

## KAFIRINAS, PROTEÍNAS CLAVE PARA CONFERIR DIGESTIBILIDAD Y CALIDAD PROTEICA AL GRANO DE SORGO\*

### KAFIRINS, KEY PROTEINS TO IMPROVE DIGESTIBILITY AND PROTEIC QUALITY OF SORGHUM GRAIN

Elizabeth Chiquito-Almanza<sup>1</sup>, Gabriel Cobielles-Castrejón<sup>2</sup>, Noé Montes-García<sup>2</sup>, Víctor Pecina-Quintero<sup>2</sup> y José Luis Anaya-López<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro, km. 9.5. La Palma, Tarímbaro, Michoacán, México. A. P. 53. C. P. 58262. Tel. 01 443 295809. (ely\_sayra@hotmail.com). <sup>2</sup>Campo experimental Bajío. INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km. 6.5. Celaya, Guanajuato, México. C. P. 38110. Tel. 01 461 6115323. Ext. 108 y 123. (cobielles@hotmail.com), (montes.noe@inifap.gob.mx), (vpecina59@yahoo.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: jose.luis.al@hotmail.com.

#### RESUMEN

El sorgo es un alimento básico en varios países de África y Asia. Sin embargo, su grano es deficiente en lisina y su calidad proteica disminuye cuando se cocina. Los intentos para conferir calidad proteica al grano de sorgo, no han satisfecho los requerimientos nutricionales, y las alternativas biotecnológicas se han enfocado a la expresión heteróloga de proteínas, sin prestar atención a incrementar la digestibilidad proteica. El incremento del contenido de lisina en maíz QPM y el silenciamiento génico de las  $\alpha$ -zeínas en maíz, sugieren que la modificación de la expresión de las kafirinas, una familia de prolaminas del sorgo homólogas a las zeínas de maíz, permite incrementar el contenido de lisina y la digestibilidad proteica del grano de sorgo. En esta revisión se discuten aspectos básicos de la clasificación de las kafirinas, su homología con las zeínas de maíz, y su contribución en la calidad y digestibilidad proteica del grano de sorgo. El objetivo es sustentar la hipótesis de que la modificación de la expresión de las kafirinas mediante silenciamiento génico es una estrategia clave para mejorar el valor nutritivo del grano del sorgo, el estudio se llevó a cabo durante 2009 y 2010.

**Palabras clave:** *Sorghum bicolor* L. Moench, calidad proteica, digestibilidad, kafirinas, prolaminas.

#### ABSTRACT

Sorghum is a basic food in several countries of Africa and Asia. However, its grain is deficient in lysine and its proteic quality diminishes when is cooked. Attempts to confer proteic quality to sorghum grain have not satisfied the nutritional requirements, and biotechnical alternatives have been focused to proteins' heterologous expression, without taking into account to increase proteic digestibility. Increment of lysine content in QPM corn and gene silencing of  $\alpha$ -zeins in corn, suggest that modification of expression of kafirins, a prolamin family of sorghum homologous to corn zeins, allows to increase lysin content and the proteic digestibility of sorghum grain. In this revision basic issues of kafirins classification are discussed, their homology with corn zeins, and their contribution in quality and proteic digestibility of sorghum grain. The objective of this work is to support the hypothesis that modification of kafirins expression by means of gene silencing is key strategy to improve nutritious value in sorghum grain, study was carried out during 2009 and 2010.

**Key words:** *Sorghum bicolor* L. Moench, digestibility, kafirins, prolamins, proteic quality.

## INTRODUCCIÓN

El sorgo ocupa el quinto lugar mundial en la producción de cereales y es uno de los alimentos básicos más importantes, para millones de personas pobres en muchas regiones semiáridas y tropicales del mundo, particularmente en el Sub-Sahara africano (Dicko *et al.*, 2006). La producción de sorgo rinde más que el maíz bajo condiciones de estrés hídrico (Farre y Faci, 2006), este cultivo tiene potencial para producir alimento en las condiciones actuales y futuras donde la escasez de agua es un factor limitante para la agricultura.

A pesar de que la composición química del grano de sorgo es similar a la del maíz, su calidad proteica es baja debido a la deficiencia de lisina (Maclean *et al.*, 1981) y a la disminución de la digestibilidad cuando es cocinado (Duodu *et al.*, 2003). Aunque por décadas se ha intentado incrementar la calidad proteica del grano de sorgo, sólo se han reportado tres líneas con “alto contenido de lisina”: IS11167 e IS11758 originarias de Etiopía (Singh y Axtell, 1973) y P721 Q una mutante de fenotipo opaco inducida por mutagénesis química (Mohan, 1975).

En comparación con 2% de lisina y 8-12% de proteína de una variedad de sorgo normal (Vasal, 2002), las líneas IS11167, IS11758 y P721 Q tenían 3.34, 3.13 y 2.9% de lisina con 15.7, 17.2 y 15.7% de proteína, respectivamente (Singh y Axtell, 1973; Mohan, 1975); sin embargo, estos valores están por debajo de 5.5 g de lisina por cada 100 g de proteína recomendados por la World Health Organization (Maclean *et al.*, 1981). Además, el consumo de IS11758 y P721 Q por niños(as) de 30 a 60 meses de edad, se asoció con pérdida de peso y una baja concentración de aminoácidos esenciales, principalmente lisina y treonina, debido probablemente a la baja digestibilidad (Maclean *et al.*, 1981). Esto indica que para incrementar la calidad proteica del grano de sorgo, no basta con incrementar su contenido de lisina, sino también mejorar su digestibilidad.

Más recientemente, Weaver *et al.* (1998) reportaron el cultivar de sorgo P851171 con alta digestibilidad *in vitro* de la proteína cocida (80%) y sin cocer (85%). Esta línea derivada de P721 Q se caracterizó por la estructura atípica de los cuerpos proteicos en el endospermo. A pesar de que tuvo una mayor digestibilidad real de aminoácidos comparado con el maíz y los sorgos normales, sus valores de  $TME_n$  fueron los más bajos, y no produjo ganancia de peso en pollos con una dieta deficiente de proteínas, debido probablemente

## INTRODUCTION

Sorghum ranks fifth place in world production of cereals and is one of the most important basic foods, for millions of poor people in many semi-arid and tropical regions, particularly in Sub-Saharan Africa (Dicko *et al.*, 2006). Sorghum production yields more than corn under hydric stress conditions (Farre and Faci, 2006), this cultivation has the potential to produce food under the current and future conditions where shortage of water is a restrictive factor for agriculture.

Although chemical composition of sorghum grain is similar to that of corn, its proteic quality is low due to lysine deficiency (Maclean *et al.*, 1981) and to decrease in digestibility when it is cooked (Duodu *et al.*, 2003). Although per decades it has been tried to increase the proteic quality of sorghum grain, only three lines have been reported with “high lysine content”: IS11167 and IS11758 coming from Ethiopia (Singh and Axtell, 1973) and P721 Q a mutant of phenotype opaque induced by chemical mutagenesis (Mohan, 1975).

In comparison with 2% lysine and 8-12% of protein in a variety of normal sorghum (Vasal, 2002), lines IS11167, IS11758 and P721 Q had 3.34, 3.13 and 2.9% lysine with 15.7, 17.2 and 15.7% protein, respectively (Singh and Axtell, 1973; Mohan, 1975); however, these values are below 5.5 g of lysine per each 100 g of protein recommended by World Health Organization (Maclean *et al.*, 1981). Also, consumption of IS11758 and P721 Q by kids from 30 to 60 months of age, is associated with loss of weight and a low concentration of essential amino acids, mainly lysine and threonine, due probably to low digestibility (Maclean *et al.*, 1981). This indicates that to increase proteic quality of sorghum grain, it is not enough with increasing their lysine content, but also to improve their digestibility.

More recently, Weaver *et al.* (1998) reported sorghum cultivar P851171 with high digestibility *in vitro* of protein cooked (80%) and without cooking (85%). This line derived from P721 Q was characterized by the atypical structure of proteic bodies in endosperm. Although it had a greater real digestibility of amino acids compared with corn and normal sorghums, their values of  $TME_n$  were the lowest, and it did not produce increase of weight in chickens with a diet deficient in proteins, due probably to

a que P851171 tenía un endospermo parcialmente vítreo y 8% menos almidón que la línea P721N de la cual proviene P721Q (Elkin *et al.*, 2002).

