su plasticidad botánica extrema, por lo que se han tomado en cuenta sus estructuras florales, forma y proporciones de la hoja e inflorescencias [2].

El amaranto posee hojas simples lanceoladas con una altura de planta que varía de 1.5 a 3.0 m. El número de hojas y el tamaño muestran una gran variabilidad intra e inter especies, además responde a diferentes condiciones de crecimiento mediante cambios en el número de ramificaciones, patrón de ramificación, tamaño de la plántula y combinación de estas características [2].

Todas las ramificaciones llevan una o más panojas de semillas y en algunas especies maduran simultáneamente con la cabeza principal o la maduración puede ser irregular (**Figura 1**).



Figura 1. Apariencia del cultivo de amaranto. Campo de cultivo en San Luis Potosí.

2.1.4 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO.

El amaranto es una dicotiledónea del orden *Caryophyllales* perteneciente a la familia *Amaranthaceae* del género *Amaranthus* que comprende hierbas anuales o perennes, con hojas opuestas o alternas y sin estípulas. Los miembros del género *Amaranthus* se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones tropicales, subtropicales y templadas. El tipo de crecimiento puede ser erecto o rastrero. Los colores del tallo y las hojas van de rojo a verde con una multitud de matices intermedios y ramificado a no ramificado. Los colores de la semilla varían desde el blanco hasta el negro [33].

Esta planta es de crecimiento rápido debido a que es una de las pocas especies que sin ser un pasto utiliza la ruta C4 para la fijación de carbono. Puede crecer en climas calientes y templados donde el suministro de agua es limitado y es altamente tolerante a condiciones áridas y suelos pobres donde habitualmente otros cultivos como los cereales crecen difícilmente. El amaranto también se adapta satisfactoriamente a altitudes tan elevadas como 2500 m sobre el nivel del mar [33, 2].

El cultivo de amaranto se desarrolla cuando la temperatura es alta (21°C cuando menos). Las temperaturas óptimas de germinación están entre los 16 y los 35°C. La rapidez de maduración se incrementa cuando las temperaturas alcanzan el límite superior de este intervalo. Sin embargo *Amaranthus hypochondriacus* y *Amaranthus cruentus* no soportan temperaturas bajas, su crecimiento cesa a los 8°C y las plantas se dañan cuando se alcanza una temperatura se 4°C [33].

El amaranto puede ser de ciclo corto, tolerante a la sequía con un alto valor nutritivo y con múltiples usos y formas de aprovechamiento se considera como un cultivo alternativo para muchos lugares donde hay escasez e irregularidad de lluvias y donde incluso se presentan problemas de abasto de alimentos.

Debido a que el amaranto empobrece el suelo, se recomienda rotarlo con horticultura intensiva. Responde satisfactoriamente a la fertilización y a abonos orgánicos. La planta de amaranto es muy frágil en los primeros días de emergencia. La floración ocurre entre los 43 y 57 días después de la siembra y la cosecha se realiza entre los 100 y 129 días. Producen grandes cantidades de semillas que caen al suelo fácilmente en su etapa de madurez. Una vez obtenida la semilla se procede a secarla para reducir la humedad de 52 a un 14-16%, para posteriormente almacenarla [2].

Los rendimientos de amaranto pueden compararse ventajosamente con los rendimientos promedio de otros cultivos de interés comercial (**Tabla 1**).

Tabla 1. Rendimiento en campo de amaranto, algunos cereales y leguminosas [34].

| GRANO | RENDIMIENTO ton/ha |
|--------------|---------------------------|
| Amaranto | 3.0 |
| Trigo | 4.4 |
| Cebada | 2.2 |
| Avena | 1.5 |
| Arroz | 3.8 |
| Maíz | 1.8 |
| Sorgo | 3.1 |
| Soya | 1.7 |
| Frijol | 0.6 |

2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

2.2.1 TAMAÑO Y ESTRUCTURA.

El tamaño de la semilla varía de 1.1 a 1.4 mm de largo por 1.0 a 1.3 mm de ancho (*A. caudatus*), tamaño que es muy pequeño comparado con el del frijol o

trigo [35]. Las semillas contienen una sola capa de testa (exotesta) y una de tegumento formada por células con engrosamientos en forma de estrías; la cutícula constituye la cubierta protectora del embrión. El embrión es de forma circular con las puntas de la raíz tocando el extremo de los cotiledones. Las células del embrión varían en tamaño y forma y aparecen heterogéneas en el contenido celular. Algunas células de pared delgada del parénquima contienen reservas en forma de cuerpos esféricos de naturaleza proteínica, incrustados en una matriz esponjosa que tiene propiedades típicas de lípidos o complejos lípidos. El centro de la semilla se denomina perispermo y es el tejido principal de almacenamiento, consiste de células del parénquima llenas de gránulos de almidón poliédricos. La mayor parte de las proteínas de reserva se encuentran contenidas en cuerpos proteínicos de aproximadamente 1.5 a 2 μm de diámetro en el embrión y de menor tamaño en el endospermo. En la **Figura 2** se pueden apreciar las características estructurales de la semilla de amaranto [2].

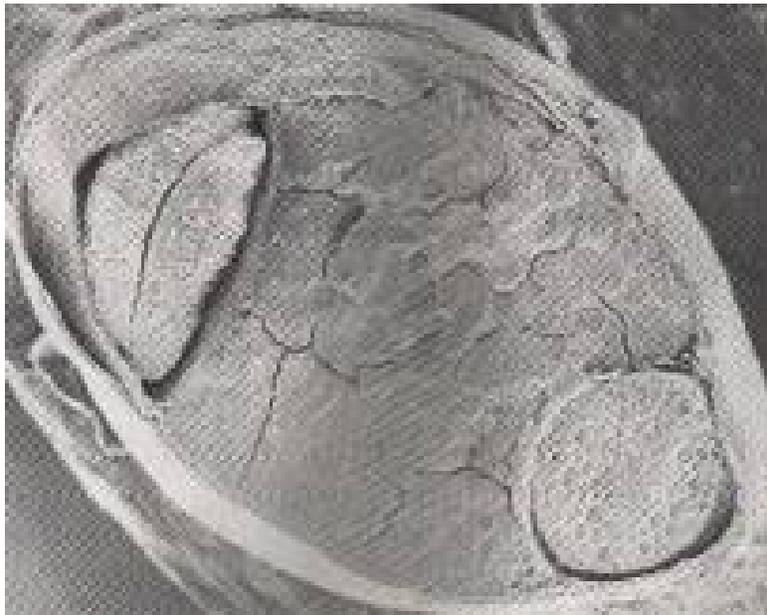


Figura 2. Micrografía electrónica del grano de amaranto [2].

2.2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

La semilla de amaranto contiene aproximadamente 11.1% de proteína en promedio y se puede comparar con semillas convencionales como el maíz con 13.8%, arroz con 11.7% y trigo 12.5% (**Tabla 2**). El contenido de grasa es relativamente alto (7.7%), sin embargo este valor es mucho menor que en algunas leguminosas consumidas como la soya con un valor de 20.1% [36]. Los análisis de composición indican que los contenidos de proteína cruda, grasa, fibra y cenizas del amaranto son generalmente más altos que en los cereales, sin embargo el contenido de carbohidratos es más bajo.

Tabla 2. Comparación de la composición proximal entre amaranto y algunos cereales [36].

| ANALISIS | AMARANTO | MAIZ | ARROZ | TRIGO |
|----------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Humedad | 11.1 | 13.8 | 11.7 | 12.5 |
| Proteína cruda | 17.9 ^a | 10.3 ^b | 8.5 ^b | 14.0 ^c |
| Grasa | 7.7 | 4.5 | 2.1 | 2.1 |
| Fibra | 2.2 | 2.3 | 0.9 | 2.6 |
| Cenizas | 4.1 | 1.4 | 1.4 | 1.9 |
| Carbohidratos | 57.0 | 67.7 | 75.4 | 66.9 |

^aN x 5.85; ^bN x 6.25; ^cN x 5.7

En general el contenido de aminoácidos esenciales del amaranto tiene niveles adecuados; muy en particular los aminoácidos azufrados (2.6 a 5.5%) y lisina (3.2 a 6.4%); este último corresponde a casi el doble de lo que contiene el maíz y el trigo (2.2 a 4.5%) y algo menos de lo encontrado en leguminosas importantes como chícharo, frijoles y soya (1.4%) [37]. Esta composición de aminoácidos (**Tabla 3**) es poco usual debido a su balance cercano al óptimo requerido en la dieta humana en adultos según la FAO [38], lo que hace de este grano una cosecha promisoriosa como alimento o fuente de proteínas en la dieta [3]. Por otra parte la cantidad de aminoácidos esenciales es superior en las fracciones de globulinas y prolaminas, mientras que la fracción de albúminas posee los más altos contenidos de lisina [2].

Tabla 3. Composición de aminoácidos esenciales de semillas de tres especies de amaranto en (g/100g de proteína) [3].

| AMINOÁCIDO | <i>Amaranthus</i> | <i>Amaranthus</i> | <i>Amaranthus</i> | FAO/WHU/UNU ^A | |
|----------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|-------|
| | <i>hypochondriacus</i> | <i>cruentus</i> | <i>caudatus</i> | Adultos | Niños |
| Isoleucina | 2.8 – 3.8 | 3.4 – 3.7 | 3.6 – 4.1 | 1.3 | 4.6 |
| Leucina | 5.0 – 5.8 | 4.8 – 5.9 | 5.9 – 6.3 | 1.9 | 9.3 |
| Lisina | 3.2 – 6.0 | 4.8 – 5.9 | 5.7 – 6.4 | 1.6 | 6.6 |
| Met + Cis ^b | 2.6 – 5.5 | 3.8 – 5.4 | 4.7 | 1.7 | 4.2 |
| Fenila + Tiro ^c | 6.9 – 8.5 | 5.6 – 8.5 | 6.2 | 1.9 | 7.2 |
| Treonina | 2.6 – 4.3 | 3.2 – 4.2 | 3.8 | 0.9 | 4.3 |
| Triptófano | 1.1 – 4.3 | nd | 1.1 | 0.5 | 1.7 |
| Valina | 3.2 – 4.2 | 2.4 – 4.0 | 4.1 – 4.7 | 1.3 | 7.2 |

^A[38], ^b requerimiento metionina + cisteína, ^c requerimiento fenilalanina + tirosina; nd = no determinado.

Respecto a la calidad de la proteína se han reportado valores de calificación química de aminoácidos (CQA) de 75, que comparado con 54 de maíz, 60 del trigo, 68 de la soya y 73 de la leche refleja que es aceptable y de buena calidad. La combinación de harina de amaranto y trigo se aproxima a una CQA de 100 [39]. También se han reportado valores de PER (relación de eficiencia de proteína) de 1.6 a 2.2 [40, 41]. La digestibilidad verdadera del amaranto tanto crudo como reventado o tostado alcanza valores desde 79.2 a 88.5% [42].

2.2.3 PROTEÍNAS DE RESERVA Y SU FUNCIÓN.

Durante el desarrollo, característicamente las semillas sintetizan relativamente grandes cantidades de reservas de alimento los cuales son atrapados en tejidos específicos como son los cotiledones o el endospermo. Estas reservas son movilizadas en el momento de la germinación y sus catabolitos son utilizados para mantener el crecimiento de la semilla hasta que esta pueda establecerse por si sola como una planta fotosintética autotrófica. La mayoría de las reservas son depositados en estructuras discretas llamadas organelos de almacenamiento; proteínas en cuerpos proteínicos (a menudo contienen

reservas menores, fitina, fuentes de fosfatos y micronutrientes), lípidos en cuerpos lipídicos, almidón en gránulos de almidón (amiloplastos). Las proteínas almacenadas en estos cuerpos proteínicos son denominadas proteínas de reserva [43].

2.2.3.1 TIPOS DE PROTEÍNAS DE RESERVA.

Existen varios tipos de clasificaciones para las proteínas de reserva de semillas. En general la más usada (pero no la más adecuada) es la propuesta por Osborne en 1924 [44]. De acuerdo a esta clasificación las proteínas de reserva se pueden dividir en cuatro grupos de acuerdo con su solubilidad. Los cuatro grupos son: a) albúminas que son solubles en agua en buffers diluidos a pH's neutrales; b) globulinas solubles en soluciones salinas pero insolubles en agua; c) Prolaminas que solubilizan en soluciones alcohólicas entre (70-90%); d) glutelinas son proteínas solubles en álcalis o ácidos diluidos. En cereales las proteínas más abundantes son las prolaminas y glutelinas mientras que en leguminosas las globulinas son la fracción más importante [43].

En su mayoría, las proteínas de reserva son oligoméricas; las holoproteínas están compuestas desde dos a muchas subunidades. Las subunidades pueden contener contienen dos o mas cadenas de polipéptidos las cuales pueden estar unidas por puentes de hidrógeno o puentes disulfuro entre los residuos de cisteína [43].

Se ha reportado que la mayor parte de las proteínas de amaranto se encuentran en el embrión, anillo que rodea al perispermo almidonoso [35]. Estas características morfológicas han sido utilizadas por Sánchez-Marroquín y col. [45] para producir un concentrado de proteínas, incrementando el contenido de 18 a 33%, este proceso incluye básicamente una molienda y separación por aire de los componentes el grano. También se han extraído las proteínas a varios pH's, recuperando del 71 al 74% de proteína soluble [46]. Se ha reportado que

la hidrólisis enzimática del almidón se ha logrado obtener una fracción de carbohidratos solubles y una harina de alto contenido de proteína [21].

2.2.3.2 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE RESERVA.

La síntesis de proteínas de reserva en semillas ocurre durante los últimos dos tercios de su desarrollo, comenzando después de la división celular y que la formación del embrión se ha completado, deteniéndose en la última etapa de maduración y secado. El tiempo, la velocidad y la extensión de la síntesis de varias proteínas de reserva, así como su distribución es diferente en cada semilla; y aunque estas variables son reguladas genéticamente, el ambiente juega también un papel regulatorio [47].

La acumulación de cualquier proteína es un reflejo del equilibrio establecido entre su velocidad de síntesis y su degradación. Puesto que las proteínas de reserva en los cotiledones experimentan una tasa de degradación muy baja, sus niveles son determinados casi exclusivamente por su tasa de síntesis y procesamiento. Estos últimos solo juegan un papel regulatorio menor, y cuantitativamente el paso limitante regulatorio en la síntesis de cualquier proteína parece ser la cantidad de ARNm que este presente en las células del tejido de almacenamiento de la semilla [43].

Diferentes tejidos, dentro de la misma semilla, a menudo acumulan diferentes proteínas de reserva, lo que sugiere que hay una regulación genética tejido-específica. En soya por ejemplo, se pueden encontrar en los ejes muy pequeñas cantidades de β -conglucina, la cual se encuentra ampliamente distribuida en los cotiledones (**Figura 3**). La reducida síntesis de β -conglucina en los ejes está relacionada con la baja presencia de su ARNm, que se puede deber a una transcripción disminuida, baja estabilidad o una traducción limitada [43].

En cereales, las prolaminas y glutelinas del endospermo almidonoso nunca son sintetizados alrededor de la pared de la aleurona, la cual secuestra un solo tipo

de proteínas. Así mismo, el embrión contiene proteínas de reserva únicas, incluyendo algunas lectinas, pero estas nunca son encontradas en el endospermo almidonoso o la pared de la aleurona [43].

La regulación de la expresión de los genes de proteínas de reserva, tanto en el modo tejido específico como en el modo temporal, esta pobremente descrita. Sin embargo existe la hipótesis de que en la región 5' de un gen de una proteína de reserva, se encuentran ciertas regiones que pueden estar involucradas en la regulación de la expresión del gen. En otras palabras, los elementos de control que actúan en *cis*, son activados por factores que actúan en *trans*, una proteína, que se une al ADN e interactuando con el elemento en *cis*, disparan la transcripción del gen bajo el su influencia regulatoria. Así, cada gen de proteína de reserva puede contener secuencias de control en *cis* en jerarquía que permiten la respuesta a cada situación de desarrollo ya sea en tejido-específico o de manera temporal [48].

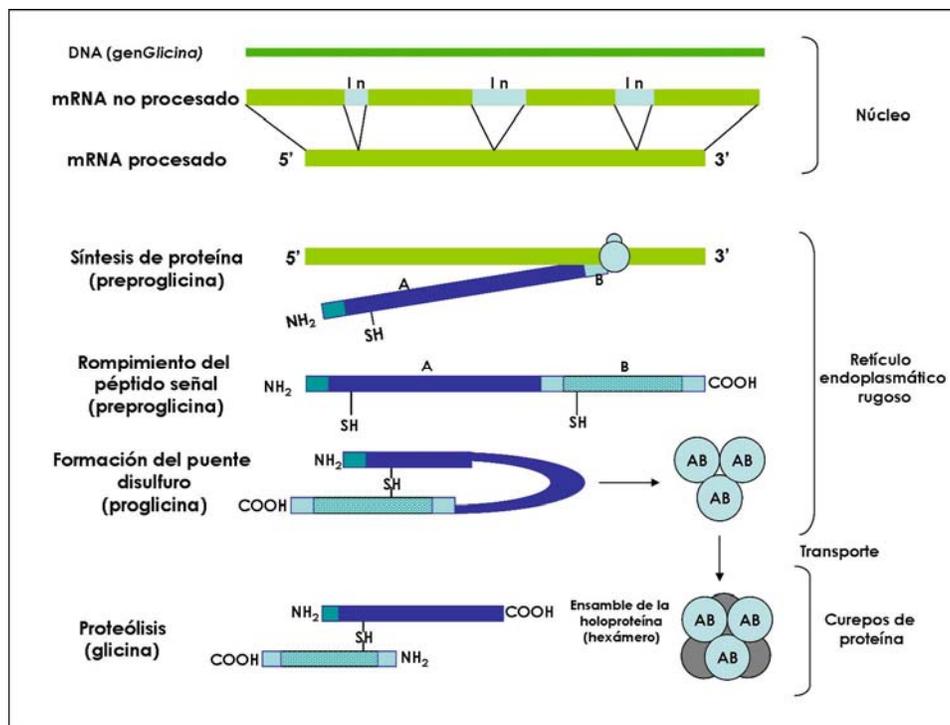


Figura 3. Síntesis de glicina en cotiledones de soja. Adaptada de Krochko y col. [49].

2.2.3.3 LOCALIZACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA.

La producción comienza con la transcripción en el núcleo, donde el ARNm resultante es transportado al sitio de síntesis de proteínas dentro del citoplasma. La síntesis ocurre en el citoplasma específicamente en el retículo endoplasmático rugoso (RER). El producto inicial de la traducción contiene un péptido señal en el amino terminal requerido para el transporte de la proteína desde su lugar de síntesis hasta el aparato de Golgi a través de los túbulos del retículo endoplasmático. Las proteínas de reserva se clasifican y empacadas dentro de vesículas derivadas de Golgi, para transportarlas al compartimento vacuola-cuerpo proteínico. La fusión sucede mediante la invaginación de las vesículas que permiten la descarga de las proteínas dentro de la vacuola, y a su vez permiten el crecimiento y eventualmente dan lugar al cuerpo proteínico maduro. Una subdivisión de la vacuola da como resultado la formación de numerosos cuerpos proteínicos [49].

2.3 PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN PROTEÍNAS DE RESERVA.

2.3.1 CLASIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS.

Los alimentos funcionales se definen como aquellos que además de proporcionar nutrición ofrecen un beneficio adicional a la salud del consumidor. Una parte muy importante de los alimentos funcionales son los péptidos bioactivos; que se definen como péptidos que cuentan con alguna actividad biológica y están presentes en los alimentos ya sea de manera natural o son generados durante el procesamiento de los alimentos [24].

Los péptidos bioactivos están compuestos generalmente de 3 a 20 residuos aminoácidos de longitud y tanto las proteínas de origen animal y vegetal contienen secuencias con actividades potenciales [24]. Por mucho los péptidos bioactivos más estudiados son los derivados de la leche y huevo. Sin embargo existen también varios reportes donde se puede observar que proteínas de

origen vegetal como soya y trigo aportan varios péptidos bioactivos de gran interés [24, 50].

Los métodos más comunes para el estudio de péptidos bioactivos están basados en ensayos *in vitro* para demostrar su actividad biológica. Algunas estrategias comunes son la producción por digestión enzimática, hidrólisis química (procesamiento de alimentos), síntesis *in vitro*, con el fin de obtener en cantidad suficiente y en algunos casos fracciones de péptidos puros que después son probados para actividad biológica.

Rutherford y col. [24] agruparon los péptidos bioactivos en grupos de acuerdo a su actividad biológica general. Los grupos propuestos son:

- Antimicrobianos y antifúngicos: Como su nombre lo indica, combaten una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas así como también algunas levaduras y hongos.
- Reguladores de la integridad intestinal y anti-inflamatorios de la enfermedad de Bowel: Este grupo está formado por algunos factores de crecimiento y péptidos que ayudan a mantener la integridad intestinal y previenen algunas inflamaciones.
- Antihipertensión: Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores-ACE (enzima convertidora de angiotensina); inhiben las enzimas ACE I y II, que están involucradas en el sistema renina-angiotensina, el cual regula la presión sanguínea [51]. Los vaso-relajadores por su parte actúan mediando los receptores Bradaquinina B1, prostacilina y un receptor desconocido de óxido de nitrógeno [52].
- Reguladores de colesterol: son todos aquellos que ayuden a controlar o disminuir los niveles de colesterol en sangre [52].
- Antitrombóticos: En este grupo se encuentran los péptidos que ayudan disminuir el riesgo de una trombosis, se incluyen todos aquellos péptidos que inhiben la formación de agregados de plaquetas vía la desactivación

- de la plaquetas activadas con ADP (adenosina difosfato) o bien inhibiendo la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano a un receptor específico en la superficie de las plaquetas [24].
- Reguladores de absorción de minerales: Son péptidos capaces de quelar minerales ayudando a mantenerlos solubles y facilitar su absorción.
 - Inmunomoduladores: son péptidos que estimulan o modulan el sistema inmunológico.
 - Opioides: son péptidos que pueden afectar el apetito, el comportamiento y la movilidad gastrointestinal y pueden exhibir efectos tipo morfina (analgésicos potentes).
 - Reguladores de funciones gastrointestinales: A diferencia del grupo que regula la integridad intestinal, estos péptidos tienen una acción específica y localizada en el intestino, mediante la regulación de hormonas del intestino o actuando específicamente *in situ* después de la absorción.

