

Extracción y caracterización de las prolaminas del grano de seis cultivares de sorgo *Sorghum bicolor* L. Moench

Ligia Ortíz de Bertorelli ¹

Instituto de Química y Tecnología
Facultad de Agronomía (UCV), Maracay, Venezuela

RESUMEN El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar las prolaminas del grano de sorgo en base a su solubilidad y propiedades moleculares. Los cultivares estudiados fueron: la variedad Zaraza1 (SV-V51), los híbridos Dekalb-64 y Wac-5005 y los híbridos altos en taninos Pioneer-815B y Savanna-5. Las prolaminas del grano, llamadas kafirinas, se extrajeron con isopropanol al 70% a 60°C y se fraccionaron por dos métodos: etanol al 95% y por filtración en gel de Sephadex G-200. El peso molecular se determinó por electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida, con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). Las prolaminas están constituidas por una fracción soluble en etanol al 95% (beta kafirinas) que representan el 21.64% de las kafirinas y el 7.13% de la proteína del grano, y por otra fracción insoluble (alfa kafirinas) que forman el 78.36% de las kafirinas y el 25.39% de la proteína del grano. En el fraccionamiento en columna se obtuvieron tres fracciones, dos principales (A y C) y otra (B) en menor cantidad. La proporción de estas fracciones varió de un cultivar a otro, de forma que en los sorgos SV-V51, D-55, D-64 y Wac-5005 predomina la A, y en los sorgos altos en taninos, la C. Respecto al peso molecular, se observó que las kafirinas reducidas con 2-mercaptoetanol se separaron en cuatro subunidades con pesos moleculares de 15,000, 21,300, 24,300 y 51,500 daltons. Las kafirinas sin reducir mostraron mayor número de subunidades (seis) cuyos pesos moleculares fueron 15,000, 24,300, 48,500, 69,000, 80,000 y 93,500 daltons. Las PC y beta kafirinas reducidas presentaron el mismo número de subunidades que las kafirinas sin fraccionar reducidas con 2-mercaptoetanol.

SUMARY Extraction and characterization of grain prolaminas of six sorghum *Sorghum bicolor* L. Moench cultivars The purpose of this work was to isolate and characterize prolaminas from grains of sorghum, by their solubility and molecular properties. One variety, Zaraza-1 (SV-V51), and five hybrids (Dekalb-55, Dekalb-64, Wac-5005, Pioneer-815B and Savanna-5) were used. The prolaminas, called kafirins, were extracted with 70% isopropanol at 60°C, and then fractionated by two methods: 95% ethanol and gel filtration with Sephadex G-200. The molecular weight was determined by electrophoresis in a discontinuous polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (PAGE-SDS). The alpha kafirin (soluble fraction in 95% ethanol), and 7.13% of the grain's total protein, and the beta kafirin represents 21.64% of kafirin (the insoluble fraction), represents 78.36% of the kafirin and 25.39% of total protein. Three fractions were obtained from the column fractionation, two important ones (A and C), and one (B) in a lesser amount. The proportion of these fractions varied between cultivars, so that in SV-V51, D-64 and Wac-5005, A is predominant, and in high tannin sorghum, C is the predominant one. Kafirins reduced with 2-mercaptoethanol were separated in four subunits with molecular weights of: 15,000, 21,300, 24,300 and 51,500 daltons. Unreduced kafirin showed a larger number of subunits (six) whose molecular weights were: 15,000, 24,300, 48,500, 69,000, 80,000 and 93,500 daltons. Reduced and kafirin showed the same number of subunits as those of nonfractioned kafirin reduced with 2-mercaptoethanol.

INTRODUCCION

Las prolaminas son las proteínas más abundantes de los cereales, constituyendo alrededor del 50% de la proteína total del grano (1). En el sorgo se denominan kafirinas y están localizadas principalmente en el endosperma del

grano, en el cual se encuentran formando cuerpos proteínicos rodeados por una matriz proteínica compuesta por glutelinas, proteínas solubles en NaOH (1, 2). Las kafirinas son proteínas complejas que se solubilizan en alcohol. Así, son solubles en etanol al 60%, isopropanol al 70% y butanol terciario al 60% (3-6). Sastry y Virupaksha (7) encontraron que el 45% de las kafirinas se solubilizan en etanol al 95%, y designaron a la fracción soluble, alfa kafirina. Posteriormente, Beckwith y Jones (8) separaron el

1. Profesor Titular, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, UCV, Maracay, Venezuela, Apartado Postal 4579, Venezuela.