Otra estrategia para incrementar el contenido de lisina del grano de sorgo, fue expresar una mutante de la hordotionina de cebada (HT12), que contenía siete residuos de lisina adicionales a los cinco residuos que contiene normalmente (Zhao *et al.*, 2003). Aunque las plantas transformadas tuvieron 50% más lisina que su contraparte silvestre, no se evaluó la digestibilidad proteica del grano, y es posible que el uso de la hordotionina modificada este restringido debido a la citotoxicidad de la hordotionina (Florack y Stiekema, 1994).

Una de las hipótesis más aceptadas en relación a la baja calidad proteica del grano de sorgo, es que el bajo contenido de lisina y la disminución de la digestibilidad proteica, se deben a la composición y alto contenido de kafirinas. El término kafirinas fue acuñado por Johns y Brewster (1916), para definir a las proteínas del gluten del grano de sorgo solubles en etanol al 70%, conocidas de manera genérica como prolaminas debido a su alto contenido de prolina y amida de nitrógeno.

### **Clasificación de las kafirinas y homología con las zeínas**

Al igual que otras prolaminas, las kafirinas se encuentran en cuerpos proteicos del endospermo. Su función es proveer al embrión de una fuente de nitrógeno durante las primeras etapas del desarrollo (Shewry y Halford, 2002). Las kafirinas pueden dividirse en una fracción soluble en condiciones no reductoras, conocida como kafirina 1 o kafirina real, y otra que requiere de un agente reductor para su extracción, denominada glutelina soluble en alcohol, kafirina 2 o kafirina entrecruzada (El Nour *et al.*, 1998).

Las zeínas de maíz son las prolaminas mejor caracterizadas. Su clasificación fue propuesta por Esen, (1987), quien las agrupo en  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -zeínas con base en su solubilidad, composición de aminoácidos, y propiedades electroforéticas, cromatográficas e inmunológicas.

Cada grupo de prolaminas esta constituido por polipéptidos de distintas masas moleculares, lo que permite agruparlas en función a su movilidad aparente en geles desnaturizantes de poliácridamida (SDS-PAGE). Es común encontrar en la literatura algunas discrepancias respecto al número y masa molecular de los polipéptidos que conforman cada grupo. Aunque se han reportado  $\beta$ -zeínas con una movilidad aparente de  $M_r$  17 000 y 18 000 (Esen, 1987), y  $\beta$ -kafirinas de

that P851171 had a partially vitreous endosperm and 8% less starch than line P721N from which P721Q is coming from (Elkin *et al.*, 2002).

Another strategy to increase lysine content of sorghum grain, was to express a mutant of barley hordothionine (HT12) that contained seven residuals of lysine additional to the five residuals that it usually contains (Zhao *et al.*, 2003). Although transformed plants had 50% more lysin than its wild relative, the proteic digestibility of grain was not evaluated, and it is possible that the use of modified hordothionine is restricted due to hordothionine cytotoxicity (Florack and Stiekema, 1994).

One of the most accepted hypotheses in relation to low proteic quality of sorghum grain, is that low content of lysine and the decrease of proteic digestibility are due to the kafirins composition and high content. The term kafirins was adopted by Johns and Brewster (1916), to define gluten proteins from sorghum grain soluble in ethanol at 70%, known in a generic way as prolamins due to their high proline and nitrogen amide content.

### **Kafirins classification and homology with zeins**

Same as other prolamins, kafirins are found in proteic bodies of endosperm. Their function is to provide to the embryo a nitrogen source during first stages of development (Shewry and Halford, 2002). Kafirins can be divided in a soluble fraction under non reducing conditions, known as kafirin 1 or real kafirin, and another that requires of reducing agent for its extraction, denominated soluble glutelin in alcohol, kafirin 2 or cross-linked kafirin (El Nour *et al.*, 1998).

Corn zeins are the better characterized prolamins. Their classification was proposed by Esen, (1987) who group them in  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -zeins based in their solubility, amino acids composition, and electrophoretic, chromatographic and immunologic properties.

Each prolamins group is constituted by polypeptides of different molecular masses, which allows grouping them in function to their apparent mobility in denaturing polyacrylamide gels (SDS-PAGE). It is common to find in literature some discrepancies regarding the number and molecular mass of polypeptides that conform each group. Although there have been reported  $\beta$ -zeins with

$M_r$  16 000, 18 000 y 20 000 (Shull *et al.*, 1991), hasta ahora solo se ha identificado un gen en sorgo (Chamba *et al.*, 2005), y otro en maíz (Coleman y Larkins, 1999), que codifican para la  $\beta$ -kafirina y  $\beta$ -zeína respectivamente, lo cual parece incongruente con el número de  $\beta$ -zeínas reportadas.

De los tres polipéptidos identificados como  $\beta$ -kafirina por Shull *et al.* (1991), solo el de  $M_r$  20 000 reaccionó con el antisuero de  $\beta$ -zeína. Por lo que omitiendo a las  $\beta$ -kafirinas de  $M_r$  16 000 y 18 000, las kafirinas pueden clasificarse por su movilidad aparente en  $\alpha$ -kafirinas de  $M_r$  23 000 y 25 000,  $\beta$ -kafirinas de  $M_r$  20 000 y  $\gamma$ -kafirinas  $M_r$  28 000 (Shull *et al.*, 1991). Aunque se han aislado dos transcritos en sorgo cuya secuencia de aminoácidos deducidos tiene alta homología con las  $\delta$ -zeínas de  $M_r$  10 000, aún no se han identificado  $\delta$ -kafirinas a nivel proteico (Belton *et al.*, 2006).

En cuanto a la movilidad aparente de las zeínas, Esen, (1987) sugirió la inclusión de tres  $\alpha$ - ( $M_r$  10 000, 21 000 y 25 000, dos  $\beta$ - ( $M_r$  17 000 y 18 000), una  $\gamma$ - ( $M_r$  27 000) y ninguna  $\delta$ -zeína. Sin embargo, los estudios sobre la expresión genética en el endospermo y las propiedades inmunológicas de las zeínas realizados por Woo *et al.* (2001), contribuyeron a generar una clasificación más precisa. De acuerdo con esos resultados las prolaminas de maíz se agrupan en  $\alpha$ -zeínas de  $M_r$  19 000 y 22 000,  $\beta$ -zeínas de  $M_r$  15 000,  $\gamma$ -zeínas de  $M_r$  16 000, 27 000 y 50 000, y  $\delta$ -zeínas de  $M_r$  10 000 y 18 000.

La homología entre prolaminas, y particularmente entre zeínas y kafirinas, se ha demostrado mediante el uso de anticuerpos (Mazhar *et al.*, 1993) y con la comparación de secuencias de ADN y de aminoácidos, lo que ha permitido agruparlas en familias, para determinar su homología e identificar genes ortólogos en estas dos especies (Cuadro 1) (Rezende y Figueira, 2008).

an apparent mobility of  $M_r$  17 000 and 18 000 (Esen, 1987), and  $\beta$ -kafirins of  $M_r$  16 000, 18 000 and 20 000 (Shull *et al.*, 1991), up to now only one gene in sorghum has been identified (Chamba *et al.*, 2005), and another in corn (Coleman and Larkins, 1999), that code for the  $\beta$ -kafirins and  $\beta$ -zein respectively, which seems not to be in concordance with the number of reported  $\beta$ -zeins.

From the three polypeptides identified as  $\beta$ -kafirins by Shull *et al.* (1991), only that of  $M_r$  20 000 reacted with antiserum of  $\beta$ -zein. For which if not considering to  $\beta$ -kafirins of  $M_r$  16 000 and 18 000, the kafirins can be classified by their apparent mobility in  $\alpha$ -kafirins of  $M_r$  23 000 and 25 000,  $\beta$ -kafirins of  $M_r$  20 000 and  $\gamma$ -kafirins of  $M_r$  28 000 (Shull *et al.*, 1991). Although have been isolated two transcripts in sorghum whose sequence of deduced amino acids has high homology with  $\delta$ -zeins of  $M_r$  10 000, there still had not been identified  $\delta$ -kafirins at proteic level (Belton *et al.*, 2006).