2.3.2 LUNASIN.

2.3.2.1 CARACTERIZACIÓN Y SU FUNSIÓN EN PLANTAS.

El desarrollo temprano de semillas de angiospermas se caracteriza por una rápida división celular y diferenciación. Una vez que el número de células es suficiente la división celular cesa y es entonces cuando comienza la síntesis de proteínas de reserva, carbohidratos, lípidos en el endospermo de cereales y en los cotiledones de leguminosas. Durante la expansión celular, el contenido ADN genómico se incrementa como un resultado de la endoreplicación (ciclo celular único de fases G1 y S sin división celular que ocurre solo en células de reserva del parénquima terminales diferenciadas) [53].

La expansión temporal de un grupo de proteínas hidrosolubles llamadas albúminas 2S coincide con el inicio de la expansión celular de embriones de chícharo en desarrollo. Otras evidencias sugieren que un mecanismo regulatorio controla la expresión génica y la actividad mitótica de las albúminas 2S.

Gálvez y col. [54] clonaron un ADNc específico del cotiledón (*Gm2S-1*) que codifica para una albúmina 2S de soya. *Gm2S-1* contiene en su secuencia un péptido señal y una proteína que es procesada postraducionalmente, que produce una subunidad pequeña de 43 aminoácidos. En su carboxilo terminal contiene el motivo de adhesión celular Arg-Gly-Asp (RGD) seguido de 8 residuos de Asp. Se ha reportado que el transcrito de *Gm2S-1* aparece tres semanas después de la floración, coincidiendo con la fase de expansión celular de la semilla en desarrollo. La subunidad pequeña de *Gm2S-1* se le denominó Lunasin. Debido a su cola poliasparagina de la subunidad, se ha especulado que puede tener alguna actividad fisiológica en el desarrollo de las semillas, pero su rol específico en la regulación del ciclo celular durante la embriogénesis es desconocido [55].

2.3.2.2 FUNCIÓN BIOLÓGICA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

Lunasin fue reportado por primera vez en soya. La predicción de su estructura por homología reveló contiene una región de unión a proteínas de cromatina. Se ha demostrado que cuando es transfectado en células de mamífero, lunasin arresta la mitosis conduciendo a la muerte celular, caracterizada por una lisis celular y la fragmentación de los cromosomas. Se cree que las grandes cantidades del péptido lunasin producidas por la expresión constitutiva del gen *lunasin* permite la unión a las regiones hipoacetiladas de la cromatina como aquellas encontradas en el cinetocoro en los centrómeros. Como resultado, el complejo del cinetocoro no se forma adecuadamente y los microtúbulos fallan al unirse al los centrómeros permitiendo el arresto de la mitosis y eventualmente la muerte celular [56].

También se ha observado que la adición del péptido lunasin de manera exógena a células de fibroblastos de ratón C3H 10 T1/2 suprime la formación del *Foci* inducida por la carcinogénesis química del DMBA y MCA. Se ha observado que lunasin se une preferentemente a las histonas-H4 desacetiladas en células tratadas con un inhibidor de histona desacetilasa. La afinidad de lunasin por el

núcleo de histonas desacetiladas sugiere un papel en la modificación de la cromatina, un proceso implicado en el control del ciclo celular y en el papel de supresores de tumores en carcinogénesis [54].

Lunasin es el primer agente antimetabólico aislado de una fuente común de alimentos (soya) conocido por sus propiedades anticarcinogénicas. Después de soya, solo existe un reporte de la presencia de lunasin en cebada [56] lo que sugiere que podría encontrarse en otras fuentes biológicas como el amaranto.

2.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ALMIDÓN DE AMARANTO.

2.4.1 GENERALIDADES DEL ALMIDÓN.

El almidón es el principal carbohidrato de reserva sintetizado por plantas superiores y es la fuente de energía más importante para muchas especies incluyendo humanos. En cultivos agrícolas como los cereales (maíz, trigo, arroz), esta fracción representa del 30 al 80% del peso seco, para leguminosas (frijol, chícharo, haba) es del 25 al 50% y en tubérculos (papa, camote, yuca) representa entre un 60 y 90%. En algunas frutas tales como el mango y plátano en su estado inmaduro alcanzan contenidos de hasta un 70% en base seca [57].

En amaranto, el almidón es el principal componente y su contenido puede variar desde 52.4 a 70% de acuerdo a la especie.

2.4.2 EL GRÁNULO DE ALMIDÓN.

En las plantas, el almidón se presenta como gránulos insolubles en agua, los cuales tienen una diversidad de tamaños y formas. La morfología, composición química y estructura supramolecular (arreglo en el espacio en estado sólido) son características de cada especie. Su tamaño varía de 0.5 a 100 μm . Los gránulos más grandes reportados son los de papa que pueden ser hasta de 100 μm [58]. Los gránulos de amaranto son de los más pequeños reportados (1-3 μm) [2]. El

tamaño y distribución de partículas son unas de las características que más afectan las propiedades funcionales de éstos.

2.4.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ALMIDÓN.

Los gránulos de almidón consisten de dos diferentes fuentes de polímeros de glucosa denominados amilosa y amilopectina. La amilosa es esencialmente un polímero lineal que consiste de largas cadenas de moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4; y constituye en promedio de 20 a 30% del almidón de los gránulos. El compuesto restante que conforma a los gránulos de almidón es la amilopectina, un polímero ramificado donde las cadenas lineales de moléculas de glucosa están unidas por enlaces α -1,4 y las ramificaciones ocurren en enlaces α -1,6. Los puntos de ramificación ocurren cada 12-20 moléculas de glucosa, en una distancia de alrededor de 9 nm a lo largo del eje de la molécula [58].

De acuerdo al contenido de amilosa/amilopectina el almidón se clasifica en dos tipos:

- a) Tipo glutinoso, opaco o ceroso. Está formado principalmente por amilopectina con menos del 1% de amilosa. Se le denomina como la fracción no gelificante, contribuyendo principalmente a la viscosidad en los alimentos debido a su alta viscosidad.
- b) Tipo no ceroso, translucido o normal. Esta formado principalmente por amilosa con un contenido menor al 5% de amilopectina. Se le denomina la fracción gelificante y es el principal contribuyente en los fenómenos de retrogradación de almidón.

El almidón de amaranto es principalmente del tipo ceroso, aunque se han encontrado especies con almidón translucido; estas diferencias pueden ser debidas aparentemente las diferencias en el cultivo y ambiente en el que crezca la planta de amaranto.

2.4.4 BIOSÍNTESIS DEL ALMIDÓN.

En las células de la mayoría de los organismos que almacenan almidón, como los tubérculos y los endospermos de los granos de cereales, el almidón es sintetizado a partir del azúcar que proviene de las hojas; donde se lleva a cabo la fotosíntesis. La síntesis del almidón ocurre exclusivamente en los amiloplastos (organelos celulares especializados para la síntesis de almidón). En tubérculos y semillas de leguminosas, la glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato, que entra al amiloplasto mediante transporte de membranas. Una vez en el interior, la glucosa-6-fosfato se transforma a glucosa-1-fosfato y luego, vía la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa, pasa a ADP-glucosa; sustrato para iniciar la síntesis de almidón (Figura 4) [58].

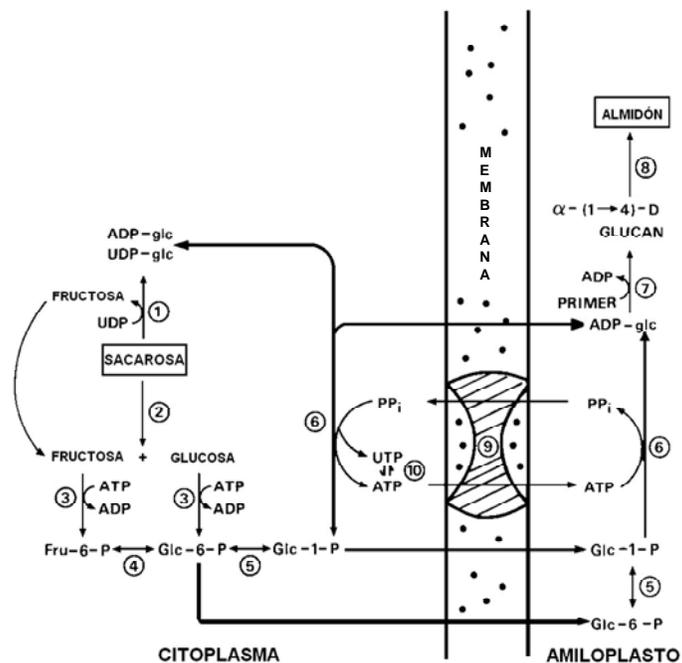


Figura 4. Ruta biosintética del almidón mediante ADP-glucosa [59].

Para el caso del endospermo de cereales el mecanismo difiere al reportado para ADP-glucosa. Aunque existe cierto importe de glucosa-6-fosfato, la mayoría de la ADP-glucosa se realiza en el citoplasma por una enzima distinta, la ADP-glucosa pirofosforilasa citoplasmática. La ADP-glucosa entra al amiloplasto mediante un transportador específico. Aun se siguen investigando las razones

por las cuales los cereales evolucionaron con una ruta diferente para la síntesis de ADP-glucosa [58].

Existen varias enzimas importantes que participan en la síntesis de almidón, entre estas; la ADP-glucosa pirofosforilasa, es la responsable de catalizar la reacción para producir ADP-glucosa a partir de glucosa-1-fosfato y ATP. Las enzimas almidón sintetasa y almidón sintetasa asociada al gránulo, catalizan la adición de unidades de ADP-glucosa al extremo no reductor de una cadena lineal de glucosas mediante enlaces α -1,4. Las ramificaciones del almidón son producidas por la enzima de ramificación de almidón, la cual rompe por hidrólisis una cadena lineal de glucosas y la transfiere a una posición α -1,6. Adicionalmente la enzima de des-ramificación, entre otras, también participa en la síntesis de amilopectina [60].

2.4.5 PROTEÓMICA EN GRÁNULOS DE ALMIDÓN.

Además de amilosa y amilopectina, el almidón contiene pequeñas cantidades de componentes menores como son proteínas, lípidos, pentosas y minerales (fósforo y silicio). Entre éstos, las proteínas y los lípidos son por mucho los más abundantes y los más importantes tecnológicamente hablando. Las cantidades exactas de proteínas dependen del origen y el grado de purificación durante su extracción. Un almidón típico de cereales contiene aproximadamente 0.25% de proteínas. Aunque las cantidades de estos constituyentes son menores, existen estudios que confirman que su presencia afecta significativamente tanto las propiedades de los gránulos, así como las propiedades de los productos derivados de almidón [61].

En general, se acepta ampliamente que la mayoría de las proteínas asociadas a gránulos de almidón (PAGA), son enzimas biosintéticas o degradativas que son dejadas adentro del gránulo mientras ocurre su síntesis, por lo que pueden encontrarse formando parte de la estructura o en la superficie. De acuerdo a su peso molecular estas proteínas se clasifican en dos grupos:

- 1) Proteínas de alto peso molecular (60, 77, 86, 95 y 149 kDa). Han sido denominados proteínas internas asociadas a gránulos de almidón. A este grupo pertenece la enzima almidón sintetasa, que corresponde a la banda de 60 kDa. Puede presentar varias isoformas de mayor o menor peso molecular.
- 2) Proteínas de bajo peso molecular (5, 8, 15, 19 y 30 kDa). Han sido nombradas como proteínas de superficie asociadas al gránulo de almidón. En este grupo se encuentran las fibrilinas (15 kDa), conformado por varios polipéptidos dentro de los cuales se encuentran las puroindolinas, que se relacionan con la dureza del grano de trigo.

Mediante estudios proteómicos ha sido posible la identificación de varias de estas proteínas y sus isoformas de diferentes fuentes botánicas como son cebada, trigo, arroz, entre otras [60, 61].

2.4.6 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS GRÁNULOS DE ALMIDÓN.

Debido a la distribución de la longitud de las cadenas y su arreglo de grupos, se piensa que el empaquetamiento de moléculas de amilopectina da forma a la matriz semicristalina del gránulo. (**Figura 5**). Dentro de los grupos, hay cadenas adyacentes de dobles hélices que se empaquetan juntas en arreglos ordenados dando como resultado la formación de una laminilla (**Figura 5A**). La laminilla cristalina se alterna con una laminilla amorfa formada en las regiones donde ocurren los puntos de ramificación con una distancia de repetición de 9 nm (Fig. 2B). Las laminillas cristalinas y amorfas se alternan formando anillos semicristalinos concéntricos dentro del gránulo (Fig. 2C). Este arreglo es denominado como el modelo de almidón líquido cristalino [62]. Oostergetel y Bruggen [63] incluyeron un concepto denominado cadena lateral que supone un nivel de organización más complejo. Gallant y col. [64] hicieron énfasis en este nivel adicional de organización y lo llamaron “blocklets”, donde se considera que estos blocklets son paquetes de amilopectina parcialmente cristalina con

ramificaciones de moléculas de amilopectina que contribuyen al componente cristalino del gránulo (**Figura 5**).

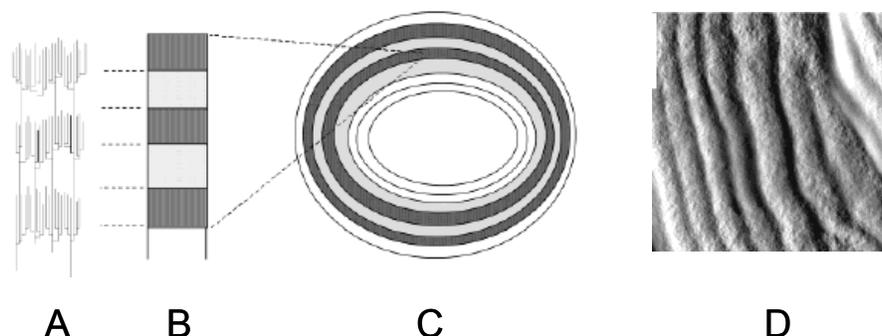


Figura 5. Organización de amilopectina para formar un gránulo de almidón. **(A)** Formación de una laminilla cristalina, **(B)** Alternación de laminillas cristalina y amorfa, **(C)** Arreglo de laminillas amorfas y cristalinas en anillos concéntricos [58]; **(D)** Apariencia de un corte de un gránulo de almidón de chícharo obtenido por Microscopía de Fuerza Atómica [62].

2.4.7 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.

La Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) es una herramienta muy poderosa que ha sido empleada en la captura de imágenes tridimensionales de estructuras biológicas y biomoléculas en condiciones muy cercanas a las ambientales, lo que permite que se puedan seguir procesos bioquímicos y fisiológicos en tiempo real con una resolución que puede llegar a ser atómica [65]. El principio de operación se basa en la interacción atómica entre una “punta” y la superficie analizada. Las fuerzas producidas son del orden de 10^{-9} a 10^{-7} N y son conocidas como fuerzas de Van der Waals. La MFA permite capturar imágenes de células vivientes y moléculas en ambientes acuosos con una resolución comparable y en ocasiones superior a la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Aunque la MEB presenta varias desventajas sobre la MFA, sigue siendo una técnica complementaria en la caracterización física de muestras. La MFA se ha empleado para el estudio de sistemas fijos (ADN cromosomal, ADN plasmídico, proteínas multiméricas en membranas, membranas diversas,

proteínas en arreglos bidimensionales y células vivientes) y de sistemas dinámicos (polimerización y crecimiento cristalino del fibrinógeno, propiedades fisicoquímicas como elasticidad y viscosidad; y varias fuerzas químicas) [66].

La MFA se empleada para determinar la estructura interna de los gránulos de almidón de papa, maíz, chícharo y arroz con lo que se han podido confirmar las teorías estructurales de los gránulos de almidón. Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes de la estructura cristalina de los gránulos de almidón de amaranto.

III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

3.1 JUSTIFICACIÓN.

Este trabajo está enfocado a la caracterización física y bioquímica de dos nuevas variedades de amaranto que fueron cultivadas en San Luís Potosí, esto como un esfuerzo para introducir un cultivo alternativo en esta región del país, donde difícilmente crecen cultivos como los cereales; enfocándose en evaluar la adaptabilidad del cultivo a un clima con altas temperaturas y pocas precipitaciones pluviales.

Las investigaciones en amaranto se han enfocado a la caracterización física y bioquímica de proteínas de reserva del grano [4, 5, 67], mejoramiento de la calidad nutricional de cultivos de interés comercial como son papa y maíz [6, 7]; sobre-expresión de la globulina 11S en sistemas como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* o plantas de tabaco [8, 9, 10], sustitución de ingredientes en la elaboración de alimentos [11, 12, 13], suplementación de dietas en pacientes con diversas enfermedades [14, 15, 16], sustitución de proteína animal en alimentación de animales de engorda [17, 18], desarrollo de películas comestibles para empaque de alimentos [19], como preservador granos en silos [20], aprovechamiento del almidón [21], y bioremediación de suelos contaminados con metales pesados o hidrocarburos cíclicos tóxicos [22, 23]. Algunos reportes citan la presencia de péptidos antifúngicos, antimicrobianos y antivirales; pero no existen reportes de la caracterización de péptidos con diversas actividades biológicas que sean de interés para mejorar la salud humana y que den a amaranto un valor agregado para su explotación comercial.

Por otra parte, el almidón de amaranto es una fracción importante que no se utilizado comercialmente. Posee características sobresalientes como lo son un tamaño de gránulo muy pequeño (1-3 μ m), y un alto contenido de amilopectina (99%) [2]; haciéndolo muy interesante desde el punto de vista de elaboración de

productos alimenticios con propiedades funcionales diferentes a los almidones tradicionales; así como también en la obtención de almidones modificados que ofrezcan nuevas características de interés industrial. Para lograr este objetivo es necesario conocer la naturaleza física de los gránulos de almidón de amaranto, ya que hasta la fecha no se encuentran estudios básicos enfocados a su caracterización física (distribución, tamaño y morfología). De manera similar, las proteínas asociadas a los gránulos de almidón de amaranto, podrían funcionar como determinantes genéticos que rigen la biosíntesis, conformación estructural y funcionalidad de estos gránulos, por lo que la caracterización de estas proteínas, mediante herramientas como la proteómica, dará como resultado información relevante que ayude a diseñar genéticamente almidones de características deseadas. La combinación de los estudios de morfología obtenidos mediante microscopia de fuerza atómica (MFA) en conjunto con el estudio de las proteínas asociadas a gránulos de almidón mediante proteómica será una herramienta poderosa en el diseño de almidones modificados.

De esta manera se propone al amaranto como un alimento funcional el cual puede aportar muchos beneficios a la salud y además puede explotarse comercialmente como un producto de alto valor agregado.

3.2 HIPÓTESIS.

- I. Las nuevas variedades de *Amaranthus hypochondriacus* DGETA y Gabriela pueden ser cultivadas en regiones semiáridas de San Luis Potosí.
- II. Las proteínas de reserva de amaranto contienen péptidos activos con diferentes actividades biológicas.
- III. Las proteínas de reserva de amaranto contienen el péptido anticarcinogénico tipo Lunasin.
- IV. Los gránulos de almidón de amaranto presentan la misma estructura que los gránulos de cereales.

3.3 OBJETIVOS.

3.3.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí, mediante estudios morfológicos y proteómicos.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- I. Estudiar la adaptabilidad de *Amaranthus hypochondriacus* a condiciones adversas de cultivo.
- II. Obtener el perfil de péptidos bioactivos en proteínas de reserva de amaranto
- III. Caracterización de los péptidos bioactivos de fracción glutelinas.
- IV. Caracterizar el péptido lunasin en amaranto.
- V. Caracterizar mediante análisis proteómico las proteínas que se encuentran asociadas a gránulos de almidón y analizar la estructura interna del gránulo de almidón mediante MFA.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 MATERIALES.

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* fueron cultivadas en el CBTa 196 de Villa de Pozos en San Luis Potosí. Para la caracterización se emplearon dos variedades comerciales (Criolla y Nutrisol) y dos nuevas variedades (DGETA y Gabriela). Las semillas se molieron y tamizaron hasta obtener una harina de malla No. 100. La harina se desengrasó por 4 h con hexano en una relación harina/hexano 1:10 (p/v) en agitación magnética a 4°C. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4°C. La pastilla resultante libre de grasa se secó a temperatura ambiente. Las semillas y harina tanto entera como desengrasada se almacenaron a 4°C hasta su uso.