55% de las kafirinas usando etanol al 95% a una temperatura de 9°C. Las kafirinas representan entre 3.1 y 10.7% de la proteína del grano de sorgo, son altos en taninos y de 8.8 a 25.1% de los bajos en taninos (4,9,10). Esta diferencia se debe en gran parte a que la extracción de las prolaminas es afectada negativamente por los taninos, los cuales tienen gran afinidad por esas proteínas con las que forman complejos muy poco solubles. Los taninos, polifenoles aromáticos y las kafirinas, proteínas altamente hidrofóbicas, se asocian fuertemente en medio acuoso (4,9)

Las kafirinas son proteínas heterogéneas constituidas por polipéptidos unidos entre si por enlaces disulfuro, formando agregados de mayor tamaño (7). La heterogeneidad de las kafirinas ha sido comprobada mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE), la cual separa a las proteínas en seis o más bandas (7,11,12). Las alfa kafirinas y las kafirinas sin fraccionar (completas) acusan patrones electroforéticos muy parecidos, que sólo se diferencian en que la cantidad de proteína que se queda en el origen es menor en las alfa kafirinas, lo que indica que la fracción insoluble en alcohol al 95% corresponde a la porción no móvil de alto peso molecular de las kafirinas (7,8).

Las prolaminas del sorgo se separan mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecil sulfato de sodio (PAGE SDS) en dos bandas, una intensa de peso molecular entre 24,000 y 25,000 daltons, y la otra con peso molecular entre 22,000 y 23,000 daltons (10). Paulis y Wall (11) usando también la técnica PAGE SDS, hallaron que las kafirinas migran como una sola banda, con peso molecular aproximado a los 22,000 daltons, mientras que mediante la PAGE se separan hasta en seis subunidades.

El objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar las prolaminas del grano de sorgo en cuanto a su solubilidad y propiedades moleculares.

MATERIAL Y METODOS

Los cultivares analizados fueron los sorgos bajos en taninos variedad Zaraza-1 (SV-51) e híbridos Dekalb-55 (D-55), Dekalb-64 (D-64), Wac-5005 y los altos en taninos, híbridos Pioneer-815B (P-815B) y Savanna-5 (SAV-5). Estos sorgos fueron cultivados en regiones venezolanas en 1985.

Extracción de las Kafirinas

Esta se realizó con isopropanol al 70%, a 60°C (5:15), siguiendo el esquema propuesto por Paulis y Wall (13).

Fraccionamiento de las Kafirinas

El fraccionamiento se llevó a cabo en etanol al 95%. Se fraccionaron según su solubilidad en etanol al 95%, mediante la técnica descrita por Turner, Bound y Miller (14). Las kafirinas solubles se denominan alfa kafirinas, y las insolubles, beta kafirinas.

Por Filtración en Gel

Se empleó una columna de 90 cm de largo y 1.6 cm de diametro empacada con Sephadex G200 (15). Como eluyente se uso urea 8M con una velocidad de flujo en contracorriente de 5 ml/hora.

Determinación del Pqso Molecular de las Kafirinas

El peso molecular se determinó por electroforesis en gel discontinuo, de poli(acrilamida) con dodecil sulfato de sodio (PAGE SDS). El gel superior se preparó con 4.4% de acrilamida y pH 6.8, y el inferior con 12.6% de acrilamida y pH 8.8. La corriente aplicada fue de 4 miliamperios por tubo de gel, por un período de cuatro horas (16).

RESULTADOS Y DISCUSION

Extracción de las Kafirinas

Los resultados revelaron que las kafirinas constituyen el 32.52% de la proteína del grano (Tabla 1). Esta fracción es una de las más abundantes, y varía de un cultivar a otro, encontrándose en mayor proporción (40.25%) en el híbrido Wac-5005, bajo en taninos, y en menor cantidad, en los sorgos altos en taninos P-815B (24.09) y SAV-5 (24.41%). Las variaciones en el contenido de kafirinas entre los sorgos bajos y altos en taninos se debe no solo a factores genéticos, sino también a la reacción de las prolaminas con los taninos, con los que forman complejos muy poco solubles que dificultan su extracción (35,9). El contenido promedio de taninos de los sorgos analizados bajos en este compuesto, es de 0.17% (expresado como equivalentes de catequina), y el de los sorgos altos en taninos, 1.41%(17).