As for apparent mobility of zeins, Esen (1987) suggested the inclusion of three  $\alpha$ - ( $M_r$  10 000, 21 000 and 25 000), two  $\beta$ - ( $M_r$  17 000 and 18 000), one  $\gamma$ - ( $M_r$  27 000) and none  $\delta$ -zein. However, studies on the genetic expression in endosperm and the immunologic properties of zeins carried out by Woo *et al.* (2001), contributed to generate a more precise classification. In accordance with those results prolamins of corn are grouped in  $\alpha$ -zeins of  $M_r$  19 000 and 22 000,  $\beta$ -zeins of  $M_r$  15 000,  $\gamma$ -zeins of  $M_r$  16 000, 27 000 and 50 000, and  $\delta$ -zeins of  $M_r$  10 000 and 18 000.

The homology between prolamins, and particularly between zeins and kafirins, has been demonstrated by the use of antibodies (Mazhar *et al.*, 1993) and with the

### Cuadro 1. Las prolaminas del maíz y sus correspondientes ortólogos en sorgo.

Table 1. Corn prolamins and their corresponding orthologous in sorghum.

Proteína de referencia	Núm. de accesión al GenBank		Proteína de referencia	Núm. de accesión al GenBank	
	Maíz	Sorgo		Maíz	Sorgo
$M_r$ 22 000 $\alpha$ -zein1	AAL16989	CAA76782	$M_r$ 15 000 $\beta$ -zein	AAL16980	CAG30668
$M_r$ 22 000 $\alpha$ -zein3	AAL16990	CAA34230	$M_r$ 50 000 $\gamma$ -zein	AAL16979	ND
$M_r$ 22 000 $\alpha$ -zein5	AAL16992	CAA34228	$M_r$ 27 000 $\gamma$ -zein	AAL16977	AAA73078
$M_r$ 19 000 $\alpha$ -zein D1	AAL16983	ND	$M_r$ 16 000 $\gamma$ -zein	AAL16978	ND
$M_r$ 19 000 $\alpha$ -zein D2	AAL16984	ND	$M_r$ 18 000 $\delta$ -zein	AAL16981	ND
$M_r$ 19 000 $\alpha$ -zein B1	AAL16985	ABP64793	$M_r$ 10 000 $\delta$ -zein	AAL16982	AAW32936
$M_r$ 19 000 $\alpha$ -zein B3	AAL16987	ABP64794	ND	ND	ND

ND: no determinado; datos tomados de Rezende y Figueira (2008).

### **Contribución de las kafirinas a la calidad proteica del grano de sorgo**

La calidad de una proteína depende principalmente de la composición de aminoácidos esenciales y su digestibilidad. El grano de sorgo contienen 8-12% de proteínas totales (Vannalli *et al.*, 2008), de las cuales entre 73% en el grano entero y 82% en el endospermo son kafirinas (Hamaker *et al.*, 1995). Adicionalmente las kafirinas tienen un bajo contenido de lisina (0.2 mole %) (Taylor *et al.*, 2007), y su contenido se correlaciona negativamente con la energía metabolizable aparente (AME) y la energía metabolizable real ( $TME_n$ ), lo que sugiere que el valor energético del grano de sorgo depende también de la concentración de kafirinas (Salinas *et al.*, 2006).

Aunque se desconoce el mecanismo de la proporción de cada kafirina, que puede afectar el perfil de aminoácidos en el grano de sorgo, la comparación de variedades de sorgo normales con las de alto contenido de lisina, ha mostrado una correlación negativa entre el contenido de kafirinas y lisina. El incremento de lisina en IS11758 y P721 Q, se relacionó con la reducción en más de 50% en el contenido de kafirinas totales, y con el incremento de albúminas y globulinas (Guiragossian *et al.*, 1978; Paullis y Wall, 1979), sugiriendo que la disminución en el contenido de kafirinas es compensado con la síntesis de proteínas con un mejor balance de aminoácidos. Estas observaciones han sido corroboradas por el silenciamiento génico de la expresión de las  $\alpha$ -zeínas de 19 y  $M_r$  22 000 en maíz, cuyo incremento en el contenido de lisina y triptófano en más de 98 y 76%, respectivamente y se correlacionó positivamente con el reemplazo de las zeínas por proteínas, con un mejor balance de aminoácidos y mayor contenido de lisina (Huang *et al.*, 2006).

### **Contribución de las kafirinas a la digestibilidad**

Uno de los aspectos más estudiados de las kafirinas es su participación en la disminución de la digestibilidad, y aunque ésta es afectada por varios factores exógenos y endógenos (Duodu *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2009), múltiples evidencias indican que el entrecruzamiento de kafirinas y la formación de enlaces disulfuro son una de las principales causas de la disminución de la digestibilidad de las proteínas del grano de sorgo.

En las primeras etapas del desarrollo, el grano de sorgo tiene una cantidad insignificante de  $\beta$ - y  $\gamma$ -kafirinas entrecruzadas; sin embargo, su contenido aumenta conforme el grano

comparison of DNA and amino acids sequences, which allowed to group them in families, to determine their homology and to identify orthologous genes in these two species (Table 1) (Rezende and Figueira, 2008).

### **Contribution of kafirins to proteic quality of sorghum grain**

The quality of a protein mainly depends on the composition of essential amino acids and its digestibility. Sorghum grain contains 8-12% of total proteins (Vannalli *et al.*, 2008), from which between 73% in whole grain and 82% in endosperm are kafirins (Hamaker *et al.*, 1995). Additionally kafirins have a low content of lysine (0.2 % mole) (Taylor *et al.*, 2007), and its content is negatively correlated with the apparent metabolizable energy (AME) and the true metabolizable energy ( $TME_n$ ), which suggests that energy value of sorghum grain also depends on the kafirins concentration (Salinas *et al.*, 2006).

Although is unknown the mechanism of proportion of each kafirin that can affect amino acids profile in sorghum grain, the comparison of normal sorghum varieties with those of high lysine content, has shown a negative correlation between kafirins content and lysine. The lysine increment in IS11758 and P721 Q, was related with the reduction in more than 50% in content of total kafirins, and with the increment of albumins and globulins (Guiragossian *et al.*, 1978; Paullis and Wall, 1979), suggesting that the decrease in the kafirins content is compensated with the synthesis of proteins with a better balance of amino acids. These observations have been corroborated by gene silencing of expression of  $\alpha$ -zeins of  $M_r$  19 and 22 000 in corn whose increment in lysine and tryptophan content in more than 98 and 76%, respectively and it was positively correlated with substitution of the zeins by proteins, with a better balance of amino acids and greater lysine content (Huang *et al.*, 2006).

### **Contribution of kafirins to the digestibility**

One of the studied aspects in kafirins is their participation in the decrease of digestibility, and although this is affected by several exogenous and endogenous factors (Duodu *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2009), multiple evidences indicate that cross-linking kafirins and formation of disulfur bonds are one of the main causes of proteins digestibility decrease of sorghum grain.

madura. Entre los 14 y 48 días después de la antesis (DDA) la fracción de kafirina 1, incrementa más de 100%, alcanzando un valor máximo 28 DDA. Durante este mismo periodo a partir de 28 DDA la fracción de kafirina-2, incrementa en más de 300%, lo que sugiere que la formación de polímeros se hace a expensas de las kafirinas de la fracción 1 (Mazhar y Chandrashekar, 1993).

El incremento en el entrecruzamiento de prolaminas, particularmente el de  $\gamma$ -kafirina, se correlaciona de manera negativa con la disminución de la digestibilidad de las proteínas del sorgo. La harina cruda de granos de sorgo inmaduros (30 días después de la floración media, DDFM) tiene 40% de  $\gamma$ -kafirinas entrecruzadas y una digestibilidad 90%, pero cuando los granos alcanzan la madurez fisiológica, el entrecruzamiento de  $\gamma$ -kafirina aumenta 90% y la digestibilidad disminuye a 73%, debido probablemente también a la deshidratación del grano (Oria *et al.*, 1995a).