4.1.2 REACTIVOS.

Todos los reactivos empleados fueron comprados en SIGMA (San Luis Missouri), a menos que sea especificado de otra compañía. El hexano (American Burdick & Jackson, Muskegon, MO) empleado para desengrasar las muestras fue grado analítico, con una pureza mayor al 85%. La albúmina de suero bovino (ASB) se obtuvo con una pureza mínima de 98%. Tris [hidroximetil]aminometano hidrocórico (Tris-HCl) fue grado biotecnológico certificado, con una pureza mínima de 99%. Los reactivos de electroforesis fueron comprados en Biorad (Hercules, California). Los reactivos para Western blot fueron adquiridos en Amersham Biosciences (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway Nueva Jersey).

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

4.2.1.1 RENDIMIENTO EN CAMPO.

La semilla de *Amaranthus hypochondriacus* fue cultivada en el CBTa 196 de Villa de Pozos, en San Luis Potosí. El método experimental fue de bloques completos aleatorios con 5 bloques por variedad. Las semillas se depositaron manualmente con espaciamiento de 30 cm entre semilla y semilla en cuatro líneas de 6 m de largo y 80 cm de separación entre línea y línea. Las plantas se regaron dos veces; una al inicio del experimento para la preparación del suelo (abril 2002), y la segunda 4 meses después (agosto 2002). Se midió la altura de la planta desde el suelo hasta la punta de la espiga una vez que la elongación del tallo se completó (noviembre 2002). Las semillas se cosecharon manualmente y el rendimiento fue calculado en ton/hectárea de superficie sembrada.

4.2.1.2 TAMAÑO DE SEMILLA.

La determinación del tamaño de semilla se llevó a cabo manualmente con un vernier de precisión. Se seleccionaron al azar 100 semillas de cada variedad para realizar las mediciones y se obtuvo la media aritmética. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

4.2.1.3 PESO DE 100 GRANOS.

La determinación del peso hectolítrico se llevó a cabo pesando 100 semillas de cada variedad tomadas al azar. Esta determinación se realizó por triplicado.

4.2.1.4 COMPOSICIÓN PROXIMAL.

El contenido de nitrógeno (método 954.01), grasa (método 920.39), cenizas (método 923.03), fibra (método 962.09) y humedad (método 925.09) de las

harinas de las cuatro variedades se determinó de acuerdo a los procedimientos estándar de la AOAC [68]. El nitrógeno se determinó con un sistema Kjeltex (Tecator, Suiza). La proteína se calculó como el contenido de nitrógeno x 5.85. El contenido de lípidos se determinó con una extracción de 4 h. Las cenizas se calcularon a partir del peso remanente de una muestra calcinada a 550°C por 2 h. El contenido de humedad se determinó con base en la pérdida de peso después de secar las muestras a 110°C por 4h. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.2.2 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA.

4.2.2.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

La extracción de proteínas se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Barba de la Rosa y col. [4]. La fracción de albúminas más nitrógeno no proteínico (NNP) se obtuvo a partir de harina desengrasada y se empleó como agente de extracción agua destilada. Las suspensiones de harina/solvente (1:10 p/v) se extrajeron con agitación magnética por 1h a 4°C y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se colectó y congeló para análisis posterior. La pastilla resultante se resuspendió en 0.1 M NaCl, 0.010 M K₂HPO₄, pH 7.5, 0.001 M EDTA para la extracción de globulinas 7S; y se siguió el procedimiento de extracción arriba mencionado. La fracción de globulinas 11S se obtuvo con el buffer 0.8 M NaCl, 0.010 M K₂HPO₄, pH 7.5, 0.001 M EDTA. Las prolaminas se obtuvieron con una solución de etanol al 70% y finalmente las glutelinas con una solución 0.1 M de NaOH. Los sobrenadantes se colectaron y almacenaron a -20°C hasta su uso. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES.

Las fracciones de proteínas se cuantificaron con el kit Protein assay de Biorad (Hercules, California) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

4.2.2.3 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.

La determinación de aminoácidos se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de fase reversa (RP-HPLC) con el kit AccQ-Tag (Waters) para análisis de aminoácidos. Se emplearon 200 μ l de cada fracción de proteína o 5 mg de harina de cada una de las variedades. Se hidrolizaron con HCl 6N for 24 h a 110°C en un sistema al vacío; se añadieron uno o dos cristales de fenol como trampa de O₂. Las muestras se neutralizaron con NaOH 1.2 N y rehidrataron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las muestras se derivaron con el reactivo AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate). El análisis se llevó a cabo aplicando 5 μ l de muestra a la columna. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.2.2.4 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS UNIDIMENSIONAL.

La electroforesis de proteínas Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Laemmli [69]. Todos los geles fueron al 15% de poliacrilamida y se corrieron en un sistema Mini-Protean III de Biorad. La reducción de puentes disulfuro se llevó a cabo con mercaptoetanol (5% v/v) a 100°C for 1 min. Las condiciones de corrida de electroforesis se realizaron con una corriente constante de 20mA por gel por 1-2 h. Después de la electroforesis los geles se tiñeron toda la noche con Azul de Commasie Brillante G250 en una concentración final de 0.25%. El desteñido se llevó a cabo lavando el gel con una solución de 50% de metanol + 2% ácido acético durante 2-4 h. Los geles fueron fotografiados en un equipo Kodak para su análisis posterior.

4.2.2.5 ELECTROFORESIS DE PRETEÍNAS BIDIMENSIONAL.

Se cargó 100 μ g de proteína en tiras inmovilizadas de pH 3-10 lineal de 7 cm (GE Healthcare). Las tiras se rehidrataron por 14 h a temperatura ambiente. Antes de cargar las proteínas se agregaron las concentraciones indicadas de DTT y anfolinas de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se corrió el isoelectroenfoque en un IPGPhor (GE Healthcare) de acuerdo con las

especificaciones del proveedor. Una vez realizado el isoelectroenfoque se procedió a la separación por peso molecular o se almacenaron a -20°C hasta por un mes. Antes de correr la segunda dimensión las tiras se equilibraron por 15 min en buffer de equilibrio (6M Urea; 30% glicerol; 2% SDS; 50mM Tris-HCl, pH 8.8; 1% DTT). La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó en un sistema Mini Protean III, donde se colocó la tira y se selló con agarosa con azul de bromofenol para seguir el frente de la corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, agarosa 0.5%, azul de bromofenol 0.002%) de igual manera que la electroforesis unidimensional. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie Brillante G250. El análisis de los geles se llevó a cabo con el software Image Master de GE Healthcare [60].

4.2.2.6 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

El ADN fue extraído de hojas jóvenes de las cuatro variedades de amaranto, mediante el protocolo de Dellaporta y col. [70]. La cuantificación de ADN se realizó espectrofotométricamente tomando la absorbancia a 260 nm. El protocolo de RAPD-PCR se realizó de acuerdo a lo reportado por Chan y col. [71], con pequeñas modificaciones. La **Tabla 4** muestra los componentes de la mezcla de PCR y se realizó en un volumen final de 25 μl . Los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla 5**. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador i-Cycler (Biorad). Las condiciones de amplificación se muestran en la **Tabla 6**. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 1.4 % (1X TAE) y se tiñeron con bromuro de etidio.

Tabla 4. Mezcla de reacción para PCR.

| Reactivo | Concentración |
|-------------------|-----------------|
| MgCl ₂ | 3 mM |
| Oligonucleótidos | 0.2 pmol |
| DNA genómico | 30 ng |
| dNTP's | 0.2 mM |
| Buffer PCR | 1X |
| H ₂ O | --- |
| Taq Polimerasa | 2.5 ml (0.05 U) |

Tabla 5. Condiciones de PCR para RAPD.

| Número de ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------------------|-------------|--------|
| 1 | 94°C | 2 min |
| 45 | 94°C | 1 min |
| | 35°C | 2 min |
| | 72°C | 2 min |
| 1 | 72°C | 7 min |

Tabla 6. Oligonucleótidos para RAPD.

| Número | Secuencia |
|--------|------------|
| 13 | cctgggtgga |
| 17 | cctgggcctc |
| 23 | ccgcctccc |
| 30 | ccggccttag |
| 34 | ccggcccaa |
| 43 | aaaaccgggc |
| 65 | aggggcggga |
| 77 | gagcaccagg |
| 81 | gagcacgggg |
| 85 | gtgctcgtgc |
| 88 | cgggggatgg |
| 90 | gggggtagg |
| 95 | ggggggttg |
| 98 | atcctgccag |

4.2.3 CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS EN PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO.

4.2.3.1 PREDICCIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS EN PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO.

Se realizó una búsqueda de las secuencias de proteínas reportadas para *Amaranthus sp.* en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Estas secuencias fueron analizadas para obtener el perfil de péptidos activos que están presentes en proteínas de reserva de amaranto usando la base de datos <http://www.uwm.biohemia.edu.pl/biochemia>.

La frecuencia de ocurrencia (A) de un péptido bioactivo en una proteína está dada por la ecuación:

$$A = \frac{a}{N}$$

Donde a = Número de residuos de aminoácidos del fragmento que forma el péptido bioactivo en una secuencia de proteína; N = Número de residuos de aminoácidos de la proteína.

La frecuencia de los péptidos identificados fueron graficados. En el eje x se encuentran las proteínas de reserva de amaranto. En el eje y se graficaron las actividades encontradas y en el eje z se lee la frecuencia de ocurrencia de cada biopéptido en una proteína dada [50].

4.2.3.2 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS EN LA FRACCIÓN GLUTELINAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC MS/MS).

Debido a que la fracción de glutelinas es una de las más importantes se empleó para la identificación de péptidos activos en proteínas de reserva de amaranto. La fracción glutelinas se digirió con tripsina siguiendo el protocolo reportado por Kinter y Sherman [72]. Se tomó una alícuota de las glutelinas y se precipitaron para obtener 200 μg de proteína. La pastilla se resuspendió en 250 μl de buffer de urea (Urea 6M, Tris 100 mM pH 7.4). La muestra se redujo con DTT y se alquiló con iodoacetamida. La digestión se realizó con tripsina en una relación 1:50 por 14 horas a 37°C. La reacción se detuvo ajustando el pH a 6 con ácido acético concentrado.

El análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se llevó a cabo en un sistema que consiste de un HPLC Agilent 1200 (Palo Alto, CA) acoplado a un espectrómetro de masas QTRAP 3200 de Applied Biosystems

(Foster City, California) equipado con una fuente de ionización NanoTM ion spray de la unidad de espectrometría de masas del CINVESTAV-IPN en México. La separación cromatográfica se realizó con una columna Zorbax 300SB C18 (150 X 0.075 mm, 3.5 μ m). Los solventes de HPLC consistieron en A: 98% H₂O (v/v), 2% acetonitrilo (v/v) mas 0.01% de ácido fórmico; y B: 98% acetonitrilo (v/v), 2% H₂O (v/v) mas 0.01% de ácido fórmico. Se cargaron 10 μ l de muestra a la columna. Después de 30 min de equilibrio con 90% de fase A, los péptidos fueron eluidos directamente en la fuente de ionización de electroespray con un gradiente de 10 a 60 % de fase B a un flujo de 400 nL/min. La identificación de péptidos se realizó usando MASCOT (Matrix Sciences, <http://www.matrixscience.com/>). La identificación de péptidos bioactivos se realizó haciendo una búsqueda en la base de datos para péptidos activos (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>).

4.2.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LUNASIN.

4.2.3.2.1 CUANTIFICACIÓN POR ENSAYOS DE ELISA.

Se empleó un ensayo competitivo indirecto. Se colocaron 100 μ l tanto de extractos proteínicos totales o de cada una de las fracciones de cada variedad en una placa para ensayos de ELISA de 96 pozos Nunc Maxisorp, con alta afinidad por proteínas. Se preparó una curva estándar de lunasin sintético en agua destilada en un intervalo de concentración de 24-72 ng/ml. Las muestras, los estándares y los blancos (agua destilada) se dejaron incubar por 14 h a 4°C. Se realizó un lavado de 6 tiempos con 300 μ l de buffer de lavado (10mM PBS y 50mM Tween 20) a la mínima velocidad de inyección (150 μ l/pozo/s) y una velocidad de aspiración de 5mm/s) para evitar el desprendimiento de proteína. Los pozos se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente añadiendo 300 μ l por pozo de TBS (50mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) mas 1% de Tween 20 y 5% de BSA. Después de un lavado, la placa se incubó con 50 μ l de una dilución 1:1000 del anticuerpo de Lunasin monoclonal en buffer de anticuerpo (TBS, 3% BSA, 1% Tween 20). Después de un lavado la placa se incubó por 1h con 50 μ l

de una dilución 1:2000 del anticuerpo secundario (IgG anti-ratón con un conjugado de fosfatasa alcalina). Las placas se lavaron y se les añadió 100 μ l de TMB (3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina) para desarrollar la reacción colorida por 1 h. La reacción fue detenida con NaOH 2N y las placas se leyeron a 450nm en un lector de ELISA (Elx 808 IU, Biotek Instruments; Winooski, VT). La concentración de lunasin se expresó como μ g/g de proteína total [73].

4.2.3.2.2 IDENTIFICACIÓN POR WESTERN BLOT.

Los extractos de proteína total y las fracciones de proteína se prepararon a una concentración de 2 mg/ml. Se diluyeron en una relación 1:1 con buffer de tris-tricina y se hirvieron por 5 min. Se aplicaron 20 μ l de cada muestra a los geles de poliacrilamida para polipéptidos. Los geles se corrieron por duplicado en un sistema Mini Protean-III a 25 mA constantes por gel por 180 min, usando buffer de Tris-Tricina-SDS como buffer de corrida. Uno de los geles se utilizó para una tinción de Coomassie mientras el otro se colocó en 50 ml de buffer de transferencia (25mM Tris, 192 mM glicina, pH 8.3, 10% metanol v/v) por espacio de 15 min. Se llevó a cabo una transferencia a una membrana PVDF. Las condiciones de transferencia húmeda se fijaron a 300 mA constantes (\approx 100 V) por 90 min a 4°C [74]. Después de la transferencia la membrana se enjuagó dos veces en buffer TBS (20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5). La membrana se bloqueó por 1 h usando 2% de reactivo para bloquear avanzado ECL (GE Healthcare Bio-Science Corp. Piscataway NJ) mas 0.1% de Tween 20 en buffer TBS. Se realizaron dos lavados de 15 min con buffer TTBS (buffer TBS + 0.1% de Tween 20). La membrana se incubó toda la noche a 4°C en una dilución 1:10000 del anticuerpo policlonal Lunasin en buffer de anticuerpo (2% de reactivo para bloquear avanzado ECL en buffer TBS). Después de los lavados con TTBS se incubó con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina) en una dilución 1:10000 [73]. Después de los lavados con buffer TTBS, se realizó la detección con sustrato del kit Inmuno-químico luminiscencia de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las fotos fueron tomadas en una estación de imágenes Kodak 440FC.

4.2.3.2.3 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN.

Los ensayos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo para purificar la proteína correspondiente al péptido tipo Lunasin de amaranto. La inmunoprecipitación se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Bhat y col. [75]. Se realizó un paso de pre-purificación en el cual 250 μ l de la fracción de proteína concentrada a 2.5 mg/ml más 2.5 μ l de anticuerpo IgG anti-conejo no específico más 25 μ l de las proteínas A/G adheridas a perlas de agarosa. La reacción se incubó a 4°C en un mezclador de extremo a extremo por 1h. Las muestras se centrifugaron 5 min a 10000 x g a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y preenfriado. Se tomaron 200 μ l de la muestra pre-clarificada y se agregaron 300 μ l de buffer RIPA (Radio Immuno Precipitation assay) más 2 μ l de anticuerpo policlonal anti-lunasin y se mezclaron a 4°C en el agitador extremo a extremo por espacio de 1 h. Después de la incubación se añadieron 25 μ l de las perlas de azarosa con las proteínas A/G y se mezclaron en el agitador extremo a extremo a 4°C toda la noche. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron 1 min a 10000 x g. La pastilla formada se lavó 5 veces con 500 μ l de buffer RIPA. Después del último lavado, la pastilla se resuspendió en 100 μ l de buffer de carga para geles de tris-tricina. Las muestras se hirvieron por 5 min y una alícuota de 20 μ l se aplicó a geles de polipéptidos. Se corrieron geles por duplicado para teñir con Coomassie y realizar Western blot.

4.2.3.2.4 MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization).

Se llevó a cabo un análisis mapeo de huellas de masas MALDI para confirmar la identidad de lunasin mediante un Voyager-DE STR (Applied Biosystems) en la Unidad del Centro de Proteínas de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. La banda correspondiente al peso molecular identificado por Western Blot se cortó del gel de poliácridamida de la inmunoprecipitación. La identidad de la banda se estableció comparando el mapa de masas de péptidos con el mapa predicho de péptidos para Lunasin de la digestión trípica. El

análisis se llevó a cabo usando MASCOT (Matrix Sciences, <http://www.matrixscience.com/>) [76].

4.2.4 CARACTERIZACIÓN DE GRÁNULOS DE ALMIDÓN DE AMARANTO.

4.2.4.1 EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN.

El almidón se obtuvo a partir de harina de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). La extracción se realizó con una solución de cloruro de mercurio 10mM, para inhibir la acción enzimática y evitar daños a los gránulos, en una relación 1:2 (harina:solución de extracción) por 24h a 5°C [77]. Después de este periodo la suspensión se cribó en una malla 40, 100 y 200 y se lavó con agua destilada hasta obtener una masa de color amarillo sin salida aparente de líquido con residuos de almidón. La solución obtenida se dejó decantar por 24h a 4°C. El precipitado se resuspendió en una solución de cloruro de sodio 0.1 M:tolueno (7:1, v/v) y se mantuvo en agitación toda la noche. La muestra se centrifugó a 4000 rpm por 15 min. La pastilla obtenida se resuspendió con la mezcla de cloruro de sodio 0.1 M:tolueno (7:1, v/v) y se mantuvo en agitación toda la noche seguido de la centrifugación a 4000 rpm durante 15 min. La pastilla obtenida se dejó reposar por 12 h a temperatura ambiente para eliminar los residuos de tolueno. Posteriormente se molió y se tamizó en malla 40 para obtener el almidón puro. Se almacenó en contenedores plásticos sellados a 4° C hasta su uso.

4.2.4.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A GRÁNULOS DE ALMIDÓN.

La extracción de proteínas asociadas a gránulos de almidón se realizó de acuerdo a lo reportado por Boren y col. [60]. Una muestra de 1 g de almidón se lavó 3 veces con 10 ml del buffer B (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT) y 2 veces con el buffer de lavado de SDS (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, DTT 10 mM, 2% SDS) para eliminar cualquier proteína de reserva que permanezca después del aislamiento de almidón. Las proteínas se extrajeron por gelificación

del almidón. El almidón lavado se hirvió por 15 min con 20 ml de buffer de lavado SDS. La pasta resultante se congeló 1h y se descongeló durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min. El sobrenadante es la fracción que contiene las proteínas asociadas a gránulos de almidón. Las proteínas fueron concentradas con ácido tricloroacético (TCA) en acetona al 30% y la pastilla resultante, se resuspendió en buffer de rehidratación (Urea 8 M, 2% CHAPS, 0.002% Azul de bromofenol).

4.2.4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL GRÁNULO DE ALMIDÓN

Los estudios de Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) se realizaron usando un equipo Jeol JSPM-5200 Scanning Probe Microscope. Se escanearon cortes de gránulos de almidón a temperatura ambiente en atmósfera de aire, las muestras se escanearon en modo intermitente y se obtuvieron imágenes de topografía y fases. Se utilizaron puntas de nitruro de silicio y los barridos se hicieron de 1 – 50 μm .

Para obtener imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se empleó un equipo Philips XL30 SFEG. Se observaron gránulos de almidón recubiertos con oro, en modo de electrones secundarios con un voltaje de 1-25 KV para obtener ampliaciones de 100X - 50000X. Además, con el mismo equipo se determinó la composición cualitativa de la muestra.

4.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizaron análisis estadístico y se empleó la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre las medias. Las tendencias se consideraron significativas cuando un grupo de medias comparadas fue diferente a una $p= 0.05$ [78].

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS SEMILLAS DE AMARANTO CULTIVADAS EN SAN LUIS POTOSÍ.

5.1.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

Las semillas de amaranto fueron cultivadas en San Luis Potosí bajo condiciones limitadas de riego. La **Tabla 7** muestra las principales propiedades físicas evaluadas. Las variedades Criolla y DGETA fueron significativamente diferentes y tuvieron un mayor rendimiento en campo (1474.7 y 1421.9 kg/ha respectivamente); seguidas de la variedad Gabriela (1203.6 kg/ha) y Nutrisol (1121.2 kg/ha). El rendimiento de amaranto puede ser comparado con otros cultivos comercialmente importantes como soya (1700 kg/ha) y maíz (1800 kg/ha) [34]. El análisis estadístico mostró que el peso de 100 semillas de la variedad Gabriela fue significativamente mayor que el de las demás, seguido de la variedad DGETA, Criolla y Nutrisol. El rendimiento de harina también mostró diferencias significativas agrupando a las variedades Criolla y Gabriela con mayor rendimiento seguidas de DGETA y Nutrisol.

Tabla 7. Propiedades físicas de las semillas de amaranto cultivadas en San Luis Potosí.

| Variedad | Rendimiento de semilla (kg/ha) | Peso de 100 semillas (mg) | Rendimiento de harina (%) |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Criolla | 1474.7 ^{a/a} | 6.1 ^{c/c} | 87.3 ^{b/a} |
| DGETA | 1421.9 ^{a/a} | 6.9 ^{c/b} | 89.1 ^{b/b} |
| Gabriela | 1203.6 ^{a/b} | 7.4 ^{c/a} | 87.6 ^{b/a} |
| Nutrisol | 1121.2 ^{a/c} | 6.3 ^{c/c} | 88.2 ^{b/b} |

Las medias que no comparten letras superíndices comunes son significativamente diferentes a $p=0.05$ por la prueba de intervalo múltiple de Tukey.