Fraccionamiento de las Kafirinas

Las kafirinas están constituidas por dos fracciones. por una fracción soluble en etanol al 95%, denominada α kafirina que representa el 7.13% de la proteína del grano (Tabla 1) y el 21.64% de las kafirinas (Tabla 2), y por otra fracción insoluble (β kafirina) que forma el 25.39% de la proteína del grano, y el 78.36% de las kafirinas. La solubilidad de estas proteínas en etanol al 95% difiere significativamente entre los cultivares analizados, y es mucho menor que la obtenida (45%) por Sasty y Virupaksha (7) y (55%) por Beckwith y Jones (8) en sus estudios sobre sorgo. Estas diferencias pueden ser atribuidas a variaciones genéticas, ambientales y metodológicas. Igualmente, al compararlas con las prolaminas del maíz que tienen 35.14% de alfa zeinas (15) las kafirinas son menos solubles (21.64%) en etanol al 95%, posiblemente por su naturaleza más hidrofóbica (5).

En el fraccionamiento en columna (Figura 1) se obtuvieron tres fracciones: dos principales (A y C) otra (B) en menor cantidad. La fracción A contiene los polipéptidos de mayor peso molecular. La B está formada por compuesto de tamaño mediano y la C por los más pequeños. La

TABLA 1
DISTRIBUCION DE LAS FRACCIONES ALFA Y BETA DE LAS KAFIRINAS DEL GRANO
DE SEIS CULTIVARES DE SORGO

Cultivares	% Kafirinas	% Fracción*	
		alfa Kafirinas	beta Kafirinas
SV-V51	33.90	8.47	25.43
Dekalb-55	34.58	10.40	24.18
Dekalb-64	37.91	7.83	30.08
Wac-5005	40.25	7.52	32.73
Pioneer-815B	24.09	5.74	18.35
Savanna-5	24.41	2.83	21.58
Promedio	32.52	7.13	25.39

* Porcentaje de la proteína del grano.

TABLA 2
CONTENIDO DE LAS FRACCIONES ALFA Y BETA DE
LAS KAFIRINAS DEL GRANO
DE SEIS CULTIVARES DE SORGO

Cultivares	% Fracción*	
	alfa Kafirinas	beta Kafirinas
SV-V51	24.98b	75.02e
Dekalb-55	30.08a	69.92f
Dekalb-64	20.65d	79.35c
Wac-5005	18.68e	81.32b
Pioneer-815-B	23.83c	76.17d
Savanna-5	11.61f	88.39a
Promedio	21.64	78.36

* g fracción en 100g kafirinas.

Los valores en la misma columna que no presentan letras comunes, alcanzando diferencias significativas al 1%.

proporción de estas fracciones varía entre los cultivares de forma que en los sorgos bajos en taninos predomina la A y en los altos en taninos, la C. Así, las kafirinas de los sorgos SVV-51, D-55, D-64 y Wac-5005 están constituidas principalmente por polipéptidos de alto peso molecular, en tanto que las de los sorgos P-815B y SAV-5, por compuestos más pequeños.

Peso Molecular de las Kafirinas

Las kafirinas reducidas con 2-mercaptoetanol se separaron en cuatro subunidades cuyos pesos moleculares oscilaron entre 1,500 y 51,500 daltons (Tabla 3), siendo la

