

## Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto

Por, R. Juan<sup>1</sup>, J. Pastor<sup>1</sup>, M. Alaiz<sup>2</sup>, C. Megías<sup>2</sup> y J. Vioque<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla

<sup>2</sup> Instituto de la Grasa (C.S.I.C.), Padre García Tejero 4, 41012-Sevilla

\* Corresponding author: Tel. 954-611550, Fax. 954-616790. e-mail: jvioque@cica.es

### RESUMEN

#### Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto.

El objetivo de este estudio fue determinar la composición aminoacídica y el perfil proteico de las semillas de once especies de amaranto. Las especies estudiadas fueron *A. viridis*, *A. powellii*, *A. muricatus*, *A. deflexus*, *A. graecizans*, *A. blitoides*, *A. retroflexus*, *A. blitum*, *A. albus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*. Se estudiaron poblaciones silvestres de estos taxones localizadas en el suroeste de España. El perfil proteico se estudió mediante cromatografía de filtración en gel y electroforesis desnaturante. Este perfil fue similar en todas las especies, con ligeras variaciones en los pesos moleculares y abundancia de las principales proteínas. Así, mediante cromatografía de filtración en gel se apreciaron seis fracciones mayoritarias de alrededor de 300 kDa, 180 kDa, 120 kDa, entre 40 y 50 kDa, entre 20 y 30 kDa y menores de 10 kDa. Por otro lado, el estudio electroforético mostró tres grupos de péptidos mayoritarios con pesos comprendidos entre 50 y 64 kDa, entre 33 y 37 kDa y entre 18 y 25 kDa. Las especies con la composición aminoacídica más equilibrada correspondieron a taxones no cultivadas. *A. muricatus*, *A. blitum* y *A. powellii* mostraron la composición aminoacídica más equilibrada. *A. hypochondriacus* y *A. graecizans* mostraron la composición aminoacídica más deficitaria, con carencias en cinco aminoácidos esenciales. Estos resultados muestran el potencial de los taxones silvestres de amaranto para su introducción como cultivos o su uso para la mejora mediante hibridación de otros cultivados, como *A. hypochondriacus*.

**PALABRAS-CLAVE:** Amaranto - Composición aminoacídica - Perfil proteico - Semillas.

### SUMMARY

#### Seed protein characterisation of eleven species of amaranthus.

The protein profile and the amino acid composition of eleven amaranth species have been studied. The following species were taken into account: *A. viridis*, *A. powellii*, *A. muricatus*, *A. deflexus*, *A. graecizans*, *A. blitoides*, *A. retroflexus*, *A. blitum*, *A. albus*, *A. cruentus* and *A. hypochondriacus*. Seed samples were obtained from wild populations located in the southwest of Spain. The protein profile was studied by gel filtration chromatography and denaturing electrophoresis. Profiles were similar in all taxa, with small variations in the molecular weights and amounts of the main seed proteins. Thus, after gel filtration chromatography six main fractions of around 300 kDa, 180 kDa, 120 kDa, between 40 and 50 kDa, 20 and 30 kDa and below 10 kDa were observed. On the other hand, the electrophoretic analysis showed peptides

grouped into three main fractions, between 50 and 64 kDa, 33 and 37 kDa and 18 and 25 kDa. The most balanced amino acid compositions were observed in the wild taxa *A. muricatus*, *A. blitum* and *A. powellii* showed the most equilibrated amino acid composition. *A. hypochondriacus* and *A. graecizans* showed the most deficient amino acid composition with limitations in five essential amino acids. These results show the potential of wild amaranthus taxa for their introduction as crops or their use in the improvement by hybridization mechanisms of other crops such as *A. hypochondriacus*.