5.1.1.1 VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA ESPECIE MEDIANTE ANÁLISIS DE RAPD.

La **Figura 6** muestra los productos de amplificación de las muestras de ADN de las 4 variedades con los 14 oligonucleótidos empleados para el ensayo RAPD.

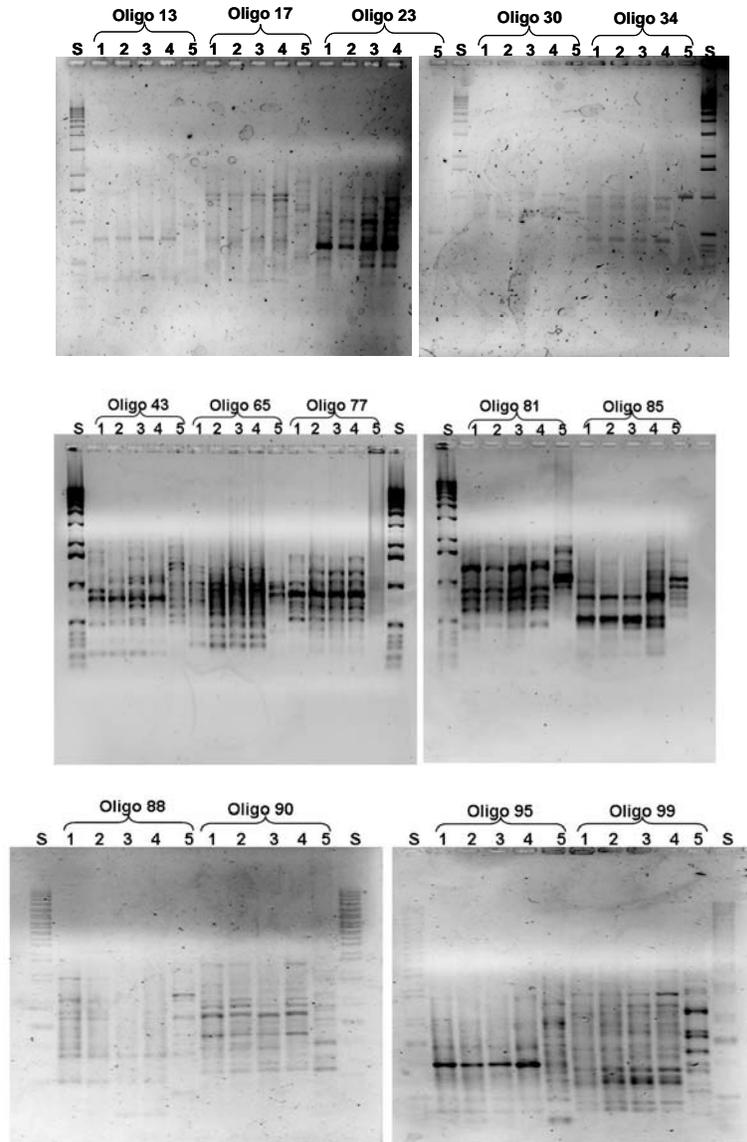


Figura 6. Productos de amplificación de las cuatro variedades de amaranto para el ensayo RAPD. S, MPM 1 kb; 1, Criolla; 2, DGETA; 3, Gabriela; 4, Nutrisol; 5, control negativo.

Los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos 13, 17, 30, 34, 65, 77, 95 y 99 no mostraron tener polimorfismo entre variedades. Los oligonucleótidos 23, 43, 81, 85, 88 y 90 mostraron diferencias en el patrón de amplificación entre variedades.

Los oligonucleótidos 23, 43, 81, 85, y 90 dieron diferencias entre todas las variedades, mientras que el oligonucleótido 88 agrupa a las variedades Criolla y DGETA como iguales y a las variedades Gabriela y Nutrisol en otro grupo.

Chan y col. [71] estudiaron la diversidad genética y relaciones entre 23 especies de amaranto tanto silvestres como cultivadas; donde todas las especies de amaranto mostraron ser polimórficas a nivel ínter especie. También reportaron que existe un alto grado de diversidad a nivel intra especie, pero la variabilidad genética entre plantas de la misma especie mostró un alto grado de uniformidad. Un análisis más detallado y con un mayor número de oligonucleótidos es necesario para determinar con exactitud las diferencias entre estas cuatro especies.

5.1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS SEMILLAS DE AMARANTO.

La composición química del grano de amaranto permite conocer su calidad para el consumo humano. La **Tabla 8** muestra la composición proximal de las harinas de las cuatro variedades de amaranto. El contenido de proteína es superior al contenido de proteína reportado para cereales [3]. La variedad con el más alto contenido de proteína fue Gabriela (17.3%) seguido de las variedades Criolla y Nutrisol con (15.0 y 15.3 %, respectivamente) y finalmente DGETA con 14.8%. El contenido de lípidos fue similar entre las 4 variedades y se encuentra presente en proporciones altas (7.9-8.9 %) comparados con los reportados para cereales como el trigo (2.1 %) y maíz (4.5 %). Se ha reportado que el aceite de semillas de amaranto contiene alto grado de insaturación siendo los principales

componentes el ácido linoleico (alrededor del 70%), ácido linolénico (1%), y ácido estérico (20%). El contenido de cenizas fue comparable con lo reportado en la literatura para otras especies de amaranto [3].

Tabla 8. Análisis proximal de las semillas de amaranto cultivadas en San Luis Potosí.

| Variedad | Proteína (%)* | Grasa (%) | Cenizas (%) | Fibra (%) |
|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Criolla | 15.0 ^{a/b} | 8.1 ^{b/c} | 3.3 ^{c/c} | 2.2 ^{d/b} |
| DGETA | 14.8 ^{a/b} | 7.9 ^{b/c} | 3.3 ^{c/c} | 1.9 ^{d/c} |
| Gabriela | 17.3 ^{a/a} | 8.9 ^{b/a} | 3.9 ^{c/a} | 2.5 ^{d/a} |
| Nutrisol | 15.3 ^{a/b} | 8.6 ^{b/b} | 3.5 ^{c/b} | 2.0 ^{d/c} |

*NX5.85. Las medias que no comparten letras superíndices comunes son significativamente diferentes a $p=0.05$ por la prueba de intervalo múltiple de Tukey.

Las fracciones proteínicas de amaranto se muestran en la **Tabla 9**. Las fracciones de albúminas y globulinas comparten valores similares. La variedad Gabriela mostró el menor contenido de albúminas (30.4%) y el mayor contenido de fracción globulinas (42.3%). Segura-Nieto y col. [3] reportaron que la relación albúminas:globulinas depende del método de extracción empleado. Las glutelinas de amaranto son la fracción menos estudiada. Esta fracción es la segunda en importancia en las proteínas de reserva de semillas de amaranto con valores de 24.4 a 28.2 % (**Tabla 9**).

Tabla 9. Fracciones proteínicas de amaranto cultivado en San Luis Potosí.

| Variedad | Albúminas | Globulinas | Prolaminas | Glutelinas |
|-----------------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| Criolla | 33.2 ^{ab/a} | 38.7 ^{a/a} | 1.7 ^{c/a} | 24.4 ^{b/a} |
| DGETA | 34.5 ^{a/a} | 33.1 ^{a/a} | 1.6 ^{b/a} | 28.2 ^{a/a} |
| Gabriela | 30.4 ^{b/a} | 42.3 ^{a/a} | 1.5 ^{a/a} | 25.3 ^{b/a} |
| Nutrisol | 34.5 ^{a/a} | 30.5 ^{ab/a} | 1.6 ^{c/a} | 25.9 ^{b/a} |

Las medias que no comparten letras superíndices comunes son significativamente diferentes a $p=0.05$ por la prueba de intervalo múltiple de Tukey.

La composición de aminoácidos de las harinas de amaranto se muestra en la **Figura 7**. Se puede observar que de acuerdo a lo reportado por la FAO [38], todas las harinas muestran una composición superior excepto DGETA.

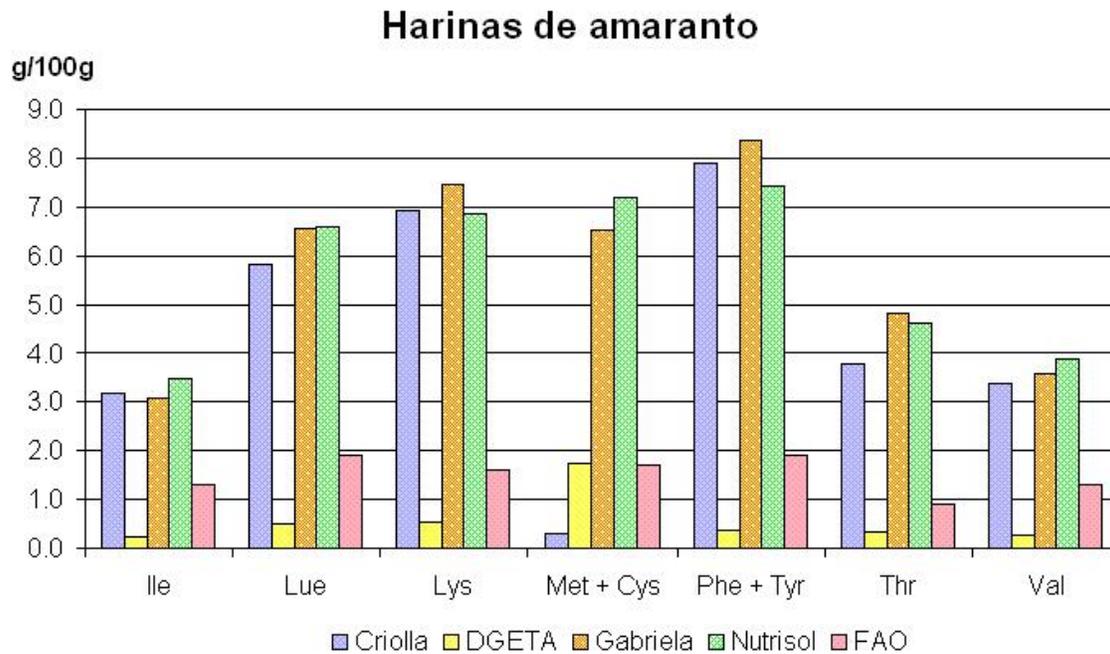


Figura 7. Composición de aminoácidos de harinas de amaranto cultivado en San Luis Potosí.

La composición de aminoácidos determina las principales propiedades físicas y químicas de las proteínas como lo son *pI*, solubilidad y calidad nutricional. Más aún, la composición de aminoácidos influye en las propiedades funcionales como espumación, capacidad de absorción de agua y aceite, emulsificación, entre otras [79]. La **Figura 8** muestra la composición de aminoácidos de las diferentes fracciones de las proteínas de reserva de amaranto. Existen diferencias entre variedades y fracciones. En general, las fracciones con mayor balance de aminoácidos fueron albúminas, las globulinas 11S y glutelinas que tuvieron una composición similar. Aunque los datos concuerdan con lo reportado en la literatura se sabe que las variaciones encontradas se deben principalmente al método de análisis empleado y la variedad de amaranto utilizada [2].

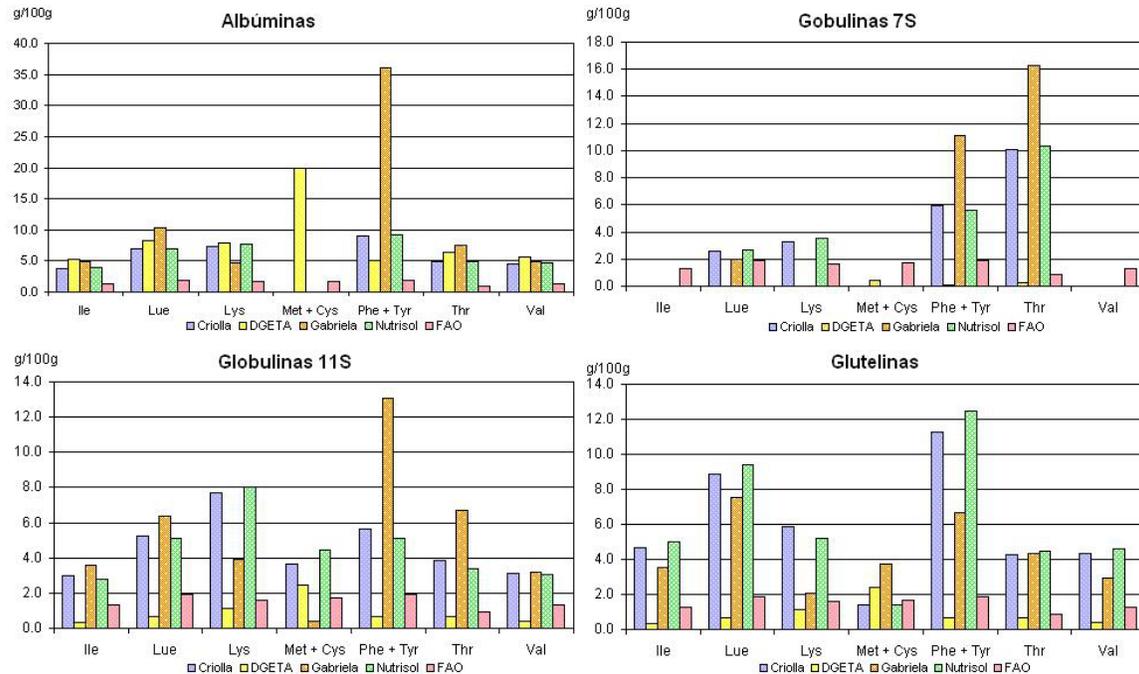


Figura 8. Composición de aminoácidos de las fracciones de proteínas de reserva de amaranto cultivado en San Luis Potosí.

5.1.3 PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO.

El análisis electroforético fue llevado a cabo bajo condiciones desnaturizantes. Todas las extracciones fueron hechas con harinas desengrasadas. La fracción albúminas mostró en todas las variedades una banda característica a 34kDa como lo reportó Barba de la Rosa y col. [4] (**Figura 9**) Existen dos grupos principales de polipéptidos. El primero tuvo un peso molecular de 18 kDa y el segundo se encontró entre los pesos moleculares de 42 a 25 kDa. La fracción albúminas puede contener proteínas que pertenecen a la fracción globulinas, puesto que las sales y algunos aminoácidos libres en la semilla dan como resultado una concentración de sales naturales que facilitan la solubilización de globulinas. La fracción albúminas también puede contener péptidos que pertenecen a la fracción enzimática y que no pueden ser considerados dentro del grupo de proteínas de reserva [3, 4].

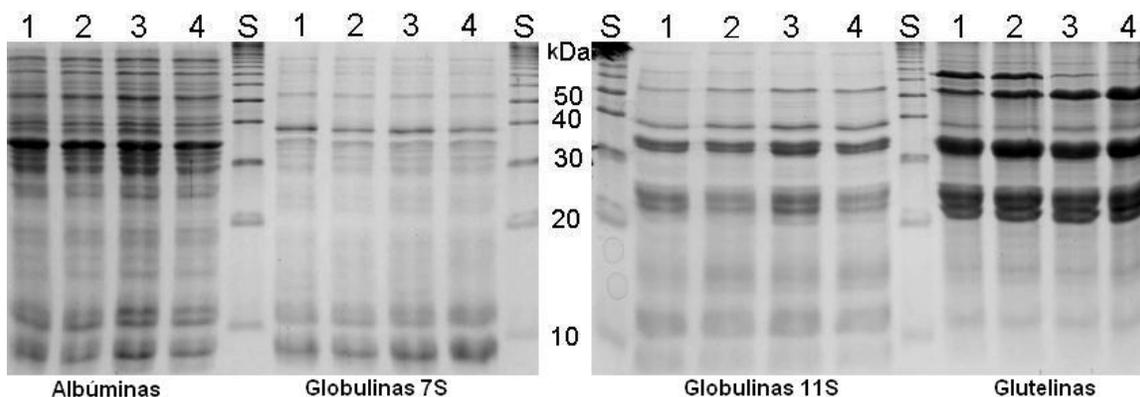


Figura 9. Patrón electroforético de la fracciones de proteínas de reserva de amaranto cultivado en San Luis Potosí. Carriles: S Marcador de peso molecular, 1 Criolla, 2 DEGTA, 3 Gabriela, 4 Nutrisol.

La fracción globulinas de amaranto puede dividirse en dos clases de proteínas; globulinas 7S y globulinas 11S. Las globulinas 7S se extrajeron con 0.1 M NaCl; estas proteínas están compuestas por tres subunidades principales llamadas α (57 to 68 kDa), α' (57 to 72 kDa), y β (42 to 52 kDa); que están unidas por enlaces no covalentes para formar un trímero de peso molecular de 170 a 200 kDa [3,4]. En la **Figura 9** se muestran algunas bandas arriba de 52 kDa y otras entre 50 y 35 kDa.

La fracción globulinas 11S de leguminosas está conformada por hexámeros con un peso molecular que varía entre 300 a 400 kDa. Los hexámeros están compuestos por un polipéptido ácido con un peso molecular de 30 a 40 kDa, y un polipéptido básico de 18 a 22 kDa [3, 4]. Estos polipéptidos (ácidos y básicos) están unidos por un puente disulfuro. La **Figura 9** mostró las bandas principales a 50 kDa, 38 kDa, 35 kDa, y 22 kDa que concuerda con lo reportado en la literatura [80].

La fracción glutelinas mostró una alta similitud con las globulinas 11S. Se observaron tres bandas principales a 38kDa, 35 kDa y 22kDa. Abugouch y col.

(2003) [81] sugieren que las glutelinas son un grupo de proteínas tipo globulinas que tienen una estructura hexamérica oligomérica de aproximadamente 300kDa. Por otra parte se pudo observar en que en esta fracción se encuentra presente una banda adicional a 65 kDa en las variedades Criolla y DGETA, que interesantemente, son las variedades con mayor rendimiento en campo, lo que sugiere que esta proteína podría estar involucrada potencialmente con algún mecanismo de tolerancia a estrés hídrico puesto que todas las variedades fueron cultivadas bajo condiciones limitantes de riego. Existen varios reportes de tolerancia de amaranto a sequía y se debe principalmente a que sin ser un pasto es una planta C4, que le confiere un mecanismo de fijación de carbono muy eficiente y con el cual se reduce la pérdida de energía debido a la fotorespiración en exceso de luz [2]. Sin embargo se necesita realizar otros estudios para determinar la naturaleza y caracterizar esta proteína adicional.

5.1.3.1 CARACTERIZACIÓN DE GLUTELINAS DE AMARANTO MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Debido a que las glutelinas de amaranto de la variedad criolla y DGETA presentaron una banda adicional a 65 kDa, se realizó una electroforesis bidimensional para observar si esta proteína es un conjunto de proteínas con mismo peso molecular y diferente punto isoeléctrico. Se realizó una separación por punto isoeléctrico lineal desde pH 3 hasta pH 10 en tiras de 7 cm. La separación por punto isoeléctrico se realizó en geles de poliacrilamida al 15% y la **Figura 10** presenta los geles de glutelinas variedad Criolla y Nutrisol respectivamente. Se puede observar que la banda en 65 kDa es solo una proteína.

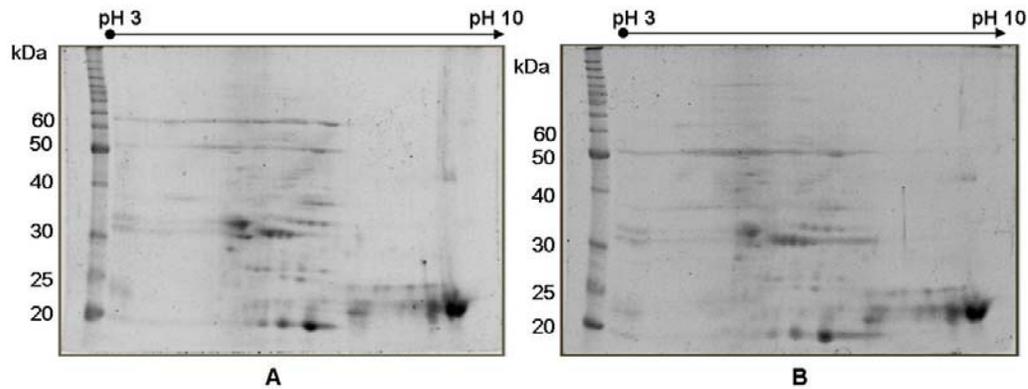


Figura 10. Patrón bidimensional de glutelinas de amaranto pH 3-10 lineal. A) Criolla, B) Nutrisol. Tiras de 7 cm.

El análisis de las manchas comparativas de las dos variedades fue realizado en el software Image master (GE Healthcare). La **Figura 11** muestra el análisis comparativo del patrón de manchas de las glutelinas Nutrisol comparadas contra la variedad Criolla. Se observaron en total 81 manchas de las cuales 57 son compartidas por las dos variedades; y 4 se encuentran en mayor concentración mientras que 9 se encuentran en menor concentración. 39 manchas se encuentran en las glutelinas Nutrisol y no en Criolla.