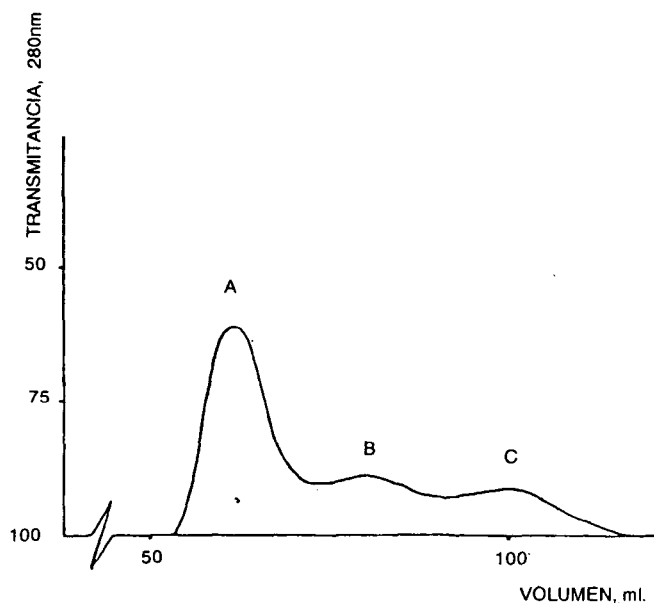


FIGURA 1
Fraccionamiento de las kafirinas SV-V51 en gel Sephadex
G-200

banda mas ancha e intensa la correspondiente a las subunidades de peso molecular de 24,300 daltons (Fotografía 1). Las bandas 2 y 3, son parecidas a las halladas por Guiragossian, Chibber y Van Scoyoc (10), y las 3 y 4 a las obtenidas por Paulis y Wall (11), para esta fracción proteínica. Las alfa y beta kafirinas mostraron patrones electroforéticos similares a las kafirinas completas (sin fraccionar), lo que indica que están formadas por los mismos componentes básicos. Por su parte, las kafirinas sin reducir, con 2-mercaptoetanol, acusaron subunidades de alto peso molecular que se quedaron en el origen y mayor número de bandas, cuyos pesos moleculares variaron entre

TABLA 3
PESO MOLECULAR DE LOS POLIPEPTIDOS DE LAS KAFIRINAS REDUCIDAS
DEL GRANO DE SEIS CULTIVARES DE SORGO

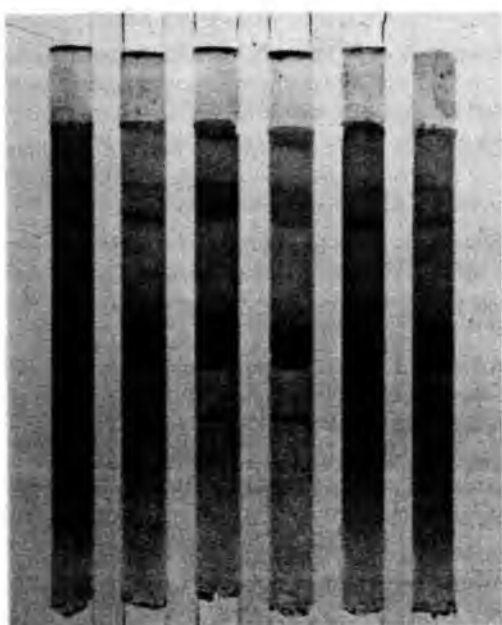
Cultivares	Bandas/Peso molecular (Daltons)			
	1	2*	3	4
SV-V51	51,500	24,300	21,300	15,000
Dekalb-55	51,500	24,300	21,300	15,000
Dekalb-64	51,500	24,300	21,300	15,000
Wac-5005	51,500	24,300	21,300	15,000
Pioneer-815-B	51,500	24,300	21,300	15,000
Savanna-5	51,500	24,300	21,300	15,000

* Banda más intensa,

TABLA 4
PESO MOLECULAR DE LOS POLIPEPTIDOS DE LAS KAFIRINAS SIN REDUCIR
DEL GRANO DE SEIS CULTIVARES DE SORGO

Cultivares	Bandas/Peso molecular (Daltons)					
	1	2	3	4*	5*	6*
SV-V51	93,500	80,000	60,000	48,500	24,300	15,000
Dekalb-55	93,500	80,000	60,000	48,500	24,300	15,000
Dekalb-64	93,500	80,000	60,000	48,500	24,300	15,000
Wac-5005	93,500	80,000	60,000	48,500	24,300	15,000
Pioneer-815-B	—	80,000	60,000	48,500	24,300	15,000
-5	—	80,000	60,000	48,500	24,300	15,000

* Bandas más intensas



FOTOGRAFIA 1

Separación por electroforesis discontinua PAGE-SDS de los polipéptidos de las kafirinas reducidas de seis cultivares de sorgo.

De izquierda a derecha:

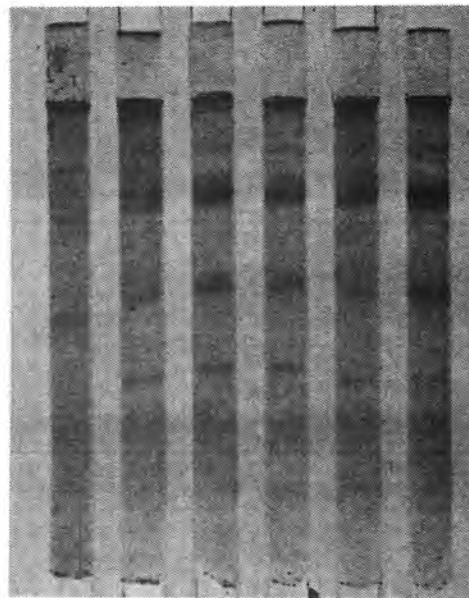
1. SV-V51
2. Dekalb-55
3. Dekalb-64
4. Wac-5005
5. Pioneer-815B
6. Savanna-5

FOTOGRAFIA 2

Separación por electroforesis discontinua PAGE-SDS de los polipéptidos de las kafirinas sin reducir de seis cultivares de sorgo.