**KEY-WORDS:** Amaranth - Amino acid composition - Protein profile - Seeds.

### 1. INTRODUCTION

El género *Amaranthus* (Familia *Amaranthaceae*) está constituido por plantas tanto cultivadas como silvestres de distribución cosmopolita. El cultivo de *Amaranthus* en América y en algunos lugares de Asia, como India o Nepal, ya era conocido por las civilizaciones más antiguas (Búcaro-Segura y Bressani, 2002). Aunque se abandonó dicha práctica debido, fundamentalmente, a la introducción de nuevas plantas desde el viejo mundo, desde hace unas décadas ha aumentado el interés por rescatar del olvido este cultivo. En este periodo de tiempo el número de investigaciones acerca de este género han aumentado considerablemente, y se han realizado desde los más diversos puntos de vistas (Becker *et al.*, 1981; Bressani y García-Vela, 1990; Mosyakin y Robertson, 1996; Zheleznov *et al.*, 1997; Chan y Sun, 1997; Costea *et al.*, 2004). El atractivo de estas plantas es que de ellas se puede aprovechar prácticamente todo. Así, de sus semillas se puede elaborar harina, sus hojas pueden ser utilizadas como verduras, sus tallos son útiles en la fabricación de piensos animales, algunas son ornamentales e incluso sus inflorescencias pueden ser utilizadas como fuente de colorantes naturales rojos (Becker *et al.*, 1981; Pedersen *et al.*, 1987; Zheleznov *et al.*, 1997; Cai *et al.*, 1998 a,b). Son muchos los autores que han puesto de manifiesto el valor nutritivo de algunas especies de este género, basándose sobre todo en la composición de sus proteínas (Bressani, 1989; Bressani & García-Vela, 1990; Lehmann, 1996). Según Stalknecht y Schulz-Schaeffer (1993), el

hecho de que sean plantas  $C_4$ , junto a su característica anatomía, contribuye a su gran adaptabilidad a distintas condiciones ambientales. Algunas de las ventajas de estas plantas son su tolerancia a la sequía y altas temperaturas, junto a su rápido crecimiento (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Zheleznov *et al.*, 1997; Costea *et al.*, 2004). Estas características las convierten en una fuente de proteínas ideal en países donde las temperaturas y el abastecimiento de agua constituyen un grave problema. Además, otra ventaja de este género, considerado por muchos como un pseudo-cereal (Lehmann, 1996), frente a los verdaderos cereales es que su contenido proteico es más alto (12-18%), al igual que su contenido en lisina (entre el 5-7% frente alrededor del 2%) (Bressani y García-Vela, 1990; Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Stallknecht y Schulz-Schaeffer, 1993; Zheleznov *et al.*, 1997). Por otro lado, el nivel de aminoácidos azufrados (6-12%) (Barba de la Rosa *et al.*, 1992) también es más alto que el indicado en las semillas de leguminosas (2-4%) por algunos autores (Mahe *et al.*, 1994; Galili y Larkins, 1999). Como consecuencia de estos datos, el género *Amaranthus* se convierte en una buena fuente de aminoácidos esenciales, aproximándose a los valores recomendados por la FAO/WHO (1991).

En el presente trabajo se estudia la composición proteica de las semillas de once especies de amaranto distribuidas en la mitad occidental de Andalucía. Estas especies son: *A. viridis*, *A. powellii*, *A. muricatus*, *A. deflexus*, *A. graecizans*, *A. blitoides*, *A. retroflexus*, *A. blitum*, *A. albus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*. Aunque todas las muestras proceden de poblaciones silvestres, algunas especies son o han sido cultivadas para el consumo de sus semillas o de sus hojas. Por ejemplo, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* han sido una fuente importante de proteínas en el pasado (Facciola, 1990; Moerman, 1998). También *A. graecizans* (Uphof, 1959) y *A. blitum* se han cultivado para el consumo de sus hojas en verde (Facciola, 1990). El resto se consideran malas hierbas, aunque en algunas de ellas también se ha estudiado el aprovechamiento de sus semillas y hojas como *A. viridis*, *A. powellii*, *A. blitoides*, *A. retroflexus* o *A. albus* (Uphof, 1959; Usher, 1974; Kunkel, 1984; Moerman, 1998). Excepto de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* es la primera vez, según nuestros conocimientos, que se realiza una caracterización proteica de la semilla de los amarantos estudiados.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Material

Las semillas fueron recolectadas de poblaciones silvestres localizadas en las provincias de Sevilla, Huelva, Cádiz y Córdoba. Pliegos con ejemplares de estas poblaciones se encuentran depositados en el Herbario del Departamento de Botánica y Ecología de la Universidad de Sevilla.

### 2.2. Extracción de las proteínas de las semillas

Las semillas de amaranto fueron molidas en un molinillo domestico y las proteínas se extrajeron con una disolución al 0.2% (p/v) de NaOH en proporción 1:10 (p:v) durante 30 minutos, con agitación y a temperatura ambiente. Las proteínas extraídas se recuperaron en el sobrenadante mediante centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos.