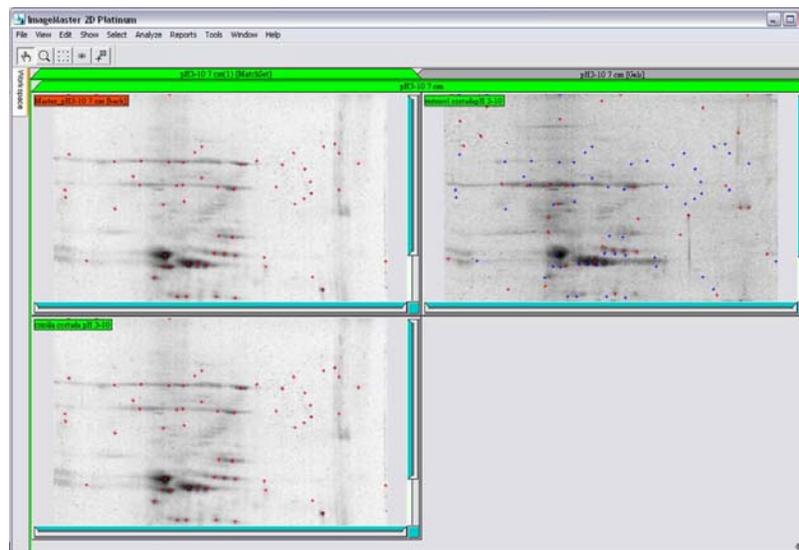


Figura 11. Comparación de glutelinas Criolla vs. Nutrisol pH 3-10 mediante Image Master (GE Healthcare).

Debido a que la mayoría de las proteínas se encontraron en un intervalo de pH de 5 a 10, se acotó el intervalo de pH entre 4 y 7 para separar mejor las proteínas tendencias ácidas (**Figura 12**). Se encontraron 20 proteínas totales de las cuales 19 están compartidas y sólo 1 es diferente. La mancha de peso molecular 65 kDa se encuentra muy cercana al extremo básico del gel y no se puede observar de manera clara si esta pertenece solo a una proteína o a un conjunto de proteínas que comparten el mismo peso molecular (**Figura 13**).

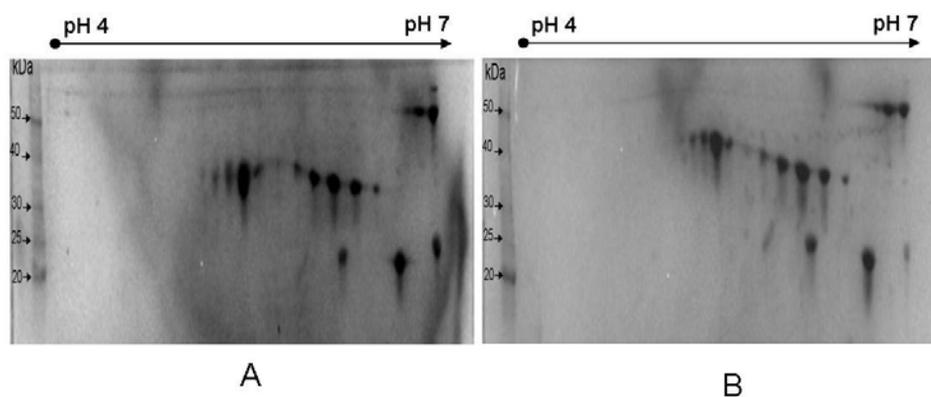


Figura 12. Patrón bidimensional de glutelinas de amaranto pH 4-7. A) Criolla, B) Nutrisol. Tiras 11 cm.

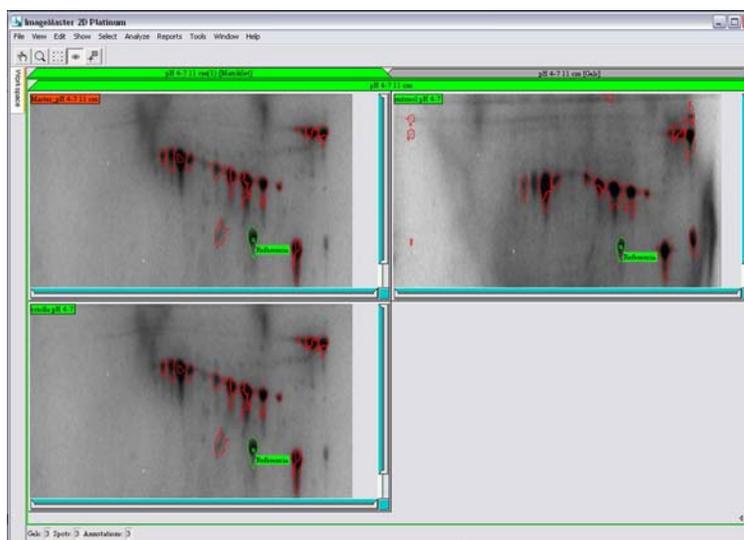


Figura 13. Comparación de glutelinas Criolla vs. Nutrisol pH 4-7 mediante Image Master (GE Healthcare). Tiras 11 cm.

De igual manera se analizó el extremo básico de glutelinas en el intervalo de pH 6-11 (**Figura 14**). El análisis de Image Master reveló que al comparar el patrón de la Variedad Criolla vs. Nutrisol; fueron observadas 15 manchas, de las cuales solo 14 están compartidas y una es diferente (**Figura 15**). En la variedad criolla se observa claramente que la proteína de peso molecular 65 kDa pertenece a una sola proteína. La disminución en el número de manchas en este gel puede ser debido a que en este rango de pH la cantidad de proteínas es mucho menor pero se observó una mejor separación.

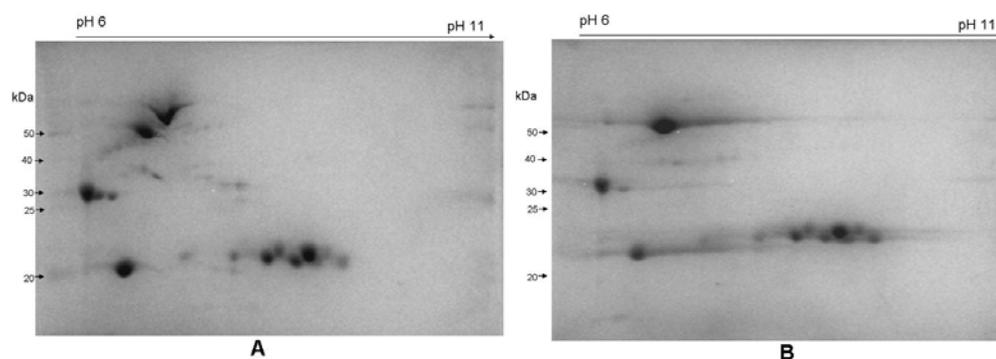


Figura 14. Patrón bidimensional de glutelinas de amaranto pH 6-11. A) Criolla, B) Nutrisol. Tiras 7 cm.

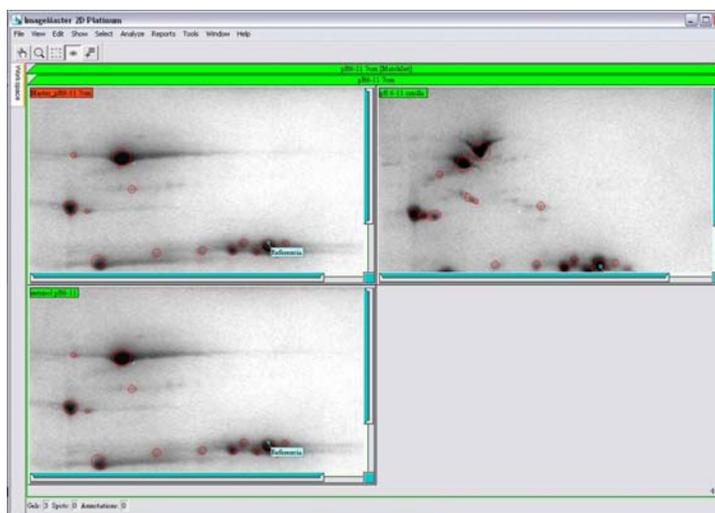


Figura 15. Comparación de glutelinas Criolla vs. Nutrisol pH 6-11 mediante Image Master (GE Healthcare). Tiras 11 cm.

Al separar las proteínas en gradientes de pH más cortos se pudo observar una mejor separación de las manchas que facilita los análisis posteriores de las mismas.

5.1.3.2 IDENTIFICACIÓN DE GLUTELINAS POR LC MS/MS.

Debido a la gran similitud entre el patrón de glutelinas de la variedad Criolla y Nutrisol, se corrió un gel preparativo con glutelinas de amaranto (100 μ g de proteína, pH 3-10, 7cm, 12 % gel de acrilamida) y se cortaron algunos puntos comunes para ser identificados por espectrometría de masas en la modalidad de LC MS/MS que permite la identificación de proteínas por “fingerprinting” y secuenciación *de novo*. La **Figura 16** muestra las manchas analizadas.

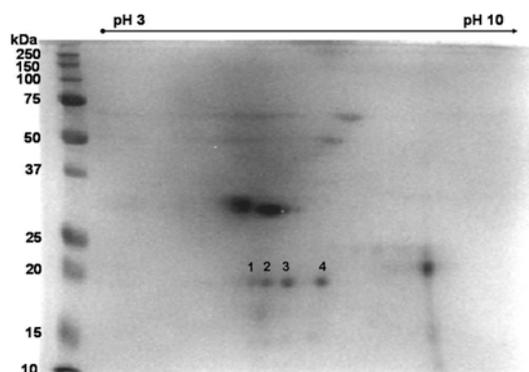


Figura 16. Glutelinas de amaranto variedad Criolla que fueron analizadas por LC MS/MS.

Los resultados se analizaron con el software PEAKS. La base de datos empleada fue NCBI nr, acotada al subreino *Viridiplantae*, se empleó como enzima de digestión a tripsina (grado secuenciación); los parámetros error de tolerancia de un patrón, error de tolerancia entre fragmentos, enzima de corte y modificaciones postraduccionales fueron fijados automáticamente por el software cuando se especificó el equipo usado (Quadrupole-TOF). La **Tabla 10** muestra las proteínas identificadas a partir de las manchas que se analizaron. Las manchas 1 y 3, y 2 y 4 respectivamente se identificaron como la misma proteína; tienen el mismo peso molecular (18.5 kDa) pero con diferente punto

isoeléctrico (mancha 1, pl 5.3, mancha 3, pl 6.9; mancha 2, pl 5.8 y mancha 4, pl 6.9), lo que podría sugerir que se trate de proteínas con diferente grado de fosforilación.

Tabla 10. Identificación de proteínas de glutelinas de amaranto mediante espectrometría de masas.

| Mancha | No. Acceso (NCBI) | Proteína | Fuente | Puntuación | % de cobertura |
|--------|--------------------------|---|--|------------|----------------|
| 1 | P84718_5 | [Segment 5 of 10] Putative oxygen-evolving enhancer protein 1 | Smith JA, Blanchette RA, Burnes TA, Jacobs JJ, Higgins L, Witthuhn BA, David AJ, Gillman JH. 2006. Proteomic comparison of needles from blister rust-resistant and susceptible <i>Pinus strobus</i> seedlings reveals upregulation of putative disease resistance proteins. <i>Mol. Plant Microbe Interact.</i> 19 (2), 150-160. | 84 | 91.67 |
| 2 | ABB60054 | 11S globulin precursor isoform 3 [Sesamum indicum]. | Lin LJ, Wang MMC, Tzen JTC. 2005. Gene families encoding 11S globulins and 2S albumins, the two major seed storage proteins in sesame. Unpublished | 100 | 3.67 |
| 3 | P84718_5 | [Segment 5 of 10] Putative oxygen-evolving enhancer protein 1 | Smith JA, Blanchette RA, Burnes TA, Jacobs JJ, Higgins L, Witthuhn BA, David AJ, Gillman JH. 2006. Proteomic comparison of needles from blister rust-resistant and susceptible <i>Pinus strobus</i> seedlings reveals upregulation of putative disease resistance proteins. <i>Mol. Plant Microbe Interact.</i> 19 (2), 150-160. | 90 | 91.67 |
| 4 | ABB60054 | 11S globulin precursor isoform 3 [Sesamum indicum]. | Lin LJ, Wang MMC, Tzen JTC. 2005. Gene families encoding 11S globulins and 2S albumins, the two major seed storage proteins in sesame. Unpublished | 97 | 6.11 |

Las manchas 2 y 4 son de especial interés ya que están relacionadas con precursores de globulinas 11S de ajonjolí. Como se reportó anteriormente la composición de albúminas, globulinas y glutelinas en amaranto se encontraron en proporciones casi iguales. Sin embargo de acuerdo a la clasificación basada en la estructura del gen y su mecanismo de acumulación, la mayor parte de proteínas de reserva de amaranto caería en la denominación de glutelinas, como la mayoría de las plantas dicotiledóneas. Esto se puede atribuir a que, a pesar de que glutelinas de amaranto tiene las mismas propiedades de solubilidad de otras glutelinas (ejemplo: cereales), las características moleculares que presentan son similares a las globulinas 11S [81].

5.2 CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO.

5.2.1 PREDICCIÓN DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA POTENCIAL EN PROTEÍNAS DE RESERVA.

La **Figura 17** muestra los péptidos bioactivos que fueron predichos para proteínas de reserva de amaranto. Existen 36 secuencias reportadas para proteínas de reserva de amaranto en las bases de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov). Estas secuencias fueron probadas contra las 1573 péptidos reportados (www.uwm.edu.pl/biochemia) con 39 diferentes actividades. Para las proteínas de reserva de amaranto se encontraron 12 principales actividades antihipertensión, inhibidores de proteasas, embriotóxicas, inmunoestimulantes, activación de proteólisis mediada por ubiquitina (activating ubiquitin-mediated proteólisis AUMP por sus siglas en inglés), ligando, antioxidantes, regulante, opioide, inmunomodulante, antitrombótica, antiamnésicos.

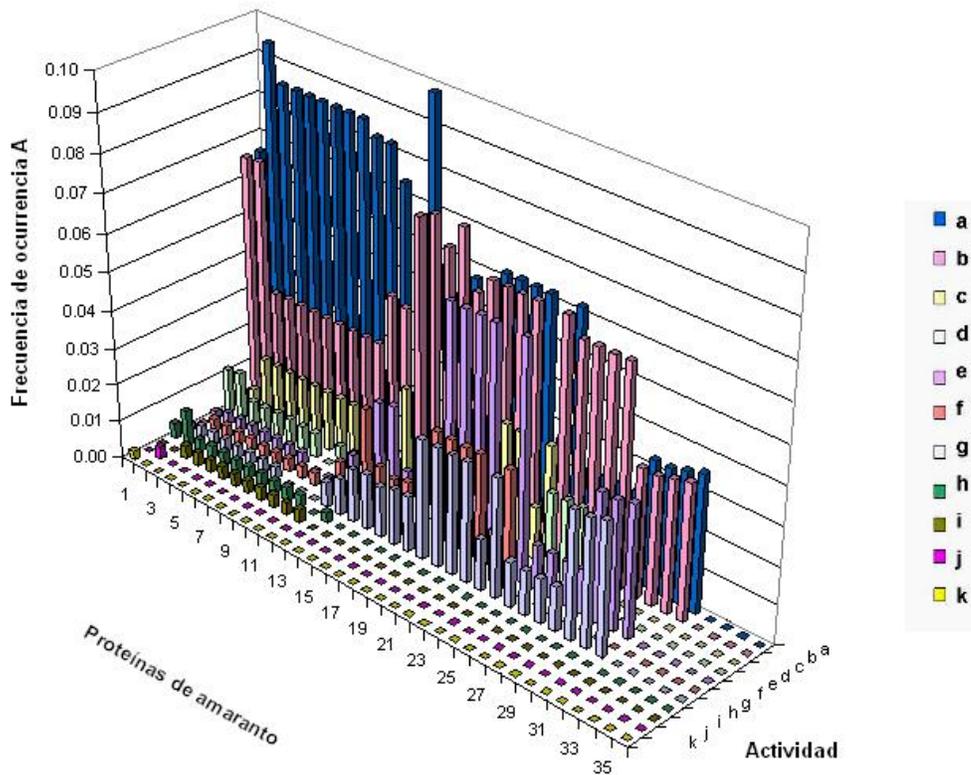


Figura 17. Predicción de péptidos con potencial actividad biológica en proteínas de amaranto. Las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas de la base de datos del NCBI. Los potenciales péptidos bioactivos y su posible función fueron determinados en una búsqueda en la base de datos Biopep.

Proteínas de amaranto: 1. Globulina 11S; 2. Péptido antimicrobiano; 3-8. Lectinas de amaranto; 9. Proteína de reserva de amaranto; 10. Proteína de balance nutricional específica de semilla; 11. Lectina; 12. Antivirus/proteína inactivante del ribosoma; 13. α -Amilasa; 14-17. Inhibidores de tripsina; 18. Inhibidor de serinproteinasas; 19-22. α -Amilasa; 23. Inhibidor de tripsina-quimiotripsina familia de las serinproteasas; 24. α -Amilasa; 25-27. Proteínas antimicrobiales; 28. AMPP unido a quitina 2; 29-31. Proteínas antimicrobiales; 32-36. Proteínas antivirales.

Actividades de los péptidos: **a:** Antihipertensión; **b:** Inhibidor de proteasas; **c:** Opioide; **d:** activación de proteólisis mediada por ubiquitina (AUMP); **e:** Regulante; **f:** Inmunomodulante; **g:** Antitrombótico; **h:** Antioxidante; **i:** Ligando; **j:** Inmunoestimulante; **k:** embriotoxicidad.

El análisis *in silico* mostró que los péptidos con actividad de antihipertensión fueron los más frecuentemente encontrados en proteínas de amaranto (**Figura 17**). Fueron observados valores relativamente altos de la frecuencia de

ocurrencia A, especialmente la globulina 11S presenta un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina-I (ACE). EL inhibidor ACE juega un papel muy importante en el sistema renin-angiotensina, que regula la presión sanguínea. Los inhibidores de esta enzima bajan la presión sanguínea y la mayoría de los fármacos para antihipertensión son potentes inhibidores de ACE [51]. Puesto que las globulinas son una de las fracciones mayores en proteínas de reserva; el amaranto podría considerarse como una fuente natural de péptidos antihipertensivos. Para proteínas de reserva de otras semillas como son la globulina 7S de soya o la α/β gliadina de trigo, los valores de frecuencia de ocurrencia A para la actividad de antihipertensión varia de 0.06 a 0.08 que son comparables a los encontrados en proteínas de amaranto [50]. Más aún se ha reportado que las actividades biológicas potenciales son mayores en proteínas que provienen de fuentes vegetales como las semillas que aquellas que provienen de fuentes animales. Otras actividades que resultaron en valores relativamente altos frecuencia de ocurrencia A fueron los que tienen actividad de inhibidores de proteasas, opioide, y activador de proteólisis mediado por ubiquitina, que fueron encontrados en casi todas las proteínas de reserva de amaranto lo que sugiere que todas las proteínas pueden actuar como una reserva de péptidos que están regulando una función.

5.2.1.1 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS EN LA FRACCIÓN GLUTELINAS DE AMARANTO.

Los análisis de LC MS/MS de la digestión trípica de la fracción glutelinas mostró 508 péptidos *de novo*. El perfil de péptidos bioactivos (**Tabla 11**) mostró que las actividades encontradas fueron inhibidores de enzima [82], antihipertensión [51], activadores de la proteólisis mediada con ubiquitina [83], reguladora [84], antitrombótico y antiamnésico [85], opioide [86], inmunomodulante [87], antioxidante [88], ligando [89], neuropéptido [90], inmunoestimulante [91], embriotóxico [92], anorético [85], y anti-inflamatorio [93]. Los péptidos AP, GPR, GQ, PPLP, PPPA están involucrados en la inhibición de la peptidil

aminopeptidasa IV [94]. Los tripéptidos LPP, LRP, y VPP, el dipéptido YP, han mostrado tener actividad de inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina en ratas hipertensas espontáneas [51]. Los tripéptidos LRP y VPP también se encontraron en leche fermentada y ha reportado que presentan actividad de antihipertensión [95, 96].

En la fracción glutelina, que es estructuralmente similar a la fracción globulina pero con diferente solubilidad [81]; se encontraron péptidos antihipertensivos y otros péptidos con actividades como anoréticos e anti inflamatorios. La fracción glutelina mostró contener péptidos que inhiben la dipeptidil amino peptidasa IV (DPP-IV) que es una enzima clave responsable para la activación del polipéptido inhibitorio gástrico (GIP) y péptido-1(7-36) amida tipo-glucagon (tGLP-1) que son importantes hormonas para la liberación de insulina secretados desde las células endocrinas en el tracto intestinal en respuesta a la alimentación [97]. Existen reportes de que los inhibidores específicos de la DPP-IV bajaron el nivel de glucosa en sangre y potenciaron la secreción de insulina en ratas de Zucker obesas diabéticas tratadas con glucosa, presumiblemente por la protección contra el catabolismo de hormonas de incretina tGLP-1 y GIP [82, 94] El diseño de pequeñas moléculas inhibitoras potentes y selectivas de DPP-IV se han sugerido como una estrategia para el tratamiento de personas con baja tolerancia a glucosa y diabetes tipo 2 [97].

Debido a que globulinas y glutelinas son las fracciones mayoritarias de las proteínas de reserva de amaranto, este puede ser considerado como una fuente potencial natural de péptidos antihipertensivos.