De hecho, el ARNm de la  $\gamma$ -kafirina inicia su expresión siete días después de la polinización (DDP) y se incrementa progresivamente hasta los 21 DDP, cuando alcanza un máximo nivel (Bansal *et al.*, 2008). Por lo que existe una relación entre la acumulación de  $\gamma$ -kafirina, la cual desempeña una función importante en la formación de polímeros (El Nour *et al.*, 1998), y la reducción de la digestibilidad. Adicionalmente, las  $\gamma$ -kafirinas se unen con mayor afinidad que las otras clases de kafirinas a los taninos condensables del grano de sorgo, disminuyendo la digestibilidad de las kafirinas totales y de las  $\gamma$ -kafirinas 59% a 8.4% y 30% a 17.2%, respectivamente (Emmambux y Taylor, 2003; Taylor *et al.*, 2007).

Independientemente del estado de madurez del grano, el proceso de cocción disminuye la digestibilidad de las proteínas de la harina del sorgo 90 a 85% cuando la harina proviene de granos de sorgo inmaduro (20 DDFM), y 73 a 55% si es de grano que alcanzó su madurez fisiológica (Oria *et al.*, 1995a). Esta disminución se ha registrado en maíz y sorgo al evaluar los concentrados de las proteínas del endospermo (Ezeogu *et al.*, 2005), los cuerpos proteicos (Duodu *et al.*, 2001), y la fracción de kafirinas y zeínas aisladas antes (Emmambux y Taylor, 2009) y después de cocer la harina (Nunes *et al.*, 2005), lo cual indica que las kafirinas son los principales responsables de la disminución de la digestibilidad proteica. De hecho, la cocción húmeda y la cocción húmeda a presión reducen en mayor proporción la digestibilidad de las proteínas de la harina de sorgo y de las kafirinas en comparación con las zeínas y la harina de

In the first stages of development, sorghum grain has an insignificant quantity of cross-linked  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins; however, their content increases as the grain matures. Between the 14 and 48 days after anthesis (DDA) the fraction of kafirin 1 increases more than 100%, reaching a maximum value 28 DDA. During this same period starting from 28 DDA the fraction kafirin 2, increases in more than 300%, which suggests that formation of polymers is made at expense of kafirins of fraction 1 (Mazhar and Chandrashekar, 1993).

The increment in prolamins cross-linking, particularly of  $\gamma$ -kafirina, is correlated in a negative way with the decrease of proteins digestibility of sorghum. Raw flour of immature sorghum grains (30 days after medium flowering, DDFM) it has 40% of cross-linked  $\gamma$ -kafirins and a digestibility 90%, but when the grains reach the physiologic maturity, cross-linking of  $\gamma$ -kafirina increases 90% and the digestibility diminishes to 73%, due probably also to grain dehydration (Oria *et al.*, 1995a).

In fact, ARNm of  $\gamma$ -kafirina begins its expression seven days after pollination (DDP) and it is increased progressively until the 21 DDP, when it reaches a maximum level (Bansal *et al.*, 2008). Therefore a relationship exists between digestibility reduction and accumulation of  $\gamma$ -kafirina, which carries out an important function in polymers formation (El Nour *et al.*, 1998). Additionally,  $\gamma$ -kafirins bond with more affinity than other kafirins classes to condensable tannins of sorghum grain, diminishing digestibility of the total kafirins and of  $\gamma$ -kafirins from 59 to 8.4% and from 30% to 17.2%, respectively (Emmambux and Taylor, 2003; Taylor *et al.*, 2007).

Independently of maturity state of grain, cooking process diminishes proteins digestibility of sorghum flour 90 to 85% when the flour comes from of immature sorghum grains (20 DDFM), and 73 to 55% if it is from grain that reached its physiologic maturity (Oria *et al.*, 1995a). This decrease has been recorded in corn and sorghum when evaluating the concentrates of endosperm proteins (Ezeogu *et al.*, 2005), the proteic bodies (Duodu *et al.*, 2001), fraction of kafirins and zeins isolated before (Emmambux and Taylor, 2009) and after cooking the flour (Nunes *et al.*, 2005), which indicates that kafirins are the main responsible for decrease of proteic digestibility. In fact, the humid cooking and humid cooking at pressure

maíz (Emmambux y Taylor, 2009), debido probablemente a la formación de oligómeros de kafirina unidos por enlaces disulfuro.

### Formación de puentes disulfuro y entrecruzamiento de kafirinas

La mayor parte de las prolaminas del grano de sorgo están en forma entrecruzada. El 70% de las kafirinas extraídas por 2-metil-2-propanol en condiciones no reductoras son oligómeros de  $\gamma$ - $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 kafirinas unidas por enlaces disulfuro, mientras que 90% de la fracción residual de kafirinas contiene, además de polímeros de  $\gamma$ - $\alpha$ 1 y  $\beta$ -kafirinas, monómeros y dímeros  $\gamma$ -y  $\alpha$ 1-kafirinas (El Nour *et al.*, 1998). La  $\beta$ - y  $\gamma$ -kafirina tienen un alto contenido de cisteína, que favorece la formación de enlaces disulfuro, la formación de estructuras secundarias y de polímeros resistentes a la digestión enzimática (Oria *et al.*, 1995b; El Nour *et al.*, 1998).

La adición de agentes reductores como ditiotreitól, 2-mercaptoetanol o bisulfito de sodio, reducen la formación de puentes disulfuro impidiendo la formación de estructuras secundarias, incrementando significativamente la digestibilidad de proteínas (Hamaker *et al.*, 1987). Estas evidencias fueron reforzadas mediante la expresión heteróloga de mutantes de la  $\gamma$ -zeína de  $M_r$  27 000, en las que se observó que la sustitución de la cisteína 155 por alanina (C155A), incrementó su digestibilidad *in vitro* con pepsina, quimotripsina y tripsina en comparación con su contraparte nativa, lo cual pudo deberse al enlace disulfuro entre las cisteínas C128 y C155 es crítico para mantener la estabilidad y un adecuado plegamiento de la  $\gamma$ -zeína (Lee y Hamaker, 2006). Estas evidencias confirman que los enlaces disulfuro contribuyen significativamente en la reducción de la digestibilidad, y que algunos tienen mayor participación en el mantenimiento de la estructura secundaria de las kafirinas.

### Cambios en la estructura secundaria

Entre 50-60% de las prolaminas de los cuerpos proteicos del sorgo y del maíz tienen una conformación de hélice- $\alpha$ , pero cuando son calentadas por calor húmedo (Duodu *et al.*, 2001; Ezeogu *et al.*, 2008; Emmambux y Taylor, 2009) o microondas (Byaruhanga *et al.*, 2006), cambian su estructura secundaria a una conformación de hoja- $\beta$ . Lo mismo ocurre cuando las kafirinas son extraídas a 70 °C o secadas a 40 °C (Byaruhanga *et al.*, 2006).

reduce in more proportion proteins digestibility of sorghum flour and of kafirins in comparison with the zeins and the corn flour (Emmambux and Taylor, 2009), due probably to formation of kafirin oligomers linked by disulfur bonds.

### Formation of disulfur links and kafirins cross-linking

Most of prolamins from grain sorghum are in cross-linked shape. The 70% of the kafirins extracted by 2-methyl-2-propanol under non reducing conditions are oligomers of  $\gamma$ - $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 kafirins united by disulfur bonds, while 90% of residual fraction of kafirins contains, besides polymers of  $\gamma$ - $\alpha$ 1 and  $\beta$ -kafirins, monomers and dimers  $\gamma$ - and  $\alpha$ 1-kafirins (El Nour *et al.*, 1998). The  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins has a high cysteine content that favors formation of disulfur bonds, formation of secondary structures and of polymers resistant to enzymatic digestion (Oria *et al.*, 1995b; El Nour *et al.*, 1998).

The addition of reducing agents as dithiothreitol, 2-mercaptoethanol or sodium bisulfite reduce the formation of disulfur links impeding formation of secondary structures, significantly increasing proteins digestibility (Hamaker *et al.*, 1987). These evidences were reinforced by means of heterologous expression of mutants of  $\gamma$ -zein of  $M_r$  27 000, in which was observed that substitution of cysteine 155 by alanine (C155A) increased their digestibility *in vitro* with pepsin, chymotrypsin and trypsin in comparison with their native relative, which could be due to disulfur link between cysteines C128 and C155 is critical to maintain stability and an appropriate folding of  $\gamma$ -zein (Lee and Hamaker, 2006). These evidences confirm that disulfuro links significantly contribute in the reduction of digestibility, and that some have greater participation in maintenance of the secondary structure of kafirins.