### 2.3. Determinación del contenido proteico

El contenido en proteínas totales se determinó a partir del contenido en nitrógeno x 6,25, calculado mediante análisis elemental usando un analizador elemental LEKO. Para la determinación del contenido en proteínas solubles se usó el método descrito por Bradford (1976) usando como patrón albúmina de suero bovino.

### 2.4. Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel se desarrolló en un equipo de FPLC con una columna Superose 12 HR 10/30 de Pharmacia. Las muestras liofilizadas se disolvieron en borato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,2 M a pH 8,3. El volumen y concentración de las muestras inyectadas fue de 200  $\mu$ l y 1,6 mg/ml respectivamente. Como eluyente se usó el mismo en que se disolvieron las muestras con un flujo de 0,4 ml/min. Las proteínas se detectaron a 214 nm. Para la determinación de los pesos moleculares se usó un kit de proteínas de Pharmacia.

### 2.5. Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes (con SDS) y reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol) de acuerdo con Schagger y von Jagow (1987). Para la realización de las electroforesis se usó el equipo Mini Protean 3 de BIORAD. El gel de separación tenía un 15% (p/v) de acrilamida más bisacrilamida, mientras que el de concentración tenía el 4% (p/v). La longitud de ambos geles fue de 6 y 2 cm respectivamente con un grosor de 1 mm. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 60 y 120 voltios para los geles de concentración y separación respectivamente. Las proteínas se tiñeron con una solución al 0.25% (p/v) de coomassie brilliant blue G en metanol 45%, ácido acético 10% durante una hora. El desteñido de los geles se realizó en ácido acético al 10%. Para la determinación de los pesos moleculares se usó un kit de proteínas de Pharmacia.

### 2.6. Determinación de la composición aminoacídica

Para la determinación de la composición aminoacídica se siguió el método de Alaiz *et al.* (1992).

Para ello, las muestras (10 mg) fueron hidrolizadas con 4 ml de HCl 6 N. Las soluciones se incubaron en atmósfera de nitrógeno durante 24 h a 100° C. Los aminoácidos se determinaron mediante hidrólisis ácida, tras derivatización con dietil etoximetilnematolato, mediante HPLC, usando el ácido D,L- $\alpha$ -aminobutírico como estándar interno. La separación se realizó con una columna de fase reversa de 300 x 3.9 mm (Nova-pack C<sub>18</sub>, 4  $\mu$ m, Waters, Milford, MA, U.S.A.) usando un sistema de gradiente binario a 18° C. Los solventes usados fueron (A) acetato de sodio 25 mM (pH 6) y (B) acetonitrilo. Los solventes se inyectaron en la columna con un flujo de 0,9 ml/min de la siguiente forma: tiempo 0-3 min, gradiente lineal de A:B (91:9) a A:B (86:14); 3-13 min, elución con A:B (86:14); 13-30 min, gradiente lineal de A:B (86:14) a A:B (69:31); 30-35 min, elución con A:B (69:31). El equipo de HPLC consistió en un multisistema Model 600 E con un detector 484 UV-Vis (Waters). Para la identificación de los aminoácidos se usó una mezcla de estándares de Sigma.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Contenido de proteínas de las semillas de amaranto

Los contenidos proteicos de las especies estudiadas fueron muy similares en todas las especies excepto para *A. powellii*. Así, los valores medios de estos porcentajes oscilaron entre el 9.2% en *A. blitoides* y el 15% en *A. muricatus* (Tabla 1). Estos resultados son ligeramente inferiores a los observados por otros autores en amarantos cultivados que presentan porcentajes más altos de proteínas, como *A. cruentus* (15.3%) o *A. caudatus* (16.6%) (Gorinstein *et al.*, 1991).