Tabla 11. Biopéptidos identificados en la digestión trípica de las glutelinas de amaranto mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas.

| Actividad | Frecuencia de ocurrencia A | Secuencias con actividad biológica. | Descripción |
|--|----------------------------|--|---|
| Inhibidor de enzimas | 0.0805 | AP, FA, FP, GP, GPR, GQ, HA, IPI, KA, LA, LL, LP, MA, MP, PA, PP, PPLP, PPPA, VA, VP, VPL, VV | Inhibidor de la dipeptidil aminopeptidasa IV [82]. |
| Antihipertensión | 0.0566 | AAP, AIP, ALPP, AVP, AY, FNQ, FP, FQP, FY, GGY, GKP, GRP, GY, HIR, HY, IKP, ILP, IR, IRA, IY, LAA, LAMA, LAY, LF, LLP, LNP, LPP, LQP, LQQ, LRP, LSP, LVL, LVR, LW, LY, MF, MY, PLP, PQR, PR, PRY, RF, RL*, RY, TAP, VAA, VAP, VAY, VF, VLP, VPP, VRP, VSP, VW, VY, VYP, YG, YGGY, YL, YP | Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I [51] |
| Activadores de la proteólisis mediada por ubiquitina | 0.0183 | LA, RA, WA | Activador de la proteólisis mediada por ubiquitina [83]. |
| Regulador | 0.0123 | DY, GFL, GLY, GP, LGY, PG, PGP | Estimula las células fagocíticas implicadas en la defensa del organismo contra infecciones [84]. |
| Antitrombótico | 0.0095 | PPG, PG, GP | Homeostasis de la mucosa gástrica y el potencial fibrinolítico y anti coagulación de plasma sanguíneo [85]. |
| Antiamnésico | 0.0093 | PPG, PG, GP | Potencia los procesos de consolidación de la memoria en el sistema nervioso central. [85]. |
| Opioide | 0.0062 | NAGA, GYY, PLG, YG, YL, YPF | Actúa como un analgésico potente [86]. |
| Inmunomodulante | 0.0037 | EAE, GFL, KRP, TKPR, YG, YGG | Actúan como inmunopotenciadores [87]. |
| Antioxidante | 0.0036 | HH, HL, LH, LHH | Protege las células de la hiperoxidación [88]. |
| Ligando | 0.0026 | KK | Actúa en el sistema de transporte de oligopéptidos [89]. |
| Neuropéptido | 0.0010 | KPS | Actividad antinociceptiva [90] |
| Inmunoestimulante | 0.0009 | KEEAE, LGY, LLY | Estimula células fagocíticas, implicadas en la defensa del organismo contra infecciones [91]. |
| Embriotóxico | 0.0005 | RGD | Actividad embriotóxica [92]. |
| Anorético | 0.0004 | PGP | Inhibidor de la secreción de insulina [85]. |
| Anti inflamatorio | 0.0002 | DTEAR | Bloquea la reacción estándar Prausnitz-Küstner e inhibe una reacción de prueba en la piel conocida como positiva [93] |

5.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO TIPO LUNASIN EN PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO.

5.2.2.1 CONTENIDO DE LUNASIN EN PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO.

El contenido de Lunasin en proteínas de reserva de amaranto fue medido por ensayos de ELISA. La curva estándar se construyó desde 24 hasta 74 ng/ml de un estándar puro de lunasin. El límite de detección fue de 20.4 ng/ml como se puede observar en la **Figura 18**.

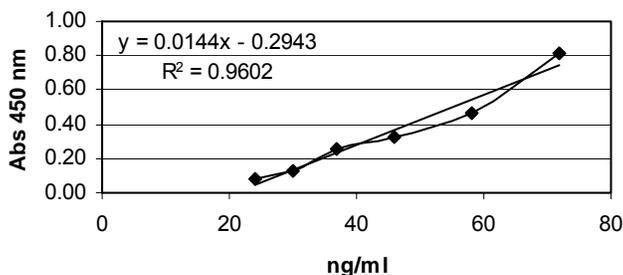


Figura 18. Curva estándar de Lunasin sintético mediante ELISA.

La **Tabla 12** muestra que las concentraciones de lunasin para los extractos de proteína total de las cuatro diferentes variedades varían desde 9.5 hasta 12.1 $\mu\text{g/g}$ de proteína total; no se encontraron diferencias significativas entre variedades ($p \geq 0.05$). Se encontraron cantidades significativas de Lunasin en las fracciones albúminas, globulinas 7S, globulinas 11S y prolaminas. La concentración de Lunasin fue muy similar para todas las variedades y varió desde (1.39 a 1.98 $\mu\text{g/g}$ de proteína total); no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$). La fracción glutelinas mostró la más alta concentración de Lunasin con valores que van desde 2.71 a 3.01 $\mu\text{g/g}$ de proteína total. Las concentraciones mas altas de Lunasin que se han reportado han sido en soya

(6000 $\mu\text{g/g}$ de proteína) [73, 74, 98], aunque la concentración de lunasin en el amaranto es comparable con la reportada en cebada (5.93 a 8.71 $\mu\text{g/g}$ of proteína) [56]. Tanto en amaranto como en la cebada, no se encontraron diferencias significativas entre variedades ($p > 0.05$). Las concentraciones de Lunasin y las diferentes variedades de amaranto reportadas en $\mu\text{g/g}$ de harina se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 12. Concentración del péptido tipo Lunasin en extractos totales de proteína y fracciones de proteínas en $\mu\text{g/g}$ de proteína total cuantificados por ELISA.

| | Criolla | DGETA | Gabriela | Nutrisol |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Extracto total | 12.0 ^{c,a} | 12.1 ^{c,a} | 9.5 ^{c,a} | 10.9 ^{c,a} |
| Albúminas | 1.86 ^{a,a} | 1.85 ^{a,a} | 1.67 ^{a,a} | 1.67 ^{a,a} |
| Globulinas 7S | 1.85 ^{a,a} | 1.89 ^{a,a} | 1.52 ^{a,a} | 1.74 ^{a,a} |
| Globulinas 11S | 1.98 ^{a,a} | 1.80 ^{a,a} | 1.66 ^{a,a} | 1.77 ^{a,a} |
| Prolaminas | 1.54 ^{a,a} | 1.75 ^{a,a} | 1.39 ^{a,a} | 1.54 ^{a,a} |
| Glutelinas | 2.98 ^{b,a} | 3.01 ^{b,a} | 2.71 ^{b,a} | 2.82 ^{b,a} |

Las medias que no comparten letras superíndices comunes son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$ por la prueba de intervalo múltiple de Tukey.

Tabla 13. Concentración del péptido tipo Lunasin en extractos totales de proteína y fracciones de proteínas en $\mu\text{g/g}$ de harina cuantificados por ELISA.

| | Criolla | DGETA | Gabriela | Nutrisol |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Extracto total | 1.80 ^{c,a} | 1.79 ^{c,a} | 1.64 ^{c,a} | 1.66 ^{c,a} |
| Albúminas | 0.28 ^{a,a} | 0.27 ^{a,a} | 0.29 ^{a,a} | 0.25 ^{a,a} |
| Globulinas 7S | 0.28 ^{a,a} | 0.28 ^{a,a} | 0.26 ^{a,a} | 0.27 ^{a,a} |
| Globulinas 11S | 0.30 ^{a,a} | 0.27 ^{a,a} | 0.29 ^{a,a} | 0.27 ^{a,a} |
| Prolaminas | 0.23 ^{a,a} | 0.26 ^{a,a} | 0.24 ^{a,a} | 0.24 ^{a,a} |
| Glutelinas | 0.45 ^{b,a} | 0.45 ^{b,a} | 0.47 ^{b,a} | 0.43 ^{b,a} |

Las medias que no comparten letras superíndices comunes son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$ por la prueba de intervalo múltiple de Tukey.

5.2.2.2 DETECCIÓN DEL PÉPTIDO TIPO LUNASIN MEDIANTE WESTERN BLOT.

Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con azul de Coomassie (**Figura 19A**), mostrando que las proteínas de amaranto bajo condiciones desnaturalizantes están presentes en rango de 10 a 200 kDa y solo muy pocas están presentes por debajo de un peso molecular de 7 kDa. Por análisis de Western blot se detectó una banda con un peso molecular de 18.5 kDa, un peso molecular diferente al de Lunasin de soya (5 kDa). Sin embargo las proteínas de amaranto reaccionaron inmunológicamente con los anticuerpos para Lunasin de soya, por esta razón se sugiere que en el amaranto se puede encontrar un péptido tipo Lunasin. El péptido tipo Lunasin se observó en las fracciones globulinas 7S, globulinas 11S y glutelinas; y en los extractos de proteínas totales de semillas maduras (**Figura 19B**, carriles 3-6). En la fracción glutelinas (carril 5) se observó una banda adicional con un peso molecular de 15.4 kDa. Se corrió un extracto total de proteína de semillas inmaduras (carril 7) para observar si el péptido tipo Lunasin tiene el mismo peso molecular de Lunasin soya, pero aún en una etapa temprana del desarrollo de la semilla permanece como una banda de 18.5 kDa. El extracto de proteína total de semillas de amaranto reventadas también mostró la misma banda a 18.5 kDa (carril 8), sugiriendo la péptido tipo lunasin es arrestado en una etapa temprana del desarrollo de la semilla y no puede ser afectado por un tratamiento térmico extremo. No se encontraron bandas correspondientes al peso molecular de Lunasin de soya (5.4 kDa, carril 9) en amaranto como se muestra en el extracto de proteína de harina enriquecida con lunasin de soya. Por lo anterior mencionado se sugiere que este péptido es un péptido tipo lunasin con un epítipo reactivo similar al Lunasin de soya.

Se ha reportado que lunasin tiene relativamente una alta concentración de ácido aspártico. La fracción glutelinas contiene una alta concentración de ácido aspártico (10.6 % del total de la proteína), sugiriendo que las regiones ácidas

podrían estar relacionadas al epítipo parecido a lunasin en esta fracción de proteínas de amaranto.

También se ha reportado que lunasin en soya es evidentemente un producto postranscripcional de las albúminas 2S (Gm2S-1) obtenido de semillas de media maduración que incluyen proteínas ricas en metionina y un péptido señal [54]. Se sabe que las dicotiledóneas (girasol, nuez del Brasil, amaranto) y monocotiledóneas (arroz, maíz, cebada) contienen un grupo de 10-12 polipéptidos que es rico en metionina [3]. En el caso de amaranto, el péptido tipo lunasin parece estar contenido en una proteína de mayor tamaño. Se ha sugerido que el inhibidor de Bowman Birk (BBI) y otros inhibidores de proteasas en semillas de soya como lo son el inhibidor de Kunitz (KTI) podrían proteger a lunasin contra la degradación en el tracto digestivo [74]. Algunos inhibidores de tripsina reportados en amaranto son de aproximadamente 29, 8 y 3 kDa [99].

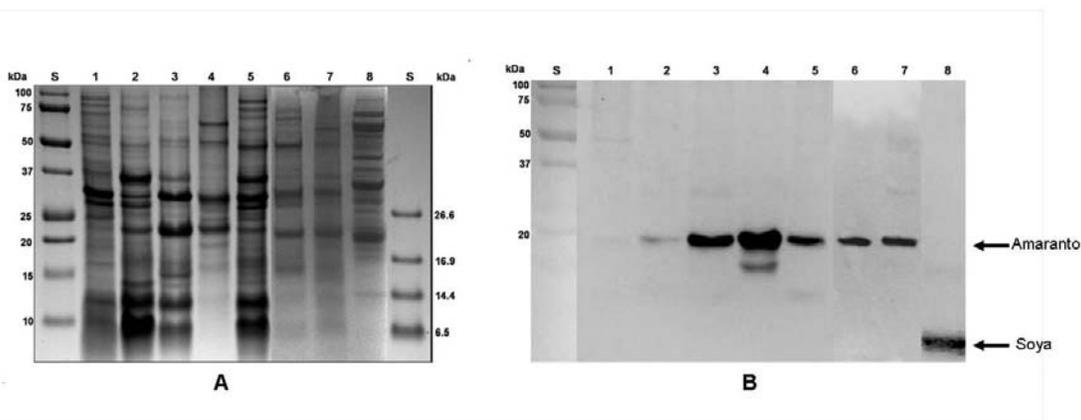


Figura 19. Detección del péptido tipo lunasin mediante Western blot. A) Gel de poliacrilamida de los extractos totales de proteína y fracciones proteínicas de amaranto. B) Western blot de las proteínas de amaranto. Carriles S = Marcadores de peso molecular; 1 = Albúminas; 2 = globulinas 7S; 3 = globulinas 11S; 4 = glutelinas; 5 = extracto de proteína total de semilla madura; 6 = extracto de proteína total de semilla inmadura; 7 = extracto de proteína total de semilla reventada; 8 = harina de soya enriquecida con Lunasin.

En los extractos proteínicos de semillas maduras como en semillas reventadas, el péptido tipo lunasin permanece como una banda de 18.5 kDa. Algunos

reportes indican que la producción de múltiples péptidos de defensa a partir de precursores de proteínas de mayor tamaño es un mecanismo ampliamente distribuido en plantas [100], sugiriendo que lunasin o las isoformas de lunasin en semillas de amaranto podrían encontrarse como precursores de mayor tamaño (18.5 kDa). Se ha descrito que lunasin podría tener un papel en el desarrollo de la semilla pero los mecanismos no se conocen hasta el momento [55]

Para conocer si la proteína de Lunasin interactúa con alguna otra proteína de amaranto se realizó un Western blot mezclando un extracto total de proteínas de amaranto con un extracto total de proteínas de soya. En la **Figura 20** se puede observar que cuando las proteínas de amaranto son mezcladas con Lunasin de soya la banda de Lunasin de soya aparece ligeramente arriba (7,8 kDa) del peso molecular normal de Lunasin (5.4kDa), y la banda de 18.5 kDa aparece mas marcada, sugiriendo que existe una interacción entre las proteínas de amaranto y Lunasin (**Figura 20**) [74].

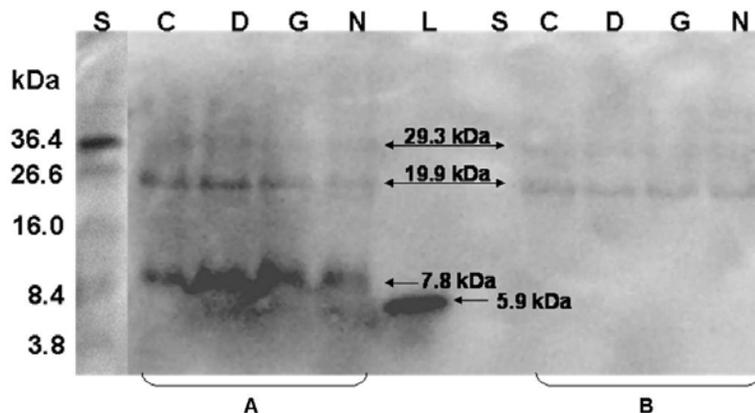


Figura 20. Western blot de extractos totales de proteínas de amaranto mezcladas con Lunasin de soya. A) Amaranto mas soya. B) Proteínas de amaranto. Carriles S Marcador de peso molecular, 1 Criolla, 2 DGETA, 3 Gabriela, 4 Nutrisol, 5 Lunasin de soya.

5.2.2.3 PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO TIPO LUNASIN POR INMUNOPRECIPITACIÓN.

Se realizó un ensayo de inmunoprecipitación con el objetivo de purificar el péptido tipo lunasin de amaranto. Se empleó la fracción de glutelinas para este ensayo puesto que fue la que mostró tener la mayor concentración del péptido tipo lunasin de amaranto. Se empleó como control del ensayo un extracto de total de proteínas de una harina de soya enriquecida con lunasin. Como se muestra en la **Figura 21** se obtuvo solo una banda a 18.5 kDa que fue cortada para la caracterización por MALDI-TOF.

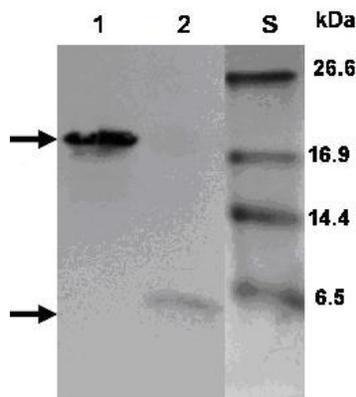
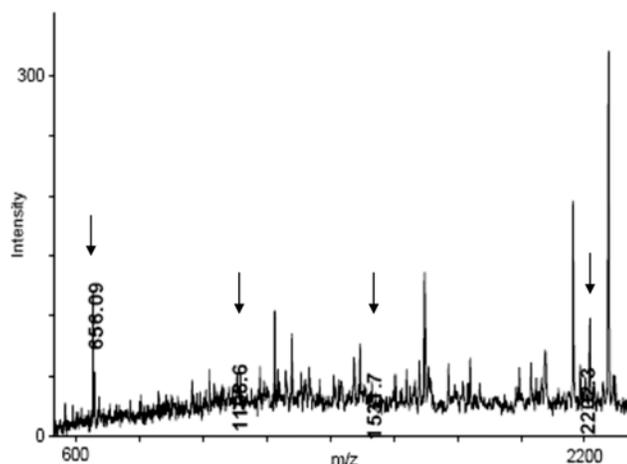


Figura 21. Western blot después de la inmunoprecipitación de glutelinas. Carriles S marcador de peso molecular; 1 glutelinas; 2 extracto de harina de soya enriquecida con lunasin.

5.2.2.4 IDENTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO TIPO LUNASIN POR MALDI-TOF.

La **Figura 22** presenta espectro de masas de ionización por desorción de láser (LDI por sus siglas en inglés) del resultado de la digestión con tripsina del posible péptido tipo lunasin de amaranto obtenido a partir del ensayo de inmunoprecipitación. Las masas de los péptidos que concuerdan con los fragmentos esperados de una digestión con tripsina realizada en una base de

datos con 5 ppm de tolerancia, están indicados en negritas en la secuencia que se muestra abajo. Los datos mostraron que la secuencia del péptido tipo lunasin de amaranto coincide en un 60% con la secuencia original de Lunasin de soya.



| Masas monoisotópicas | Secuencia |
|----------------------|-------------|
| 655.991 | HIMQK |
| 1187.442 | WQHQQDSCR |
| 1312.620 | WQHQQDSCRK |
| 1327.504 | QLQGVNLTPEK |

Secuencia de Lunasin de soya

SKWQHQQDSC RKQLQGVNLT PCEKHIMQKI QGRGDDDDDD DDD

Figura 22. Masas monoisotópicas de cuatro fragmentos detectados por análisis de MALDI-TOF y sus secuencias esperadas. Las secuencias coinciden con aquellas que fueron deducidas de una ruptura tríptica realizada en base de datos con 5 ppm de tolerancia.

5.2.2.5 CARACTERIZACIÓN DE LUNASIN EN GLUTELINAS DE AMARANTO MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Se realizó una caracterización mediante electroforesis bidimensional y Western blot para identificar si la proteína tipo lunasin corresponde a una sola proteína. En la **Figura 23** se muestra el gel de doble dimensión (A) y el Western blot (B) para glutelinas de amaranto. La banda de 18.5 kDa correspondiente a la proteína tipo lunasin en el análisis de una sola dimensión se separó en 4 puntos principales de los cuales solo uno corresponde a la proteína tipo lunasin. La proteína tipo lunasin permanece en un peso molecular de 18.5 kDa y tiene un punto isoeléctrico de 5.8.

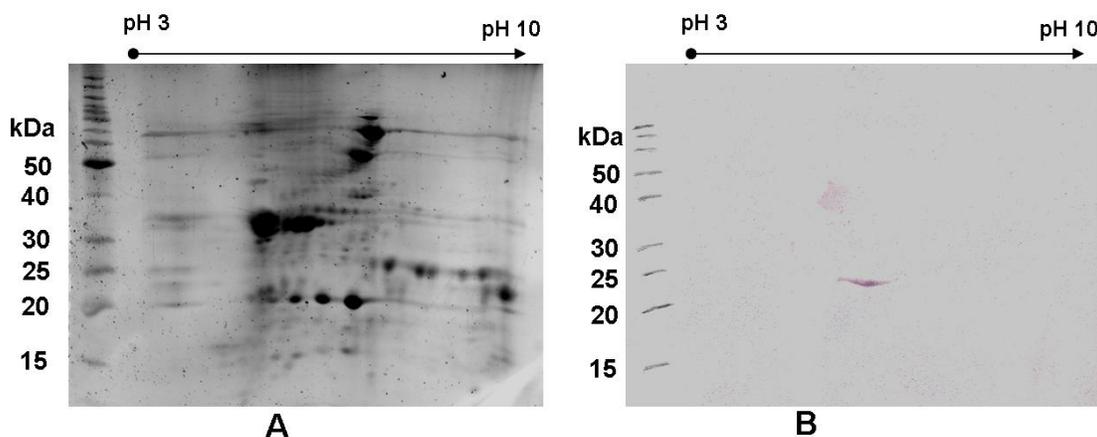


Figura 23. Identificación del péptido tipo lunasin mediante electroforesis bidimensional. A) Gel bidimensional de glutelinas de amaranto variedad Criolla pH 3-10, B) Western blot.

5.3 CARACTERIZACIÓN DE ALMIDÓN DE AMARANTO.

5.3.1 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A GRÁNULOS DE ALMIDÓN.