### Changes in secondary structure

Between 50-60% of prolamins of proteic bodies of sorghum and of corn have an  $\alpha$ -helix- conformation, but when they are warm by humid heat (Duodu *et al.*, 2001; Ezeogu *et al.*, 2008; Emmambux and Taylor, 2009) or microwaves (Byaruhanga *et al.*, 2006), they change their secondary structure to a  $\beta$ -leaf conformation. The same thing happens when kafirins are extracted at 70 °C or dried off at 40 °C (Byaruhanga *et al.*, 2006).

Debido que el proceso de cocción induce la formación de hojas- $\beta$  en la harina de sorgo y en las kafirinas pero no en la harina de maíz y las zeínas, se ha sugerido que este cambio conformacional puede ser la causa de la reducción en la hidrólisis de las kafirinas, ya que los residuos de kafirinas indigeribles mediante pepsina tienen mayoritariamente una conformación de hojas- $\beta$  (Gao *et al.*, 2005; Emmambux y Taylor, 2009), por lo que se ha sugerido que la predominancia de esta estructura podría ocasionar el plegamiento de las proteínas limitando la accesibilidad de las proteasas.

Una hipótesis al respecto es que la energía aplicada durante el proceso de cocción húmeda rompe los enlaces de hidrógeno, desestabilizando la estructura de las hélices- $\alpha$  y dejando a los polipéptidos descubiertos y alineados uno junto al otro, favoreciendo la formación de una conformación intermolecular de hoja- $\beta$ , que da como resultado el entrecruzamiento de enlaces disulfuro y la formación de polímeros de kafirina que forman una estructura rígida con menor susceptibilidad a la proteólisis (Duodu *et al.*, 2001; Emmambux y Taylor, 2009).

Sin embargo, las diferencias en el cambio conformacional de hélice- $\alpha$  a hoja- $\beta$  entre zeínas y kafirinas, explican solo de manera parcial el motivo por el que las kafirinas son menos digeribles, ya que cuando los sorgos mutantes P850029 y P851171, con alta digestibilidad proteica, son cocinados con calor húmedo tienen cambios en la estructura secundaria similares al de los sorgos convencionales (Duodu *et al.*, 2001). Además, la cocción de harina de maíz y sorgo en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, incrementa la proporción de hojas- $\beta$  en relación a las hélices- $\alpha$  (Ezeogu *et al.*, 2008); lo cual parece contraponerse con la teoría de que la formación de estructuras secundarias de hojas- $\beta$  disminuye la digestibilidad de las kafirinas, ya que la adición de agentes reductores a las prolaminas del sorgo y el maíz incrementa su digestibilidad mediante la ruptura de los enlaces disulfuro. Ezeogu *et al.* (2005) sugiere que hay otros factores como la estructura de los cuerpos proteicos y la distribución de las  $\gamma$ -kafirinas que podrían desempeñar una función importante en la disminución de la digestibilidad.

### Localización de las kafirinas y digestibilidad proteica

La distribución de las kafirinas en los cuerpos proteicos y sus diferentes susceptibilidades a la hidrólisis, son dos evidencias más convincentes de la contribución de las kafirinas en la disminución de la digestibilidad. La  $\alpha$ -kafirina purificada

Due that cooking process induces the formation of  $\beta$ -leaves in sorghum flour and in kafirins, but not in corn flour and zeins, it has been suggested that this conformational change can be the cause of the reduction in kafirins hydrolysis, since residuals of indigestible kafirins by means of pepsin have for the most part a conformation of  $\beta$ -leaves (Gao *et al.*, 2005; Emmambux and Taylor, 2009), for what has been suggested that predominance of this structure could cause proteins folding, limiting accessibility of proteases.

A hypothesis in this respect is that energy applied during the process of humid cooking breaks the hydrogen bonds, destabilizing the structure of  $\alpha$ -helices and leaving to polypeptides discovered and aligned one next to other, favoring formation of a intermolecular  $\beta$ -leaf conformation that gives the cross-linking of disulfuro links and formation of kafirina polymers that form a rigid structure with smaller susceptibility to the proteolysis as a result (Duodu *et al.*, 2001; Emmambux and Taylor, 2009).

However, the differences in the conformacional change from  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -leaf between zeins and kafirins, they explain only partially the reason for which kafirins are less digestible, since when the mutants sorghums P850029 and P851171, with high proteic digestibility, are cooked with humid heat they have changes in the secondary structure similar to that of conventional sorghums (Duodu *et al.*, 2001). Also, the cooking of corn and sorghum flour in presence of  $\beta$ -mercaptoethanol, increases the proportion of  $\beta$ -leaves in relation to  $\beta$ -helices (Ezeogu *et al.*, 2008); which seems to be opposed with the theory that formation of secondary structures of  $\beta$ -leaves diminishes kafirins digestibility, since the addition of reducing agents to the sorghum prolamins and corn increases its digestibility by means of rupture of disulfir bonds. Ezeogu *et al.* (2005) suggest that there are other factors as the structure of proteic bodies and the distribution of  $\gamma$ -kafirins that could make an important function in digestibility decrease.

### Localization of kafirins and proteic digestibility

The distribution of kafirins in proteic bodies and their different susceptibilities to hydrolysis, are two more convincing evidences of kafirins contribution in the decrease of digestibility. Purified  $\alpha$ -kafirina under non reducing conditions is easily digestible, either cooked or



en condiciones no reductoras es fácilmente digerible, ya sea cocinada o sin cocinar, por lo que la dificultad para digerir la  $\alpha$ -kafirina presente en la harina de sorgo, podría deberse a su localización dentro de los cuerpos proteicos (Oria *et al.*, 1995b).

Los cuerpos proteicos tienen forma esferoide y están compuestos en casi 80% por  $\alpha$ -kafirina, esta se localiza en el interior, mientras que las  $\beta$ - y  $\gamma$ -kafirinas se encuentran principalmente en la periferia formando una “cubierta” (Shull *et al.*, 1992). Debido que el proceso de digestión inicia en la superficie de los cuerpos proteicos, la  $\beta$ - y  $\gamma$ -kafirina actúan como una barrera protegiendo a la  $\alpha$ -kafirina de la hidrólisis enzimática.

Se cree que el proceso de cocción disminuye aún más la digestión de la  $\alpha$ -kafirina, al inducir la formación de enlaces disulfuro y de polímeros constituidos por  $\beta$ -,  $\gamma$ -kafirinas y posiblemente otras proteínas localizadas en la periferia del cuerpo proteico, ya que la adición de agentes reductores acelera el proceso de digestión hasta que virtualmente todas las kafirinas son digeridas excepto 2% de  $\alpha$ -kafirina (Oria *et al.*, 1995b; El Nour *et al.*, 1998).

Estas evidencias se fortalecieron con el estudio de la mutante de sorgo P851171, la cual tiene una digestibilidad proteica *in vitro* 85 y 80% sin cocinar y cocinada, respectivamente. Los cuerpos proteicos de P851171 tienen una estructura atípica con una mayor área de contacto debido a su forma irregular y la presencia de numerosas invaginaciones, que difiere de la estructura esferoide de las variedades normales. Al igual que en una variedad normal, las  $\alpha$ - y  $\beta$ -kafirinas de P851171 se encuentran en el interior de los cuerpos proteicos, sin embargo, las  $\gamma$ -kafirinas están ubicadas en la base de las invaginaciones, lo que facilita el contacto de la  $\alpha$ -kafirina con las enzimas digestivas (Oria *et al.*, 2000).