#### 3.2. Composición aminoacídica de las proteínas de las semillas de amaranto

En general se considera que los amarantos cultivados constituyen una fuente de proteínas bastante equilibrada respecto a la composición aminoacídica. La composición de aminoácidos de las proteínas de las semillas es bastante homogénea en todas las especies estudiadas siendo los aminoácidos más abundantes aspártico, glutámico, serina, glicina y leucina (Tabla 1). Estudios previos indican que la calidad nutricional de las semillas de los amarantos cultivados es mejor que en muchos cereales, ya que el contenido en aminoácidos en las especies de este género se aproxima más a los valores mínimos establecidos por la FAO/WHO (1991) como óptimos en una dieta para humanos (Bressani y García-Vela, 1990; Gorinstein *et al.*, 1991). Así, el balance de aminoácidos esenciales es bastante mejor que el de muchas proteínas vegetales. Por ejemplo, presentan mayores contenidos de aminoácidos azufrados (metionina más cisteína) que las leguminosas. Así, los contenidos en

aminoácidos azufrados oscilan entre el 1.6% en *A. muricatus* y *A. cruentus* y el 3.6% en *A. deflexus*. Si se comparan con las proteínas de cereales, los amarantos estudiados presentan mayores contenidos de treonina, arginina, triptófano y lisina que las proteínas de cereales (Lorenz, 2003), aunque peores contenidos de ramificados, principalmente valina e isoleucina (Tabla 1). Hay que destacar que estas proteínas son una fuente rica en triptófano, como puede verse en la Tabla 1, aminoácido que no es muy abundante en el mundo vegetal y que, sin embargo, en la mayoría de las especies estudiadas supera ampliamente el valor establecido por la FAO/WHO (1991).

Atendiendo a los estudios previos, los aminoácidos más escasos en este género son leucina, treonina e isoleucina (Bressani y García-Vela, 1990). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la cantidad de treonina es óptima, ya que en todas las especies estudiadas está por encima del 4%, superando el valor del 3,4% recomendado por la FAO/WHO (1991). De las especies estudiadas *A. muricatus* y *A. deflexus* presentan la composición aminoacídica que más se aproxima a los valores recomendados por la FAO/WHO (1991). Por el contrario las especies más deficitarias son *A. hypochondriacus*, que es deficitario en histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina y lisina y *A. graecizans* deficitario en tirosina, isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina. Es destacable que entre las especies más equilibradas, en lo que respecta a su composición aminoacídica, se encuentren las consideradas como malas hierbas, como *A. muricatus* o *A. deflexus*, mientras que entre las peores esté una de las más cultivadas, como es *A. hypochondriacus*. Dada la facilidad de hibridación observadas en este género, estas plantas silvestres pueden representar una buena fuente de aminoácidos esenciales para mejorar la composición química de las cultivadas mediante hibridación. O también plantearse la introducción como cultivo de estas especies silvestres que tienen una mejor composición aminoacídica.

#### 3.3. Perfil cromatográfico de filtración en gel de las proteínas de las semillas de amaranto

Se realizó un estudio del perfil de las proteínas nativas en cromatografía de filtración en gel. Las especies de amaranto estudiadas mostraron unos perfiles semejantes con presencia de varias fracciones mayoritarias (Figuras 1-3). Así, las fracciones mayoritarias constituidas por proteínas de peso molecular altos fueron de 300 kDa (fracción A), alrededor de 180 kDa (fracción B), 120 kDa (fracción C), entre 40 y 50 kDa (fracción D), entre 20 y 30 kDa (fracción E) y otras por debajo de 10 kDa (fracciones F, G y H). Se ha descrito la presencia en las semillas de amaranto de una proteína de reserva semejante a la legumina de las leguminosas con un peso mayor de 300 kDa y denominada amarantina (Martínez *et al.*, 1997). Esta proteína tiene la

Tabla 1  
**Contenido proteico y composición aminoacídica de las especies de amaranto estudiadas (gramos / 100 gramos proteína).**  
 Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estandar del número de poblaciones estudiadas.