El contenido de proteína después de la extracción fue 1.6 mg/g de almidón de amaranto. Para almidón de trigo el contenido promedio es 2.5 mg/g que puede ser considerado libre de glutelinas, fracción de proteínas que puede presentarse como contaminante [60]. La electroforesis de primera dimensión (**Figura 24**) mostró una proteína de 50 kDa, perteneciente al grupo denominado “proteínas asociadas al interior del gránulo de almidón” y que corresponde a la isoforma de la sintetasa de PAGA. Se observaron dos bandas de proteínas entre 20 y 30 kDa, y un grupo de bajo peso molecular (5, 8 y 12 kDa) que corresponden a las proteínas denominadas “proteínas de superficie asociadas a gránulos de almidón”. Las proteínas con peso molecular alrededor de 15 kDa se asocian con un grupo de polipéptidos denominado friabilinas que son representativos de PAGA [61].

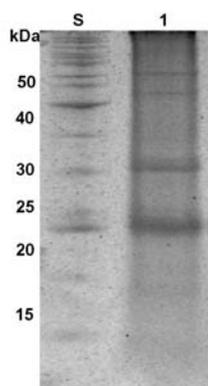


Figura 24. Patrón electroforético de proteínas asociadas a gránulos de almidón. Carriles: S) Marcador de peso molecular, 1) variedad Criolla.

5.3.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A GRÁNULOS DE ALMIDÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

La electroforesis de doble dimensión (**Figura 25**) mostró un patrón muy similar a la fracción glutelinas. Se observaron tres grupos principales de proteínas, aquellos que se encuentran en un alto peso molecular (arriba de 50 kDa), los

que se encuentran entre 20 y 40 kDa y el grupo de proteínas de bajo peso molecular. Los puntos 1, 2, 3 y 4 se cortaron y analizaron por MALDI-TOF.

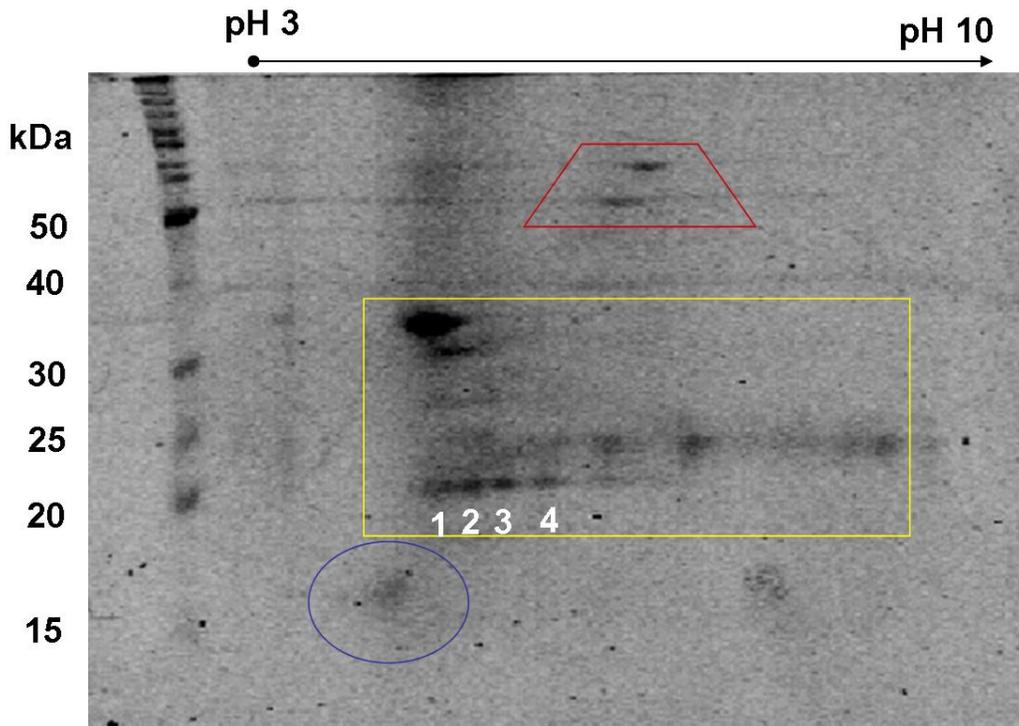


Figura 25. Electroforesis bidimensional de proteínas asociadas a gránulos de almidón variedad Criolla.

5.3.1.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A GRÁNULOS DE ALMIDÓN MEDIANTE MALDI-TOF.

Los puntos 1, 2, 3 y 4 se cortaron, digirieron con tripsina y analizaron mediante MALDI-TOF. El punto tres dio como resultado la identificación de una proteína asociada a gránulos de almidón (**Figura 26**). Se encontraron 3 fragmentos de una sintetasa unida a gránulos de almidón de *Tiquila plicata*, una planta dicotiledónea.

```

Q3HSG2_9BORA      Mass: 12699      Score: 16      Expect: 6.1e+03  Queries matched: 1
Granule-bound starch synthase (Fragment).- Tiquilia plicata.
Q3HSG8_9BORA      Mass: 13529      Score: 16      Expect: 6.5e+03  Queries matched: 1
Granule-bound starch synthase (Fragment).- Tiquilia plicata.
Q3HSG6_9BORA      Mass: 13529      Score: 16      Expect: 6.5e+03  Queries matched: 1
Granule-bound starch synthase (Fragment).- Tiquilia plicata.

```

Protein View

Match to: Q3HSG2_9BORA Score: 16 Expect: 6.1e+03
Granule-bound starch synthase (Fragment).- Tiquilia plicata.