### **Impacto de la modificación de la expresión de las zeínas en la calidad proteica del maíz**

El descubrimiento de la mutante de maíz “*opaque2*” es el ejemplo más claro y exitoso del incremento en la calidad proteica de los cereales mediante la reducción de la expresión de las prolaminas. El contenido de lisina del maíz *opaque2* es 69% mayor que el del maíz común (Mertz *et al.*, 1964). El gen *o2* codifica un factor de transcripción de tipo cierre de leucina básico que reconoce específicamente el promotor de los genes de las zeínas de  $M_r$  22 000 (Schmidt *et al.*, 1992), inhibiendo casi totalmente la transcripción de las  $\alpha$ -zeínas de  $M_r$  22 000 y reduciendo las  $\alpha$ -zeínas de  $M_r$  19 000 (Kodrzycki *et al.*,

without cooking, for which difficulty to digest  $\alpha$ -kafirina present in sorghum flour, it could be due to its localization inside proteic bodies (Oria *et al.*, 1995b).

Proteic bodies have spheroid shape and they are compound in almost 80% by  $\alpha$ -kafirina, this it is located in the interior, while  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins are mainly in periphery forming a “cover” (Shull *et al.*, 1992). Due that digestion process begins in surface of proteic bodies,  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins act as a barrier protecting to  $\alpha$ -kafirins from enzymatic hydrolysis.

It is believed that cooking process diminishes even more the digestion of  $\alpha$ -kafirina, when inducing the formation of disulfur bonds and of polymers constituted by  $\beta$ -,  $\gamma$ -kafirins and possibly other proteins located in periphery of proteic body, since addition of reducing agents accelerates the digestion process until virtually all kafirins are digested except 2% of  $\alpha$ -kafirina (Oria *et al.*, 1995b; El Nour *et al.*, 1998).

These evidences were strengthened with study of mutant sorghum P851171, which has a proteic digestibility *in vitro* 85 and 80% without cooking and cooked, respectively. Proteic bodies of P851171 have an atypical structure with a greater contact area due to their irregular shape and the presence of numerous invaginations, which differs from the spheroid structure of normal varieties. Same as in a normal variety,  $\alpha$ - and  $\beta$ -kafirins of P851171 are inside the proteic bodies, however,  $\gamma$ -kafirins are located in the base of invaginations, which facilitates contact of  $\alpha$ -kafirina with the digestive enzymes (Oria *et al.*, 2000).

### **Impact of modification of the expression of zeins in corn proteic quality**

The discovery of the mutant of corn “*opaque2*” is the clearest and successful example in the increase of proteic quality of the cereals by means of reduction of expression of the prolamins. Content of lysine of the corn *opaque2* is 69% greater than that of common corn (Mertz *et al.*, 1964). Gene *o2* codes a transcription factor of closing type of basic leucine that specifically recognizes to promoter of genes of zeins of  $M_r$  22 000 (Schmidt *et al.*, 1992), inhibiting almost totally the transcription of  $\alpha$ -zeins of  $M_r$  22 000 and reducing the  $\alpha$ -zeins of  $M_r$  19 000 (Kodrzycki *et al.*, 1989). In fact, the lysin increment in the corn *opaque2* is related with the decrease of  $\alpha$ -zeins

1989). De hecho, el incremento de lisina en el maíz *opaco2* está relacionado con la disminución del contenido de  $\alpha$ -zeínas, el incremento de albúminas y globulinas, y la presencia de lisina libre en el endospermo (Landry *et al.*, 2002).

Sin embargo, el maíz opaco no tuvo aceptación, pues tenía un endospermo suave de secado lento, con mayor susceptibilidad a enfermedades e insectos, y menor rendimiento debido a su baja densidad por unidad de volumen (Sofi *et al.*, 2009), lo cual se debió a que la transcripción de varias zeínas de  $M_r$  22 000 es independiente de *o2*, y a que este gen tiene efectos pleiotrópicos (Ciceri *et al.*, 2000). Posteriormente, a partir del maíz opaco2 se desarrollaron líneas QPM, mediante modificadores del gen *o2*, que a diferencia de su antecesor tuvieron granos vítreos con rendimientos comparables a los cultivares normales y un incremento de 55% de triptófano, 30% de lisina y 38% menos de leucina, con una calidad proteica de 90% en comparación a la leche (Gupta *et al.*, 2009). La restitución del endospermo vítreo del maíz QPM, se asoció con el incremento en dos o cuatro veces del contenido de la  $\gamma$ -zeína de  $M_r$  27 000 (Wallace *et al.*, 1990; Geetha *et al.*, 1991), lo cual compensó la reducción en el contenido de  $\alpha$ - y  $\beta$ -zeínas (Ufaz y Galili, 2008).

Posteriormente Lai y Messing (2002) incrementaron el contenido de metionina en la semilla de maíz, eliminando la regulación post-transcripcional del gen *dzs 10*, que codifica para la  $\delta$ -zeína de  $M_r$  10 000 que tiene un buen balance de metionina. Para ello reemplazaron los UTRs y el promotor del gen *dzs 10* por el UTR 5' y el promotor de la  $\gamma$ -zeína, que es altamente expresado e independiente del sistema de regulación post-transcripcional de *dzs10*. La metionina del maíz transgénico fue funcionalmente equivalente a la metionina usada para suplementar el alimento de pollos.

Otros estudios se enfocaron a silenciar la expresión de las prolaminas mediante ARN de interferencia (ARNi), y demostraron que el silenciamiento de la  $\alpha$ -zeína de  $M_r$  22 000 en maíz genera un fenotipo opaco dominante con una segregación mendeliana, que a diferencia de *o2* no requiere de un estado homocigoto del alelo (Segal *et al.*, 2003).

Con el silenciamiento simultáneo de la  $\alpha$ -zeína de  $M_r$  19 000 y 22 000 la disminución del contenido de leucina, y el incremento de lisina, treonina y triptófano fueron superiores a los que se obtuvieron con el silenciamiento individual de cada tipo de  $\alpha$ -zeína (Cuadro 2). Este aumento en la calidad proteica se debió al incremento en la relación entre las proteínas y las zeínas (Gibbon and Larkins, 2005). Adicionalmente, la

content, the increment of albumins and globulins, and the presence of free lysin in the endosperm (Landry *et al.*, 2002).

However, opaque corn did not have acceptance, because it had slow drying soft endosperm, with more susceptibility to illnesses and insects, and lower yield due to its low density per unit of volume (Sofi *et al.*, 2009), which was due to that the transcription of several zeins of  $M_r$  22 000 are independent of *o2*, and to that this gene has pleiotropy effects (Ciceri *et al.*, 2000). Later on, from corn *opaque2* there were developed QPM lines, by means of modifiers of gene *o2* that had vitreous grains with yields comparable to normal cultivars and an increment of 55% tryptophan, 30% lysin and 38% less than leucine contrary to its predecessor, with a proteic quality of 90% in comparison to the milk (Gupta *et al.*, 2009). The restitution of vitreous endosperm of QPM corn, associated with the increment in two or four times of content of  $\gamma$ -zein of  $M_r$  27 000 (Wallace *et al.*, 1990; Geetha *et al.*, 1991), which compensated the reduction in  $\alpha$ - and  $\beta$ -zeins content (Ufaz and Galili, 2008).

Then Lai and Messing (2002) increased the methionine content in corn seed, eliminating the post-transcriptional regulation of gene *dzs 10*, that it codes for  $\delta$ -zein of  $M_r$  10 000 that it has a good methionine balance. To do this they replaced UTRs and the promoter of gene *dzs 10* for UTR 5' and promoter of  $\gamma$ -zein that is highly expressed and independent of post-transcriptional regulation system for *dzs 10*. Methionine of transgenic corn was functionally equivalent to methionine used to complement food for chickens.

Other studies were focused in silencing the expression of prolamins by means of interference RNA (ARNi), and they demonstrated that silencing of  $\alpha$ -zein of  $M_r$  22 000 in corn generate a dominant opaque phenotype with a Mendelian segregation that, contrary to *o2*, does not require of an allele's homozygote state (Segal *et al.*, 2003).

With simultaneous silencing of  $\alpha$ -zein of  $M_r$  19 000 and 22 000 the decrease of leucine content, and lysin, threonine and tryptophan increment were superior to those that were obtained with the individual silencing of each type of  $\alpha$ -zein (Table 2). This increase in proteic quality was due to the increment in relationship between proteins and zeins (Gibbon and Larkins, 2005). Additionally, leucine reduction is desirable, due that improves balance in the relationship leucine/isoleucine, helping to liberate more tryptophan for the niacin biosynthesis.

reducción de leucina es deseable, debido que mejora el balance en la relación leucina/isoleucina, ayudando a liberar más triptófano para la biosíntesis de niacina.