n <sup>a</sup>	A. viridis		A. powellii		A. muricatus		A. deflexus		A. graecizans		A. blitoides		A. retroflexus		A. blitum		A. albus		A. cruentus		A. hypochon.		FAO <sup>d</sup>		
	3	1	4	4	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4	4	
Asp <sup>b</sup>	13.1 $\pm$ 0.9	10.6	12.3 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 0.5	12.7	13.6 $\pm$ 1.9	12.2 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.2	13.2 $\pm$ 0.9	12.0 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.3	12.5 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 0.8										
Glu <sup>c</sup>	19.7 $\pm$ 0.7	18.8	20.9 $\pm$ 3.3	19.5 $\pm$ 0.7	18.4	18.4	18.3 $\pm$ 2.0	18.5 $\pm$ 0.7	22.1 $\pm$ 3.5	18.6 $\pm$ 1.9	17.7 $\pm$ 1.6	18.1 $\pm$ 0.5													
Ser	8.7 $\pm$ 0.2	8.9	8.9 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.3	9.3	9.3	10.6 $\pm$ 1.2	9.5 $\pm$ 1.0	8.4 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 2.3	10.5 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 0.9													
His	2.0 $\pm$ 0.1	2.0	2.2 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.3	2.3	2.3	1.9 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3	1.9												
Gly	9.7 $\pm$ 0.2	10.8	9.6 $\pm$ 0.4	9.3 $\pm$ 0.1	10.1	10.1	11.5 $\pm$ 0.8	10.8 $\pm$ 0.8	8.9 $\pm$ 0.3	10.9 $\pm$ 1.4	11.2 $\pm$ 0.7	11.4 $\pm$ 0.8													
Thr	4.4 $\pm$ 0.0	4.7	4.5 $\pm$ 0.2	4.4 $\pm$ 0.2	4.4	4.4	4.6 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.3	3.4												
Arg	8.8 $\pm$ 0.4	10.3	8.7 $\pm$ 0.6	8.9 $\pm$ 0.7	8.2	8.2	8.6 $\pm$ 1.0	9.0 $\pm$ 0.6	8.4 $\pm$ 0.5	9.3 $\pm$ 0.6	8.8 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 1.1													
Ala	4.4 $\pm$ 0.3	4.4	4.5 $\pm$ 0.2	4.4 $\pm$ 0.4	4.7	4.7	3.9 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.4													
Tyr	2.0 $\pm$ 0.3	2.5	2.3 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.2	2.6	2.6	2.1 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2	6.3 <sup>e</sup>												
Val	4.4 $\pm$ 0.8	4.2	3.7 $\pm$ 0.5	3.9 $\pm$ 0.2	4.0	4.0	3.9 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 0.8	4.0 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.5	3.5												
Met	1.5 $\pm$ 0.7	0.3	0.2 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.7	0.4	0.4	0.4 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.4	2.5 <sup>f</sup>												
Cys	0.3 $\pm$ 0.2	1.9	1.4 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.3	2.1	2.1	1.4 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.3													
Ile	2.9 $\pm$ 0.1	3.7	3.1 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.5	2.7	2.7	3.1 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.6	2.8												
Trp	2.9 $\pm$ 0.1	0.0	1.6 $\pm$ 1.8	2.1 $\pm$ 1.4	2.9	2.9	1.2 $\pm$ 2.3	3.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 1.3	3.7 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 1.6	1.1													
Leu	6.4 $\pm$ 0.1	7.2	6.7 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 0.4	6.1	6.1	6.6 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 0.2	6.4 $\pm$ 0.3	6.6													
Phe	3.8 $\pm$ 0.1	3.8	4.0 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.3	3.6	3.6	3.5 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.4													
Lys	4.8 $\pm$ 0.1	5.9	5.4 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4	5.5	5.5	4.7 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.7	5.8												
Contenido proteico	12.9 $\pm$ 0.6	9.4	15.0 $\pm$ 5.8	13.8 $\pm$ 1.5	14.2	14.2	9.2 $\pm$ 2.7	13.5 $\pm$ 1.1	12.3 $\pm$ 1.9	11.3 $\pm$ 2.0	12.7 $\pm$ 1.7	10.7 $\pm$ 0.5													

<sup>a</sup> Número de poblaciones estudiadas.

<sup>b</sup> Acido aspártico + Asparagina.

<sup>c</sup> Acido glutámico + Glutamina.

<sup>d</sup> Requerimientos en aminoácidos esenciales (mg/g proteína), propuestos por la FAO (1991).

<sup>e</sup> Tirosina + Fenilalanina.

<sup>f</sup> Metionina + Cisteína.