Nominal mass (M_r): 12699; Calculated pI value: 5.90
NCBI BLAST search of [Q3HSG2_9BORA](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Tiquilia plicata](#)
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[ABA61828](#) from [Tiquilia plicata](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 21
Number of mass values matched: 1
Sequence Coverage: 31%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  ASDRYIDVHY DITTVTEAKP LLKEALQAEV GLPCDRNVFV IGFIGRLEEQ
51 KGS DILVA AI HKFIGMDVQI VVLGTGKKKF EQEIQQLEVL YFNKARGVAK
101 FNVPLAHMIT AGADY

```

Figura 26. Identificación de proteínas asociadas a gránulos de almidón por MASCOT.

Se realizó un BLAST proteína-proteína para la secuencia de la enzima sintetasa unida a gránulos de almidón de *Tiquila plicata* (**Figura 27**). Se puede observar que es una secuencia altamente conservada en plantas dicotiledóneas. El mayor número de entradas pertenece al género *Solanum*, entre ellos se destaca la papa (*Solanum tuberosa*), una fuente importante de almidón. Cabe destacar que la mayoría de estas plantas son silvestres o crecen en condiciones de cultivo extremas al igual que amaranto.

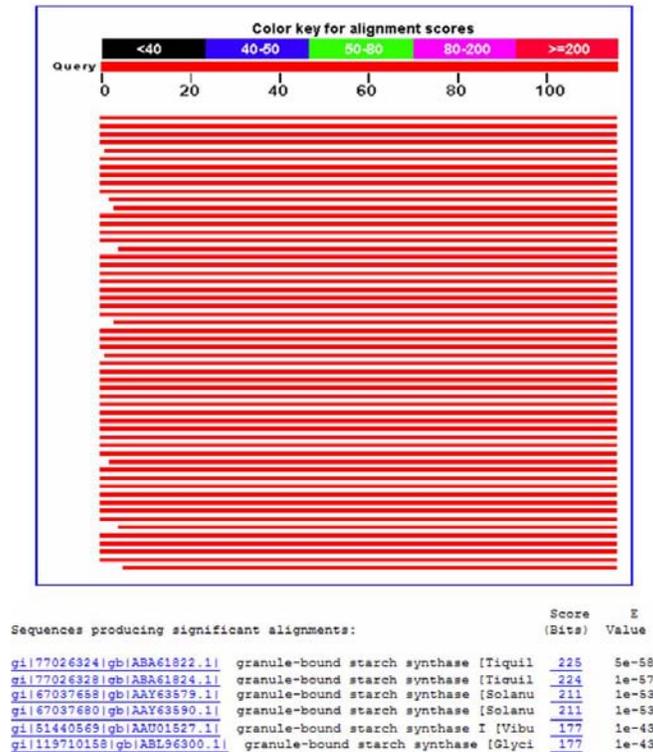


Figura 27. Fragmento de los resultados de BLAST proteína-proteína para la sintetasa unida a gránulos de almidón.

5.3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS GRÁNULOS DE ALMIDÓN DE AMARANTO.

Después de la extracción de almidón a partir de la harina de amaranto; se realizó una caracterización física de los gránulos de almidón mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB). Como se puede observar en la **Figura 28**, los gránulos tienen una forma geométrica regular. La morfología y el tamaño del gránulo de almidón, está relacionado directamente con la fuente botánica del cual fue aislado. Los gránulos de almidón provenientes de tubérculos son generalmente ovalados, aunque se pueden encontrar gránulos redondos, esféricos poligonales e irregulares [101]. Más a fondo se sabe que la morfología está regulada genéticamente. La biosíntesis del almidón ocurre en el amiloplasto y/o cloroplasto. La estructura membranosa y las características

físicas de los plástidos pueden impartir morfologías muy particulares a los gránulos de almidón, y pueden afectar el arreglo y la asociación de las moléculas amilosa y amilopectina dentro del gránulo [102]

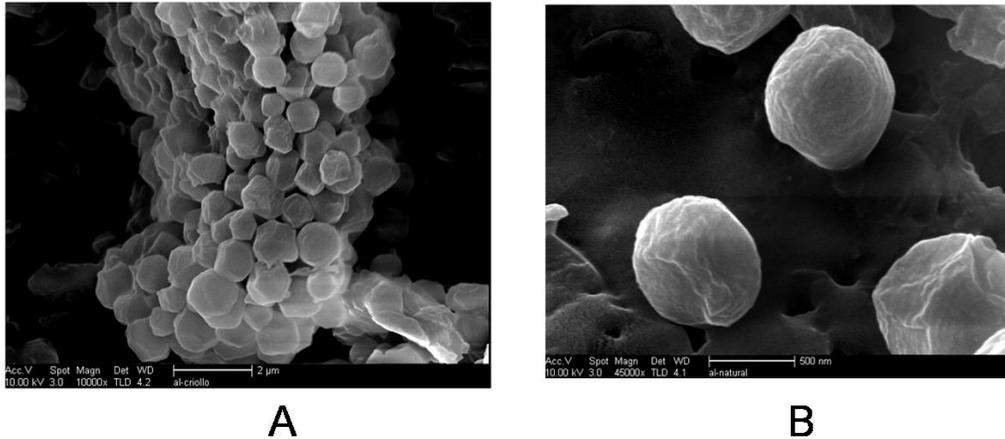


Figura 28. Microscopia Electrónica de Barrido de gránulos completos de almidón de amaranto variedad Criolla. A) Morfología una población de gránulos. B) Morfología detallada de un gránulo de almidón.

Mediante Microscopia de Fuerza Atómica (**Figura 29**), se observó que su tamaño varía de 1-3µm. Los gránulos de almidón de amaranto están reportados en el grupo de gránulos de almidón muy pequeños, estos varían de 0.3 a 3.5 µm. En este grupo se encuentran presentes los gránulos de almidón de quinoa, alpiste y taro entre otras [101]. La forma y tamaño de los gránulos de almidón esta directamente relacionada con la fuente botánica. El tamaño de los gránulos puede ser afectado por condiciones ambientales; en cereales como la cebada se ha observado que el estrés inducido por temperatura reduce el tamaño de los gránulos tipo A y B así como también el número de gránulos tipo B [103]. La mayoría de las plantas estudiadas que cuentan con gránulos de almidón muy pequeños son silvestres.

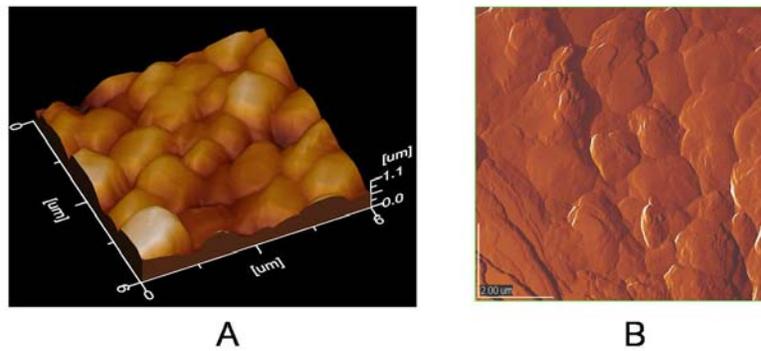


Figura 29. Imágenes de gránulos enteros de almidón de amaranto mediante Microscopía de Fuerza Atómica. A) Modo de topografía, B) Modo de fases para realizar mediciones precisas de longitud y altura.

Se realizaron cortes transversales de los gránulos de almidón para observar la geometría de los gránulos de almidón. La **Figura 30** muestra las imágenes obtenidas por MFA de los cortes transversales de los gránulos de almidón.

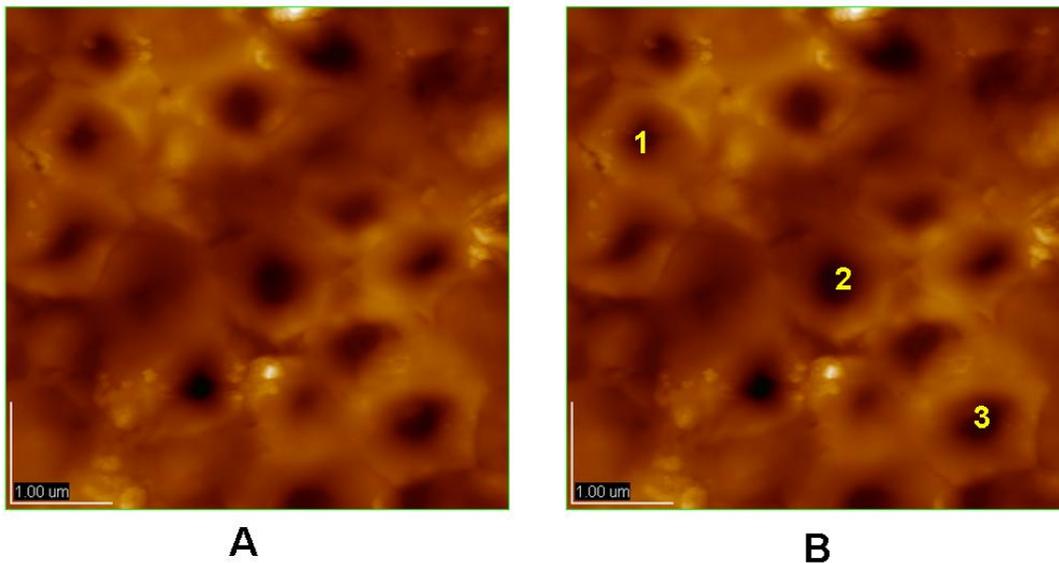


Figura 30. Corte transversal de gránulos de almidón de amaranto variedad criolla mediante Microscopía de Fuerza Atómica. A) Gránulos de almidón en modo de topología, B) Gránulos medidos para determinar el tamaño promedio.

Para calcular el diámetro promedio de los gránulos de almidón se realizó un promedio entre el diámetro menor y el mayor de cada granulo [101]. Se puede observar que hay variación en los tamaños de 0.98 a 1.97 μm de diámetro, con un promedio de tamaño de gránulo de 1.33 μm . Los gránulos de almidón tienen forma hexagonal pero no simétrica (**Figura 31**). Se tomaron las distancias de las caras opuestas del hexágono y se observó que hay una pequeña variación. En la **Figura 31**, la distancia I en promedio es 1.38 μm , la distancia II es 1.44 μm y la distancia III 1.61 μm . Las mediciones demostraron que los lados del hexágono son asimétricos lo que podría suponer que son sintetizados del centro hacia los extremos en forma concéntrica.

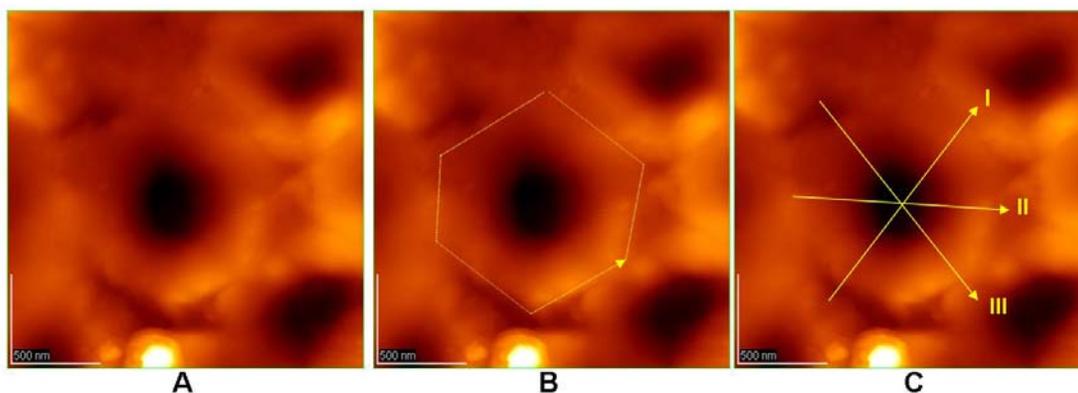


Figura 31. Geometría del gránulo de almidón de amaranto mediante Microscopía de Fuerza Atómica. A) Granulo de almidón de amaranto, B) geometría hexagonal, C) Direcciones para medir distancias de las caras opuestas del hexágono.

La mayor parte de las investigaciones acerca de la síntesis y morfología se ha desarrollado en trigo y cebada. Se ha postulado que la biosíntesis de almidón en cereales ocurre en dos procesos. El primero gobierna la relación y la naturaleza de los componentes de amilosa y la amilopectina, mientras que la forma y el tamaño son controlados independientemente, de manera que dependen del tipo de cultivo [104].

VI. CONCLUSIONES.

6.1 CONCLUSIONES.

En este trabajo se evaluó la adaptabilidad de dos variedades nuevas, Criolla y Nutrisol, de *Amaranthus hypochondriacus* comparadas con dos comerciales DGETA y Gabriela, a condiciones adversas de cultivo. Los rendimientos en campo tanto de las variedades comerciales como las nuevas fueron comparables a los obtenidos para amarantos de la misma especie en condiciones ideales. La variedad que mostró mejor rendimiento fue la Criolla (1474.7 kg/ha). En cuanto a las características bioquímicas, la variedad Gabriela fue estadísticamente diferente mostrando el mayor contenido de proteína (17.3%). El perfil de aminoácidos fue comparable a lo reportado en la literatura y no se encontraron diferencias significativas entre variedades. Se encontró que amaranto posee en proporciones equivalentes Albúminas, globulinas y glutelinas. El patrón de glutelinas mostró una banda extra en 65 kDa, que interesadamente solo se encuentra en las variedades con mayor rendimiento en Campo. El estudio de péptidos bioactivos mostró que amaranto tiene un gran potencial como alimento nutraceútico, puesto que los péptidos antihipertensión se encuentran en mayor proporción. También se encontraron péptidos con actividades opioide, inhibidor de proteasas. Se observó que en amaranto se encuentra presente un péptido tipo Lunasin, que hasta el momento solo se había reportado en soya y cebada. Los contenidos de lunasin en amaranto son ligeramente menores a los reportados para soya. Finalmente se logró la identificación de una sintetasa unida a gránulos de almidón, aislada a partir de gránulos de almidón de amaranto. La caracterización morfológica del gránulo de almidón presentó que tienen un tamaño de 0.98 a 1.97 μm y en los cortes transversales mostraron tener una geometría hexagonal.

VII. REFERENCIAS

1. National Academy of Science. 1984. Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. National Academy Press, Washington D.C.
2. Paredes López O., Barba de la Rosa, A. P., Hernandez López, D., Carabez Trejo, A. 1990. Amarantho: características y aprovechamiento industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, DC.
3. Segura-Nieto M, Barba de la Rosa AP, Paredes-López O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. En: *Amaranth Biology, chemistry and technology*. O Paredes-López (Ed.) CRC Press, Chap 5.
4. Barba de la Rosa AP, Gueguen J, Paredes-López O, Viroben G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *J. Agric. Food Chem.* 40:931-936.
5. Salnikow J, Zemser M, Gorinstein S, Friedman M, Scheler C, Paredes-Lopez O. 1998. Structure-function relationships of folded and unfolded amaranth proteins. *J. Prot. Chem.* 17(6): 543-545.
6. Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A. 2000. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *PNAS* 97:3724-3729.
7. Rascon-Cruz Q, Sinagawa-Garcia S, Osuna-Castro JA, Bohorova N, Paredes-Lopez O. 2004. Accumulation, assembly, and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize. *Theoretical and applied genetics*, 108(2): 335-342.
8. Medina-Godoy S, Nielsen NC, Paredes-Lopez O. 2004. Expression and characterization of a His-tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2004 Nov-Dec;20(6):1749-56.
9. Medina-Godoy S, Valdez-Ortiz A, Valverde ME, Paredes-Lopez O. 2006. Endoplasmic reticulum-retention C-terminal sequence enhances production of an 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol J*, 1(10):1085-92.

10. Valdez-Ortiz A, Rascon-Cruz Q, Medina-Godoy S, Sinagawa-García SR, Valverde-Gonzalez ME, Paredes-Lopez O. 2005. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *J Biotechnol.* 2005 Feb 23;115(4):413-23.
11. Majewski Z, Replinska A. 2002. Attempt at application of general purpose index for extrudate quality. *Annals of Warsaw Agricultural University, Agriculture Agricultural Engineering*, (42): 69-73.
12. Chavez-Jauregui RN, Cardoso-Santiago RA, Pinto e Silva MEM, Areas JAG. 2003. Acceptability of snacks produced by the extrusion of amaranth and blends of chickpea and bovine lung. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(7): 795-798.
13. Kovacs ET, Berghofer E, Schonlechner R. 2002. Using pseudo-cereal milling fractions for pasta production. In *Flour-Bread 01: Proceedings of International Congress*. ED: Ugarcic-Hardi Z. 3rd Croatian Congress of Cereal Technologists, Opatija, Croatia, 14-17 November 2001, 70-78.
14. Czerwinski J, Bartnikowska E, Leontowicz H, Lange E, Leontowicz M, Katrich E, Trakhtenberg S, Gorinstein S. 2004. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(10): 622-629.
15. Haskell MJ, Pooja-Pandey, Graham JM, Peerson JM, Shrestha RK, Brown KH. 2005. Recovery from impaired dark adaptation in nightblind pregnant Nepali women who receive small daily doses of vitamin A as amaranth leaves, carrots, goat liver, vitamin A-fortified rice, or retinyl palmitate. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(2): 461-471.
16. Park SangHa, and Morita N. 2004. Effect of enzymes on the dough properties and bread quality of wheat flour partly substituted for amaranth flour. *Food Science and Technology Research*, 10(2): 127-131.
17. Rouckova J, Trckova M, Herzig I. 2004. The use of amaranth grain in diets for broiler chickens and its effect on performance and selected biochemical indicators. *Czech Journal of Animal Science*, 49(12): 532-541.

18. Zraly Z, Pisarikova B, Hudcova H, Trkova M, Herzig I. 2004. Effect of feeding amaranth on growth efficiency and health of market pigs. *Acta-Veterinaria-Brno*, 3(4): 437-444.
19. Tapia-Blácido D, Sobral JP, Menegalli FC. 2005. Development and characterization of biofilms based on amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*, 67: 215-223.
20. Allaberdin IL. 2004. A plant derived preservative. *Kormoproizvodstvo*. 2004; (9): 31-32.
21. Barba de la Rosa AP, Paredes-López O. 1989. Development of an enzymatic procedure to produce high-protein amaranth flour. *Biotechnol. Lett.* 11:442-428.
22. Antonkiewicz J, Jasiewicz C. 2002. Estimation of usefulness of different plant species for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Acta Scientiarum Polonorum Formatio Circumiectus*, 1(1/2): 119-130.
23. Ling-WanTing, Gao-YanZheng. 2004. Promoted dissipation of phenanthrene and pyrene in soils by amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). *Environmental Geology*, 46(5): 553-560.
24. Rutherford-Markwick KJ, Moughan PJ. 2005. Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*. 88(3):955-966.
25. De Bolle MF, David KM, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF. 1993. Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*. *Plant Mol Biol.* 22(6):1187-90
26. Broekaert WF, Marien W, Terras FR, De Bolle MF, Proost P, Van Damme J, Dillen L, Claeys M, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA. 1992. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. 1992; 31(17): 4308-4314.
27. Kim YS, Park SC, Oh SK; Lee H; Cho JW, Chung CH. 1999. Antiviral proteins, amarandin 1 and 2, from *Amaranthus viridis*, DNAs encoding therefrom. Patente US 6001986-A 1. 14-DEC-1999.

-
28. Legaria J, Rajsbaum R, Munoz-Clares RA, Villegas-Sepulveda N, Simpson J, Iturriaga G. 1998. Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene*. 18;218(1-2):69-76.
 29. Centro de información al consumidor AMARANTO
<http://www.amaranto.com.mx>
 30. Centro Centeolt A.C. www.prodigynet.web.mx/centeotlac
 31. Becerra R. 2000. El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. *Biodiversitas* 5(30):1-7.
 32. SAGAR 2002
 33. Stallknecht GF, Schulz-Schaeffer JR. 1993. Amaranth rediscovered. En: *New crops*. J. Janick and J.E. Simon (eds.), p. 211-218. Wiley, New York.
 34. SARH 1998. Información estadística y agropecuaria. Subsecretaría de Planeación. México, D.F.
 35. Saunders RM, Becker R. 1984. *Amaranthus*: A potencial food and feed resource. En: *Advances in Cereal Science and Technology*. Y. Pomeranz Ed. Vol. 6, Cap. 6, p. 357-397.
 36. Guzmán-Maldonado H, Paredes-López O. 1998. Production of high-protein flours as miik substitutas. En: *Functional properties of proteins and lipids*. John R. Whitaker, Fereidoon Shahidi, Agustín López-Munguia, Rickey Y. Yada, Glenn Fuller (Eds.). Cap. 5. ACS Symposium Series.
 37. Downton, W.J.S. 1973. *Amaranthus edulis*: A high lysine grain amaranth. *World Crops* 25:20.
 38. FAO/WHO/UNU. 1986. Special Report. Energy and protein requirements. *Cereal Foods World* 3:694-695.
 39. Hodges, C. S., Sánchez, M. L., Morales-DeLeón, L. 1986. Pasado, presente y futuro del amaranto. *Cuadernos de nutrición*. 1: 1 7-32.
 40. Betschart, A. A., Irving, D. W., Sheperd, A. D., Wheeler, E. L., Becker, R., Lorenz, K., Hanamoto, M. M., Saunders, R. M. 1979. *Amaranthus*: Morphology, nutritional value and food potencial. *Cereal Foods World* 24:457-460.

41. Bressani, R. 1983. Calidad proteínica de la semilla de amaranto crudo y procesado. En: El amaranto y su potencial. *Arch. Latin. Nut.* Vol. 3.
42. Bressani, R. 1994. Composition and nutritional properties of amaranth. En: *Amaranth: Biology, chemistry and technology*. O. Paredes-López (Ed.) CRC Press. Cap. 10
43. Bewley JD, Greenwood JS. 1990. Protein storage and utilization in seeds. En *Plant physiology, biochemistry and molecular biology*. David T Dennis and David H Tuppin (Ed). John Wiley. pp 456-469
44. Osborne TB. 1924. The vegetable proteins. En: *Monographs in Biochemistry*, 2nd ed. Longmans, Green and Co., New York. 25.
45. Sánchez-Marroquín A. 1980. Potencialidad agroindustrial del amaranto. Monografía. Centro de estudios económicos y sociales del Tercer Mundo. México. D.F.
46. Mora-Escobedo R, Paredes-López O, Ordorica-Falomir C. 1990. Characterization of albumins and globulins from amaranth. *Lebensm. Wiss. Technol.* 23:484-486.
47. Higgins TJV. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 191-221.
48. Gaudreault PR, Beevers L. 1984. Protein bodies and vacuoles as lysosomes. *Plant Physiol.* 76: 228-232.
49. Krochko JE, Bewley JD. 1989. Use of electrophoretic techniques in determining the composition of seed storage proteins. *Electroforesis* 9:751-763.
50. Dziuba J, Iwaniak A, Minkiewicz P. 2003. Computer-aided characteristics of proteins as a potential precursors of bioactive peptides. *Polimery* 48(1): 50-53.
51. Aoyagi Y. 2006. An angiotensin-I converting enzyme inhibitor from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flour. *Phytochemistry* 67:618-621.
52. Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takahata K. 2000. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *BioFactors* 12: 143-146.

-
53. Galvez AF, Chen N, Macasieb J, De Lumen BO. 2001. Chemopreventive property of a soybean Peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Res* 61:7473-7478.
 54. Galvez AF, De Lumen BO. 1999. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nat Biotech* 17: 495-500.
 55. Jeong HJ, Park JH, Lam Y, De Luman BO. 2003. Characterization of Lunasin Isolated from soybean. *J Agric Food Chem* 51: 7901-7906.
 56. Jeong HJ, Lam Y, De Luman BO. 2002. Barely Lunasin suppresses *ras*-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *J. Agric Food Chem* 50: 5903-5908.
 57. Guilbot A, Mercier C. 1985. Starch. In G. O. Aspinall (ed.), *The polysaccharides* 3. Academic Press, Inc., New York. p. 209-282.
 58. Smith AM. 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules* 2:335-341.
 59. Ellis RP, Cochran MP, Dale MFB, Dupus CM, Lynn A, Morrison LM, Prentice RDM, Swanston JS, Tiller SA. 1998. Starch production and industrial uses. *Journal of science food and agriculture* 77: 289-311.
 60. Boren M, Larsson H, Falk A, Jansson C. 2004. The Barley starch granule proteome-internalized granule polypeptides of the mature endosperm. *Plant Science* 166:617-626
 61. Baldwin PM. 2001. Starch granule-associated proteins and polypeptides: A review. *Starch* 53(10): 475-503.
 62. Ridout MJ, Parker ML, Hedley CL, Bogracheva TY, Morris VJ. 2004. Atomic force microscopy of pea starch: origins of image contrast. *Biomacromolecules* 5:1519-1527
 63. Oostergetel OGT, Van Bruggen EFJ. 1993. The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. *Carbohydrate Polymers*, 21, 7-12.
 64. Gallant DJ, Bouchet B, Baldwin PM. 1997. Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers* 32:177-191.

-
65. da Silva LP. 2002. Atomic force microscopy and proteins. *Protein and peptide Letters* 9(2):117-125
66. Ratneshwar L, Scott AJ. 1994. Biological applications of atomic force microscopy. *American Journal of Physiology*. 266(1 Pt 1):C1-21.
67. Silva-Sánchez C, González-Castañeda J, de León-Rodríguez A, Barba de la Rosa AP. 2004. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods Hum Nutr*. 59(4):169-74.
68. AOAC Official Methods of Analysis, 15 ed. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, 1990.
69. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
70. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-22.
71. Chan KF, Sun M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor Appl Genet*, 95: 865-873.
72. Kinter M, Sherman NE. 2000. Protein Sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Wiley-Interscience Series. En *Mass Spectrometry*, Series Editors Dominic Desiderio and Nico M.M. Nibbering, New York.
73. Gonzalez de Mejia, E.; Vasconez, M.; De Lumen, B.O.; Nelson, R. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial protein, and isoflavone products. *J. Agric. Food Chem*. 2004, 52: 5882-5887.
74. Park JH, Jeong HJ, De Lumen BO. Contents and bioactivities of Lunasin, Bowman-Birk, and isoflavones in soybean seed. *J. Agric. Food Chem*. 2005, 53: 7686-7690.
75. Bhat, U.G.; Raychaudhuri, P.; Beck, W.T. Functional interaction between human topoisomerase II alpha and retinoblastoma protein. *PNAS USA* 1999, 96, 7859-7864.
76. Holmes MR, Ramkisson KR, Giddings MC. 2005. Proteomics and protein identification. En: *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes*

- and proteins. 3rd ED. Baxevanis Ad, Ouellette BEF ed. John Wiley and Sons Incs.
77. Sanchez-Hernandez L, Solorza-Feria J, Mendez Montealvo G, Paredes-Lopez O, Bello-Perez LA. 2002. Isolation and partial characterization of Okenia (*Okenia hypogaea*) starch. *Starch*, 54(5):193-197.
78. Reyes-Castañeda P. Bioestadística aplicada. Agronomía, Biología Química. 1983. Ed Trillas. Chap 5.
79. Badui-Dergal S. 1999. Proteínas. In: Química de los alimentos. 3a ed. Adison Wesley Longaman de México. Chapter 3.
80. Barba de la Rosa AP, Herrera-Estrella A, Utsumi S, Paredes-López O. 1996. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J Plant Physiol*. 149:527-532.
81. Abugouch LE, Martinez EN, Añon MC. 2003. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *J Agric Food Chem* 51: 4060-4065.
82. Wiedeman, P.E.; Trevillyan, J.M. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Curr Op Invest Drugs*. **2003**, 4(4), 412-420.
83. Turner, G.C. ; Du, F. ; Varshavsky, A. Peptides accelerate their uptake by activating an ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* **2000**, 405(6786), 579-583.
84. Migliore-Samour, D.; Roch-Arveiller, M.; Tissot, M.; Jazziri, M.; Keddad, K.; Giroud, J.P.; Jollés, P. Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochem. Pharmacol*. **1992**, 44(4), 673-680.
85. Ashmarin, I.P.; Karazeeva, E.P.; Lyapina, L.A.; Samonina, G.E. The simplest proline-containing peptides PG, GP, PGP, and GPGG: regulatory activity and possible sources of biosynthesis. *Biochemistry (Mosc)*. **1998**, 63(2), 119-124.
86. Mullally, M.M.; Meisel, H. ; FitzGerald, R.J. Synthetic peptides corresponding to alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-

- converting enzyme inhibitory activity. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. **1996**, 377(4), 259-260.
87. Kayser, H.; Meisel, H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett*. **1996**, 383(1-2), 18-20.
88. Chen, H.M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F.; Fujimoto, K.; Nokihara, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*. **1998**, 46(1), 49-53.
89. Sleigh, S.H.; Tame, J.R.; Dodson, E.J.; Wilkinson, A.J. Peptide binding in OppA, the crystal structures of the periplasmic oligopeptide binding protein in the unliganded form and in complex with lysyllsine. *Biochemistry*. **1997**, 36(32), 9747-9758.
90. Caliendo, G.; Greco, G.; Grieco, P.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Ialenti, A.; Maffia, P.; Albrizio, S.; Santini A. Synthesis and antinociceptive activity of peptides related to interleukin-1 beta193-195 Lys-Pro-Thr. *Biopolymers*. **1996**, 40(5), 479-484.
91. Berthou, J.; Migliore-Samour, D.; Lifchitz, A.; Delettré, J.; Floc'h, F.; Jollés, P. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Lett*. **1987**, 218(1), 55-58.
92. Chambers, B.J.; Klein, N.W.; Conrad, S.H.; Ruppenthal, G.C.; Sackett, G.P.; Weeks, B.S.; Kleinman, H.K. Reproduction and sera embryotoxicity after immunization of monkeys with the laminin peptides YIGSR, RGD, and IKVAV. *PNAS USA*. **1995**, 92(15), 6818-6822.
93. Hamburger RN. 1975. Peptide inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction. *Science*. 189(4200):389-90.
94. Pederson, R.A.; White, H.A.; Schlenzig, D.; Pauly, R.P.; McIntosh, C.H.S.; Demuth, H.U. Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide. *Diabetes*. **1998**, 47(8), 1253-1258.

-
95. Nurminen, M.L.; Sipola, M.; Kaarto, H.; Pihlanto-Leppälä, A.; Piilola, K.; Korpela, R.; Tossavainen, O.; Korhonen, H.; Vapaatalo, H. Alpha-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **2001**, *66(16)*, 1535-1543.
96. Seppo, L.; Jauhiainen, T.; Poussa, T.; Korpela, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr.* **2003**, *77(2)*, 326-330.
97. O'Harte, F.P.; Mooney, M.H.; Flatt, P.R. NH₂-Terminally modified gastric inhibitory polypeptide exhibits amino-peptidase resistance and enhanced antihyperglycemic activity. *Diabetes.* 1999, *48(4)*, 758-765.
98. González-de Mejía, E.; Bradford, T.; Hasler, C. 2003. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutr. Rev.* 2005, *61*:239-246.
99. Sánchez-Hernández, C.; Martínez-Gallardo, N.; Guerrero-Rangel, A.; Valdés-Rodríguez, S.; Délano-Frier, J. Trypsin and α -amylase inhibitors are differentially induced in leaves of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) in response to biotic and abiotic stress. *Physiol. Plant* 2004, *122*:254-264.
100. Marcus, J.P.; Green, J.L.; Goulter, K.C.; Manners, J.M. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *The Plant J.* 1999, *19*:699-710.
101. Lindeboom N, Chang PR, Tyler RT. 2004. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch*, *56(3-4)*: 89-99.
102. Jane JL, Kasemsuwan T, Leas S, Zobel AlaH, II D, Robyt JF. 1994. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch*, *46*, 121–129.
103. Tester RF. Influence of growth conditions on barley starch properties. 1997. *Int. J. Biol. Macromol.* *21*:37–45.
104. Evers AD. 1973. The size distribution among starch granules in wheat endosperm. *Starch*, *25*:303–304.

VIII. ANEXOS.

ANEXO I. Capítulo de libro “Characterization of bioactive peptides in *Amaranthus hypochondriacus* seed storage proteins”

Rererencia: Barba de la Rosa AP, Silva-Sánchez C, DeMejía E, Characterization of bioactive peptides in *Amaranthus hypochondriacus* seed storage proteins , *ACS Series, Ethnic Foods* , ACS Series, ISBN 978-0-8412-3973-9. E.U.A.. 2005.

Chapter 9

Amaranth: An Ancient Crop for Modern Technology

Ana Paulina Barba de la Rosa¹, Cecilia Silva-Sánchez¹,
and Elvira González de Mejía²

¹IPICYT, Camino a la Presa, San José No. 2055, Col. Lomas 4ta,
C. P. 78216, San Luis Potosí, Mexico

²Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois
at Urbana-Champaign, 1201 West Gregory Drive, 228 ERML, MC-051,
Urbana, IL 61801

Amaranth may play a very important role in the fight against hunger and contribute to the wellness of people. Amaranth contains, besides nutritional benefits, compounds with potential nutraceutical properties against hypertension and cancer. New technologies and agricultural strategies must be developed to increase the availability of this important novel food alternative.

Amaranth is a pseudocereal which provides both grains and tasty leaves of high nutritional value. Due to its properties, it can be considered as a functional food. The seed has a high protein content and its amino acid composition is closer to the optimum balance required in the human diet. The leaves also contain high levels of proteins (27.8 to 48.6%), unsaturated oil (45% of linoleic acid of total fat), fiber (11.1 to 23.2%) and minerals such as potassium, iron, magnesium and calcium (/). Aside from these nutritional components, amaranth also contains other compounds that play important biological roles, such as protease inhibitors, antimicrobial peptides, lectins, and antioxidative compounds

© 2007 American Chemical Society

103

ANEXO II.

**Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus
 hypochondriacus*) Seed**

C. SILVA-SÁNCHEZ,^{1,2} A. P. BARBA DE LA ROSA,³ M. F. LEÓN-GALVÁN,³
 B. O. DE LUMEN,³ A. DE LEÓN-RODRÍGUEZ,³ AND E. GONZÁLEZ DE MEJÍA^{1,2}

Molecular Biology Division, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico, Nutritional Sciences and Toxicology, University of California,
 Berkeley, California 94720, Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois,
 Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801

Amaranth seeds are rich in protein with a high nutritional value, but little is known about their bioactive compounds that could benefit health. The objectives of this research were to investigate the presence, characterization, and the anticarcinogenic properties of the peptide lunasin in amaranth seeds. Furthermore, to predict and identify other peptides in amaranth seed with potential biological activities. ELISA showed an average concentration of 11.1 μg lunasin equivalent/g total extracted protein in four genotypes of mature amaranth seeds. Glutelin fraction had the highest lunasin concentration (3.0 $\mu\text{g/g}$). Lunasin was also identified in albumin, prolamin and globulin amaranth protein fractions and even in popped amaranth seeds. Western blot analysis revealed a band at 18.5 kDa, and MALDI-TOF analysis showed that this peptide matched more than 80% of the soybean lunasin peptide sequence. Glutelin extracts digested with trypsin, showed the induction of apoptosis against HeLa cells. Prediction of other bioactive peptides in amaranth globulins and glutelins were mainly antihypertensive. This is the first study that reports the presence of a lunasin-like peptide and other potentially bioactive peptides in amaranth protein fractions.

KEYWORDS: Amaranth; lunasin; anticancer peptides; antihypertensive peptides; bioactive peptides; HeLa cells

INTRODUCTION

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is a traditional Mexican plant, which provides both grains and tasty leaves of high nutritional value, but it still remains as an underutilized crop. The National Academy of Sciences has stated that amaranth could be a grain with high potential for commercial exploitation because of its superior nutritional quality (1). The seed is high in protein (17%), and its amino acid composition is close to the optimum amino acid balance required in the human diet (2). The leaves also contain a high protein level (28 to 49%), unsaturated oil (45% linoleic acid), fiber (11 to 23%), and minerals such as potassium, iron, magnesium, and calcium (2). Aside from these nutritional components, amaranth seeds also contain other substances that play various biological roles in the diet, such as protease inhibitors, antimicrobial peptides, lectins, and antioxidant compounds (3–5). Aqueous extracts of *Amaranthus gangeticus* leaves have been reported to possess anticancer activity on liver, breast, and colon cancer cell lines (6). Vegetable parts of *Amaranthus tricolor* have been

likewise found to have antitumor and anticell proliferation activities (7).

Lunasin is a unique 43 amino acid peptide whose cancer preventive properties have been demonstrated in a mammalian cell culture model and in a skin cancer mouse model against chemical carcinogens, oncogenes, and inactivators of tumor suppressor proteins (8). Its carboxyl-end contains nine Asp (D) residues, an Arg-Gly Asp (RGD) cell adhesion motif, and a helix with structural homology to chromatin-binding proteins. Lunasin was found in the 2S albumin storage protein of soybean, and its appearance is reported to coincide with the initiation of mitotic arrest and DNA endoreduplication in the developing soybean cotyledon (8–10). The presence of lunasin in barley (11) and wheat (12) suggests the possibility that lunasin or lunasin-like compounds could be found in other grains. The objectives of this research were to investigate the presence, characterization, and the anticarcinogenic properties of the peptide lunasin in amaranth seeds and to predict and identify other peptides in amaranth seed with potential biological activities.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material. Since lunasin concentrations vary depending on genotype and degree of maturity (13), mature amaranth (*Amaranthus*

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: edemeja@iituc.edu.

¹ Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

² University of California, Berkeley.

³ University of Illinois, Urbana-Champaign.