De izquierda a derecha:

1. SV-V51
2. Dekalb-55
3. Dekalb-64
4. Wac-5005
5. Pioneer-815B
6. Savanna-5



15,000 y 93,500 daltons (Tabla 4). En todos los cultivares los polipéptidos principales están representados por las bandas 4 y 5 que fueron las más intensas (Fotografía 2). La presencia de bandas de baja movilidad sugiere que las subunidades de menor peso molecular pueden encontrarse unidas por enlaces disulfuro (SS) formando oligómeros de mayor tamaño (7,8,15). En las alfa y beta kafirinas sin reducir se consiguieron las mismas bandas que para las kafirinas sin fraccionar ni reducir, lo que demuestra semejanza en la composición proteínica. No obstante, las beta kafirinas presentaron bandas más claras y mayor concentración de proteínas en el origen que las alfa kafirinas, resultados que concuerdan con los de Beckwith y Jones (8) quienes señalaron que las kafirinas insolubles en alcohol al 95% corresponden a la porción no móvil de alto peso molecular de las kafirinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por el financiamiento de esta investigación (Proyecto S1-1673), y agradecen a los Ingenieros Agrónomos Hector Mena, José Fernández, Iván Martínez y José Moranto, la donación de las muestras de sorgo.

REFERENCIAS

1. Mosse J. Alcohol-soluble proteins of cereal grain. *Fed Proc*, 25: 1663-1669, 1968.
2. Taylor J, L Novellie & N Liebenberg. Sorghum protein body composition and ultrastructure. *Cereal Chem* 61(1): 69-73, 1984.
3. Flidell G & K. Kobrehel. Studies on sorghum proteins. I. Solubilization of proteins with soaps. *J Agric Food Chem*, 33(2): 303-308, 1985.
4. Jambunathan R & E. Mertz. Relationship between tannin levels, rat growth and distribution of proteins in sorghum. *J Agric Food Chem*, 21(4): 692-696, 1973.
5. Taylor J L. Schussler & W. van der Walt. Fractionation of proteins from lowtannin sorghum grain. *J Agric Food Chem*, 32(1): 149-154, 1984.
6. Virupaksha T & L. Sastry. Studies on the protein content and amino acid composition of some varieties of grain sorghum. *J Agric Food Chem*, 16(2): 199-203, 1968.
7. Sastry L & T. Virupaksha. Alcohol-soluble proteins of grain sorghum. *Cereal Chem*, 46: 284-293, 1969.
8. Beckwith A & R. Jones. Physical chemical characterization of grain sorghum prolamine fractions and components. *J Agric Food Chem*, 20(2): 259-261, 1972.
9. Chibber B E. Mertz & J. Axtell. Effects of dehulling on tannin content, protein distribution, and quality of high and low tannin sorghum. *J Agric Food Chem*, 26(3): 679-683, 1978.
10. Guiragossian V B. Chibber, S. Van Scoyoc, R. Jambunathan, E. Mertz & J. Axtell. Characteristics of protein from normal, high lysine and high tannin sorghum. *J Agric Food Chem*, 26(1): 219-223, 1978.
11. Paulis, J & J Wall. Distribution and electrophoretic properties of alcohol soluble proteins in normal and high lysine sorghums. *Cereal Chem*, 56(1): 20-23, 1979.
12. Sastry L & T Virupaksha. Disc electrophoresis of sorghum seed proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 19:505-513, 1967.
13. Paulis J & J Wall. Comparison of the protein composition of selected corns and their wild relatives teosinte and tripsacum. *J Agric Food Chem*, 25: 265-270, 1977.

14. Turner J J Boundy & R. Dimler. Zein: A heterogeneous protein containing disulfide linked aggregates. *Cereal Chem*, 42: 452-461, 1965.
15. Paulis J Disulfide structures of zein proteins from corn endosperm. *Cereal Chem*, 58(6): 542-546, 1981.
16. Luzardo M. Caracterización y Uso de las Proteínas de Sorgo. Tesis de Maestría, Universidad Simón Bolívar, Caracas, 1980, 139 p.
17. Arteaga J & L Ortiz. Evaluación nutricional de la proteína del grano de seis cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Rev Fac Agron. UCV. (Maracay)* 15: 213-224, 1989.