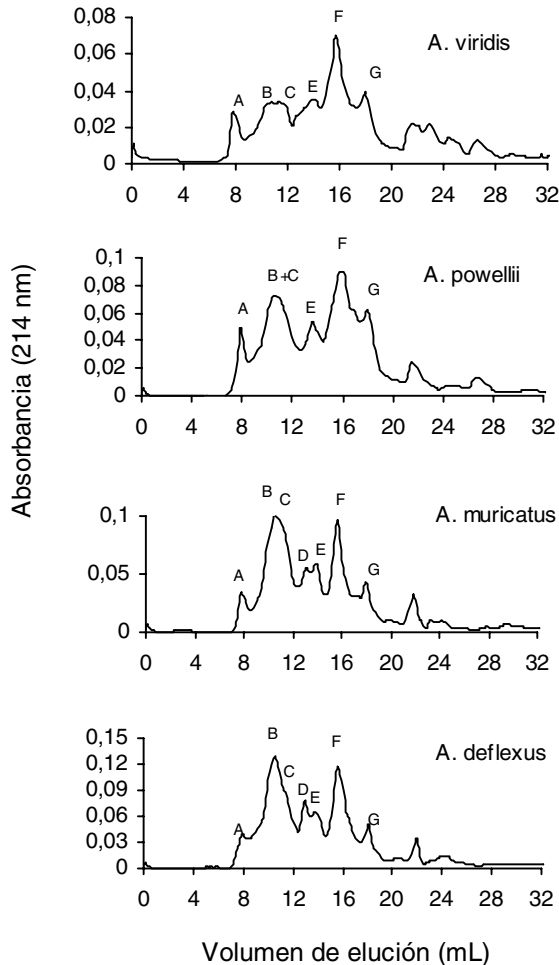


Figura 1

Perfil cromatográfico de filtración en gel de las proteínas de la semilla de *A. viridis*, *A. powellii*, *A. muricatus* y *A. deflexus*.

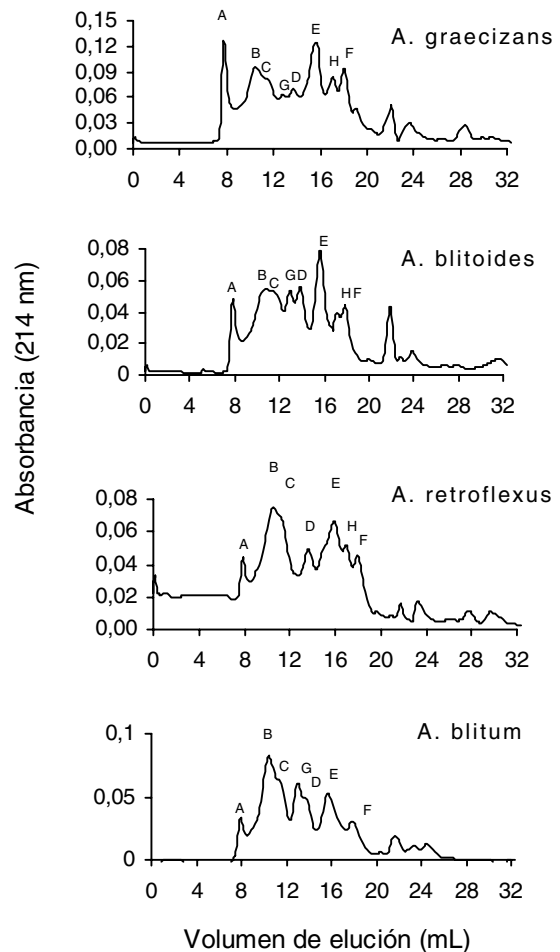


Figura 2

Perfil cromatográfico de filtración en gel de las proteínas de la semilla de *A. graecizans*, *A. blitoides*, *A. retroflexus* y *A. blitum*.

estructura de un hexámero constituido por seis subunidades con pesos en torno a los 60 kDa. A su vez, cada una de estas subunidades está compuesta por dos péptidos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de 40 y 20 kDa unidos por puentes disulfuro. Puede estimarse que las fracciones observadas en el perfil cromatográfico corresponden a distintos niveles de agregación de esta proteína mayoritaria. Así, la fracción A podría corresponder a la proteína intacta; la fracción B al trímero formado por tres monómeros  $\alpha$ - $\beta$  y la fracción C a dímeros. En cambio, las fracciones D y E corresponderían a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente componentes de los monómeros. El grado de disociación de las proteínas multiméricas, como la amarantina, puede variar en función de la especie. La desnaturalización parcial de ésta y otras proteínas se puede deber también probablemente al solvente, NaOH al 0.2% (p/v), usado para la extracción de las proteínas de la semilla.