These evidences demonstrate that by means of manipulation of the expression of zeins, is possible to modify the profile of essential amino acids significantly and to improve the

**Cuadro 2. Variación en el contenido de aminoácidos limitantes en maíz, mediante el silenciamiento génico de la  $\alpha$ -kafirina.**  
**Table 2. Variation in content of restrictive amino acids in corn, by means of gene silencing of  $\alpha$ -kafirin.**

$\alpha$ -zeína silenciada	§Variación en el contenido de aminoácidos (%)				
	Lisina	Treonina	Histidina	Triptófano	Leucina
$M_r$ 19 000 <sup>a</sup>	+ 43.8	+ 15.1	+ 9.4	+ 30.3	- 8
$M_r$ 22 000 <sup>b</sup>	+ 18.5	+ 2.32	+ 3.58	ND	-16.1
$M_r$ 19 000 y 22,000 <sup>c</sup>	+ 105	+ 34.9	+ 64.8	+ 81.7	- 35

§=porcentaje de variación en el contenido de aminoácidos calculado a partir de los valores máximos o mínimos, de las líneas transgénicas obtenidas mediante el silenciamiento génico de la  $\alpha$ -kafirina. <sup>a</sup>= Huang *et al.* (2004); <sup>b</sup>= Segal *et al.* (2003); <sup>c</sup>= Huang *et al.* (2006); ND= no determinado.

Estas evidencias demuestran que mediante la manipulación de la expresión de las zeínas, es posible modificar significativamente el perfil de aminoácidos esenciales y mejorar el valor nutritivo del grano de maíz, lo que sugiere que se pueden generar plantas transgénicas con una deficiencia específica en cada clase de zeína, no solo para estudiar su función proteica sino para mejorar características específicas.

nutritious value of corn grain, what suggests that transgenic plants can be generated with a specific deficiency in each zein class, not only to study their proteic function but to improve specific characteristics.

## CONCLUSIONES

La generación del fenotipo opaco en maíz con el silenciamiento génico de las  $\alpha$ -zeínas de  $M_r$  19 000 y 22 000, demuestra que las prolaminas son puntos de regulación clave para mejorar el balance de aminoácidos; por lo tanto, es factible estudiar no solo el impacto de las kafirinas en el valor nutritivo, sino la contribución de cada tipo de kafirina en la digestibilidad proteica, con el objetivo de usar la tecnología de ARNi en la generación de sorgo con mejores características nutricionales.

Implementar tecnologías como el silenciamiento génico en cultivos introducidos de interés agrícola, con pocos o ningún pariente silvestre, contribuirá a reducir la probable contaminación del germoplasma nativo y a generar plantas modificadas genéticamente con mayor valor nutritivo, teniendo la ventaja que se usan los genes propios del organismo modificado, lo cual mitigaría el rechazo hacia los cultivos transgénicos, cuya producción se vislumbra como una realidad en México, contribuyendo a reducir la dependencia tecnológica y regular los precios de estos productos en el mercado nacional.

## CONCLUSIONS

The generation of the opaque phenotype in corn with the gene silencing of  $\alpha$ -zeins of  $M_r$  19 000 and 22 000, demonstrates that prolamins are key regulation points to improve amino acids balance; therefore, it is feasible to study not only the impact of kafirins in the nutritious value, but the contribution of each kafirin type in proteic digestibility, with the aim of using the ARNi technology in sorghum generation with better nutritional characteristics.

To implement technologies such as gene silencing in introduced cultivations of agricultural interest, with few or any wild relative, will contribute to reduce the probable contamination of native germoplasm and to generate plants genetically modified with more nutritious value, having the advantage that characteristic genes of the modified organism are used, which would mitigate the rejection to transgenic cultivations whose production it seems to become a reality in Mexico, contributing to reduce the technological dependence and to regulate the prices of these products in the national market.

*End of the English version*



**LITERATURA CITADA**

- Bansal, S.; Mishra, A.; Tomar, A.; Sharma, S.; Khanna, V. K. and Garg, G. K. 2008. Isolation and temporal endospermal expression of  $\gamma$ -kafirin gene of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. moench) var. M35-1, for introgression analysis of transgenic. *J. Cereal Sci.* 48:808-815.
- Belton, P. S.; Delgadillo, I.; Halford, N. G. and Shewry, P. R. 2006. Kafirin structure and functionality. *J. Cereal Sci.* 44:272-286.
- Byaruhanga, Y. B.; Emmambux, M. N.; Belton, P. S.; Wellner, N.; Ng, K. G. and Taylor, J. R. N. 2006. Alteration of kafirin and kafirin film structure by heating with microwave energy and tannin complexation. *J. Agric. Food Chem.* 54:4198-4207.
- Chamba, E. B.; Halford, N. G.; Forsyth, J.; Wilkinson, M. and Shewry, P. R. 2005. Molecular cloning of  $\beta$ -kafirin, a methionine-rich protein of sorghum grain. *J. Cereal Sci.* 41:381-383.
- Ciceri, P.; Castelli, S.; Lauria, M.; Lazzari, B.; Genga, A.; Bernard, L.; Sturaro, M. and Viotti, A. 2000. Specific combinations of zein genes and genetic backgrounds influence the transcription of the heavy-chain zein genes in maize *opaque-2* endosperms. *Plant Physiol.* 124:451-460.
- Coleman, C. E. and Larkins, B. A. 1999. Prolamins of maize. In: Shery PR, Casey R. (eds.), *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publisher. The Netherlands. 109-139 pp.
- Dicko, M. H.; Gruppen, H.; Traoré, A. S.; Voragen, A. G. J. and Berkel, W. J. H. 2006. Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. *Afr. J. Biotechnol.* 5:384-395.
- Duodu, K. G.; Tang, H.; Grant, A.; Wellner, N.; Belton, P. S. and Taylor, J. R. N. 2001. FTIR and solid state <sup>13</sup>CNMR spectroscopy of proteins of wet cooked and popped sorghum and maize. *J. Cereal Sci.* 33:261-269.
- Duodu, K. G.; Taylor, J. R. N.; Belton, P. S. and Hamaker, B. R. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38:117-131.
- Elkin, R. G.; Arthur, E.; Hamaker, B. R.; Axtel, J. D.; Douglas, M. W. and Parson, C. M. 2002. Nutritional value of highly digestible sorghum cultivar for meat-type chickens. *J. Agric. Food Chem.* 50:4146-4150.
- El Nour, I. N. A.; Peruffo, A. D. B. and Curioni, A. 1998. Characterization of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behaviour. *J. Cereal Sci.* 28:197-207.
- Emmambux, M. N. and Taylor, J. R. N. 2003. Sorghum kafirina interactions with various phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 83:402-407.
- Emmambux, M. N. and Taylor, J. R. N. 2009. Properties of heat-treated sorghum and maize meal and their prolamin proteins. *J. Agric. Food Chem.* 57:1045-1050.
- Esen, A. 1987. Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.* 5:117-128.
- Ezeogu, L. I.; Duodu, K. G. and Taylor, J. R. N. 2005. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the *in vitro* starch digestibility of sorghum and maize flours. *J. Cereal Sci.* 42:33-44.
- Ezeogu, L. I.; Duodu, K. G.; Emmambux, M. N. and Taylor, J. R. N. 2008. Influence of cooking conditions on the protein matrix of sorghum and maize endosperm flours. *Cereal Chem.* 85:397-402.
- Farré, I. and Faci, J. M. 2006. Comparative response of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) to deficit irrigation in a Mediterranean environment. *Agricult. Water Manag.* 83:135-143.
- Florack, D. E. A. and Stiekema, W. J. 1994. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant. Mol. Biol.* 26:25-37.
- Gao, C.; Taylor, J.; Wellner, N.; Byaruhanga, Y. B.; Parker, M. L.; Mills, E. N. C. and Belton, P. S. 2005. Effect of preparation conditions on protein secondary structure and biofilm formation of kafirina. *J. Agric. Food Chem.* 53:306-312.
- Geetha, K. B.; Lending, C. R.; Lopes, M. A.; Wallace, J. C. and Larkins, B. A. 1991. Opaque-2 modifiers increase  $\gamma$ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *Plant Cell.* 3:1207-1219.
- Gibbon, B. C. and Larkins, B. A. 2005. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends Genet.* 21:227-233.
- Guiragossian, V.; Chibber, B. A. K.; Scoyoc, S. V.; Jambunathan, R.; Mertz, E. T. and Axtell, J. D. 1978. Characteristics of proteins from normal, high lysine, and high tannin sorghums. *J. Agric. Food Chem.* 26:219-223.