### 3.4. Perfil electroforético de las proteínas de las semillas de amaranto

El perfil electroforético en condiciones desnaturizantes muestra un patrón de bandas comunes

para todas las especies estudiadas, aunque también se aprecian diferencias cualitativas y cuantitativas que han permitido realizar el análisis taxonómico de estas plantas (Figura 4). Los péptidos de las semillas de amaranto estudiadas pueden dividirse en cuatro grupos. Por un lado un grupo bien definido entre 50 y 64 kDa. Se ha sugerido que estos péptidos pueden representar una forma inmadura de subunidades  $\alpha$ - $\beta$  componentes de la amarantina que, por causas desconocidas, no se disocia en los péptidos  $\alpha$  y  $\beta$  tras el tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol (Martinez *et al.*, 1997). Otro grupo de péptidos está constituido por moléculas con un peso entre 33 y 37 kDa. Estos péptidos corresponden a la subunidad  $\alpha$  de la amarantina. Un tercer grupo está formado por péptidos entre 18 y 25 kDa. Estos péptidos, que corresponden a la subunidad  $\beta$  de la amarantina, presentan una mayor variabilidad respecto a los pesos moleculares en relación con la subunidad  $\alpha$ . Por último existe un cuarto grupo formado por abundantes péptidos menores de 17 kDa.

En conclusión, los resultados obtenidos tras la caracterización proteica de las semillas de diversas especies de amaranto son prometedores. Las es-

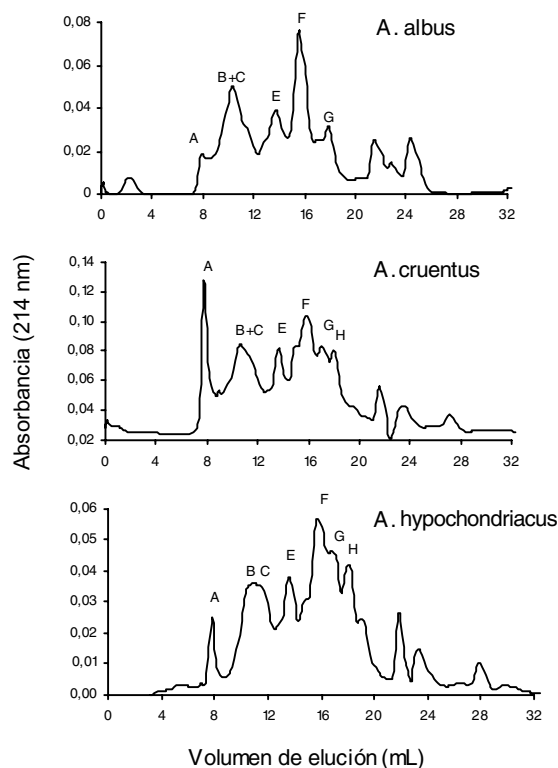


Figura 3  
Perfil cromatográfico de filtración en gel de las proteínas de la semilla de *A. albus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

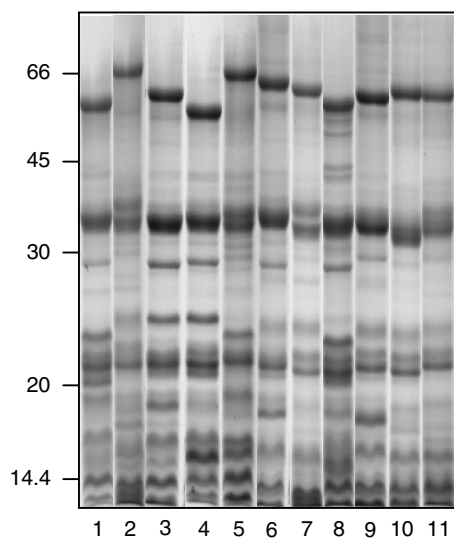


Figura 4  
Perfil en electroforesis desnaturalizante de las proteínas de la semilla de los amarantos estudiados. 1) *A. viridis*. 2) *A. powellii*. 3) *A. muricatus*. 4) *A. deflexus*. 5) *A. graecizans*. 6) *A. blitoides*. 7) *A. retroflexus*. 8) *A. blitum*. 9) *A. albus*. 10) *A. cruentus*. 11) *A. hypochondriacus*. A la izquierda se indican los pesos moleculares (kDa) de los patrones electroforéticos usados.

pecies silvestres estudiadas presentan un perfil proteico en las semillas parecido entre ellas. Sin embargo en la composición aminoacídica se han observado diferencias, con una composición aminoacídica más equilibrada en algunos taxones silvestres, como *A. powellii*, *A. muricatus* o *A. defle-*

*xus*, que podrían ser explotados como tales para su uso en alimentación o para la mejora genética de otros cultivados, dada la facilidad de hibridación de estas plantas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en parte con cargo al proyecto AGL 2004-03930 (M.E.C.). Agradecemos la ayuda técnica de M. Dolores García.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alaiz M, Navarro J L, Giron J, Vioque E. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *J. Cromatogr.* **591**, 181-186.
- Barba de la Rosa A P, Gueguen J, Paredes-López O, Viroben G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, an amino acid composition of amaranth seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 931-936.
- Becker R, Wheelr E L, Lorenz K, Stafford A E, Grosjean O K, Betschart A A, Saunders R.M. 1981. A composition study of amaranth grain. *J. Food Sci.* **46**, 1175-1180.
- Bradford M M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bressani R. 1989. The proteins of grain amaranth. *Food Rev. Int.* **5**, 13-38.
- Bressani R, García-Vela L A. 1990. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1205-1209.
- Búcaro-Segura M E, Bressani R. 2002. Distribución de la proteína en fracciones físicas de la molienda y tamizado del grano del amaranto. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **52**(2), 167-171.
- Cai Y Z, Sun M, Corke H. 1998 a. Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4491-4495.
- Cai Y Z, Sun M, Wu H X, Huang R H, Corke H. 1998 b. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2063-2070.
- Chan K F, 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.
- Costea M, Weaver S E, Tardif F J. 2004. The biology of Canadian weeds. 130. *Amaranthus retroflexus* L., *A. powellii* S. Watson and *A. hybridus* L. *Can. J. Plant Sci.* **84**, 631-668.
- Facciola S. 1990. Cornucopia - A Source Book of Edible Plants. Kampong Publications.
- FAO/WHO. 1991. *Protein quality evaluation*. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper n° 51, 66 pages. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Gallili G, Larkins B A. 1999. Enhancing the content of the essential amino acids lysine and threonine in plants en Singh B K. (Ed.), *Plant amino acids biochemistry and biotechnology*, 487-507. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gorinstein S, Moshe R, Greene L, Arruda P. 1991. Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 8851-8854.

- Kunkel G. 1984. Plant for Human Consumption, Koeltz Scientific Books.
- Lehmann J W. 1996. Case history of grain amaranth as an alternative crop. *Cereal Foods World* **41**, 399-411.
- Lorenz K. 2003. Triticale en Caballero B, Trugo L, Finglas P. (Eds.) *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 5873-5878. Academic Press Inc., Orlando.
- Mahe S, Gausseres N, Tome D. 1994. Legume proteins for human requirements. *Grain Legumes (AEP)* **7**, 15-17.
- Martinez E N, Castellani O F, Añón M C. 1997. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3832-3839.
- Moerman D. 1998. *Native American Ethnobotany*, Timber Press. Oregon.
- Mosyakin S L, Robertson K R. 1996. New infrageneric taxa and combinations in *Amaranthus* (Amaranthaceae). *Ann. Bot. Fennici* **33**, 275-281.
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Stallknecht G F, Schulz-Schaeffer J R. 1993. Amaranth rediscovered en Janick J, Simon J E (Eds.) *New crops*, 211-218. Willey, New York.
- Uphof J C Th. 1959. Dictionary of Economic Plants. Ed. Lubrecht & Cramer Ltd. Weinheim.
- Usher G. 1974. A Dictionary of Plants Used by Man. Londres, Ed. Constable and Company.
- Zheleznov A V, Solonenko L P, Zheleznova N B. 1997. Seed proteins of the wild and the cultivated *Amaranthus* species. *Euphytica* **97**, 177-182.

Recibido: Marzo 2006  
Aceptado: Noviembre 2006