- Gupta, H. S.; Agrawal, P. K.; Mahajan, V.; Bisht, G. S.; Kumar, A.; Verma, P.; Srivastava, A.; Saha, S.; Babu, R.; Pant, M. C. and Mani, V. P. 2009. Quality protein maize for nutritional security: rapid development of short duration hybrids through molecular marker assisted breeding. *Curr. Sci.* 96:230-237.
- Hamaker, B. R.; Kirleis, A. W.; Butler, L. G.; Axtell, J. D. and Mertz, E. T. 1987. Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents. USA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:626-628.
- Hamaker, B. R.; Mohamed, A. A. and Habben, J. E. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chem.* 72:583-588.
- Huang, S.; Adams, W. R.; Zhou, Q.; Malloy, K. P.; Voyles, D. A.; Anthony, J.; Kriz, A. L. and Luethy, M. H. 2004. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. *J. Agric. Food Chem.* 52:1958-1964.
- Huang, S.; Frizzi, A.; Florida, C. A.; Kruger, D. E. and Luethy, M. H. 2006. High lysine and high tryptophan maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD  $\alpha$ -zeins. *Plant Mol. Biol.* 61:525-535.
- Johns, C. O. and Brewster, J. F. 1916. Kafirin, an alcohol-soluble protein from kafir, andropogon sorghum. *J. Biol. Chem.* 28:59-65.
- Kodrzycki, R.; Boston, R. S. and Larkins, B. A. 1989. The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell.* 1:105-114.
- Lai, J. and Messing, J. 2002. Increasing maize seed methionine by mRNA stability. *Plant J.* 30:395-402.
- Landry, J.; Delhay, S. and Daerval, C. 2002. Effect of the *opaque-2* gene on accumulation of protein fractions in maize endosperm. *Maydica.* 47:59-66.
- Lee, S. H. and Hamaker, B. R. 2006. Cys155 of 27 kDa maize  $\gamma$ -zein is a key amino acid to improve its in vitro digestibility. *FEBS Lett.* 580:5803-5806.
- MacLean, W. C.; Lopez de Romaña, G.; Placko, R. P. and Graham, G. G. 1981. Protein quality and digestibility of sorghum in preschool children: Balance studies and plasma free amino acids. *J. Nutr.* 111:1928-1936.
- Mazhar, H. and Chandrashekar, A. 1993. Differences in kafirin composition during endosperm development and germination in sorghum cultivar of varying hardness. *Cereal Chem.* 70:667-671.
- Mazhar, H.; Chandrashekar, A. and Shetty, H. S. 1993. Isolation and immunochemical characterization of the alcohol-extractable proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L.) moench. *J. Cereal Sci.* 17:83-93.
- Mertz, E. T.; Bates, L. S. and Nelson, O. E. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science. New Series.* 145:279-280.
- Mohan, D. 1975. Chemically induced high lysine mutants in *Sorghum bicolor* (L.) moench. Ph. D. thesis, Purdue University. W. Lafayette, Indiana, USA. 127 p.
- Nunes, A.; Correia, I.; Barros, A. and Delgadillo, I. 2005. Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 53:639-643.
- Oria, M. P.; Hamaker, B. R. and Schull, J. M. 1995a. *In vitro* protein digestibility of developing and mature sorghum grain in relation to  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -kafirin disulfide crosslinking. *J. Cereal Sci.* 22:85-93.
- Oria, M. P.; Hamaker, B. R. and Shull, J. M. 1995b. Resistance of sorghum  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins to pepsin digestion. *J. Agric. Food Chem.* 43:2148-2153.
- Oria, M. P.; Hamaker, B. R.; Axtell, J. D. and Huang, C. P. 2000. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. USA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97:5065-5070.
- Paullis, J. W. and Wall, J. S. 1979. Distribution and electrophoretic properties of alcohol-soluble proteins in normal and high-lysine sorghums. *Cereal Chem.* 56:20-23.
- Rezende, T. and Figueira, S. 2008. Evolution of the genes encoding seed storage proteins in sugar cane and maize. *Trop. Plant Biol.* 1:108-119.
- Salinas, I.; Pró, A.; Salinas, Y.; Sosa, E.; Becerril, C. M.; Cuca, M.; Cervantes, M. and Gallegos, J. 2006. Compositional variation amongst sorghum hybrids: Effect of kafirin concentration on metabolizable energy. *J. Cereal Sci.* 44:342-346.
- Schmidt, R. J.; Ketudat, M.; Aukerman, M. J. and Hoschek, G. 1992. *Opaque-2* is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell.* 4:689-700.
- Segal, G.; Song, R. and Messing, J. 2003. A new opaque variant of maize by single dominant RNA-interference-inducing transgene. *Genetics.* 165:387-397.

- Shewry, P. R. and Halford, N. G. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 53:947-958.
- Shull, J. M.; Watterson, J. J. and Kirleis, A. W. 1991. Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L. Moench) based on molecular weight, solubility, and structure. *J. Agric. Food Chem.* 39:83-87.
- Shull, J. M.; Watterson, J. J. and Kirleis, A. W. 1992. Purification and immunocytochemical localization of kafirins in *Sorghum bicolor* (L. Moench) endosperm. *Protoplasma.* 171:64-74.
- Singh, R. and Axtell, J. D. 1973. High lysine mutant gene (*hl*) that improves protein quality and biological value of grain sorghum. *Crop Sci.* 13:535-539.
- Sofi, P. A., Wani, S. A., Rather, A. G. and Wani, S. H. 2009. Quality protein maize (QPM): genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. *J. Plant Breed Crop. Sci.* 1:244-253.
- Taylor, J.; Bean, S. R.; Ioerge, B. P. and Taylor, J. R. N. 2007. Preferential binding of sorghum tannins with  $\gamma$ -kafirin and the influence on tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation. *J. Cereal Sci.* 46:22-31.
- Ufaz, S. and Galili, G. 2008. Improving the content of essential amino acids in crop plants: goals and opportunities. *Plant Physiol.* 147: 954-961.
- Vannalli, S.; Kasturiba, B. and Yenagi, R. K. N. 2008. Nutritive value and quality characteristics of sorghum genotypes. *Karnataka J. Agric. Sci.* 20:586-588.
- Vasal, S. K. 2002. The role of high lysine cereals in animal and human nutrition in Asia. In: Protein Sources for the Animal Feed Industry. Expert consultation and workshop Bangkok. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. 167-183 pp.
- Wallace, J. C.; Lopes, M. A.; Paiva, E. and Larkins, B. A. 1990. New methods for extraction and quantification of zeins reveal a high content of  $\gamma$ -zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiol.* 92:192-196.
- Weaver, C. A.; Hamaker, B. R. and Axtell, J. D. 1998. Discovery of grain sorghum germplasm with high uncooked and cooked *in vitro* protein digestibility. *Cereal Chem.* 75(5):665-670.
- Wong, J. H.; Lau, T.; Cai, N.; Singh, J.; Pedersen, J. F.; Vensel, W. H.; Hurkman, W. J.; Wilson, J. D.; Lemaux, P. G. and Buchanan, B. B. 2009. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J. Cereal. Sci.* 49:73-82.
- Woo, Y. M.; Hu, D. W. N.; Larkins, B. A. and Jung, R. 2001. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *Plant Cell.* 13:2297-2317.
- Zhao, Z. Y.; Glassman, K.; Sewalt, V.; Wang, N.; Miller, M.; Chang, S.; Thompson, T.; Catron, S.; Wu, E.; Bidney, D.; Kedebe, Y. and Jung, R. 2003. Nutritionally improved transgenic sorghum. In: Vasil, I. K. (ed.). *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 413-416 pp.