

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

EL SABER, DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

**Estudio del Grado de Modificación de las Proteínas del Gluten de
Trigo por una Tripsina de Visceras de Sierra (*Scomberomorus sierra*)**

TESIS

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Faviola Noris Robles

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

	Página
DEL AUTOR.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO	viii
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
ANTECEDENTES.....	4
Generalidades del Trigo.....	4
Producción de Trigo.....	4
Clasificación del Trigo.....	6
Usos del Trigo.....	7
Usos del trigo cristalino.....	7
Proteínas del Gluten de Trigo.....	10
Gluteninas y su Clasificación.....	11
Gluteninas de alto peso molecular.....	11
Gluteninas de bajo peso molecular.....	12

Gliadinas y su Clasificación.....	14
Modificación de las Proteínas del Gluten de Trigo.....	15
Fuentes de Enzimas.....	17
Enzimas hidrolíticas.....	18
Característica de la tripsina de origen marino.....	20
Aplicación de Enzimas en Proteínas del Gluten de Trigo.....	23
Aplicación de enzima tipo tripsina de origen marino en proteínas de trigo.....	25
Análisis de las Proteínas del Gluten de Trigo.....	26
Separación de Proteínas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa (RP- HPLC).....	27
Ecuaciones Utilizadas para Medir Hidrólisis	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Materia Prima	32
Obtención de la Harina.....	32
Obtención de la Enzima Tipo Tripsina.....	32
Cromatografía de Afinidad.....	34
Actividad de la Tripsina.....	35
Determinación de la Concentración de la Proteína.....	36
Elaboración de la Masa.....	36
Análisis de Gliadinas y Gluteninas por RP-HPLC.....	37
Gliadinas.....	37

Extracción de la proteína.....	37
Separación de las fracciones de gliadinas mediante RP-HPLC.....	37
Gluteninas.....	38
Extracción de la proteína.....	38
Separación de las fracciones de gluteninas mediante RP-HPLC	40
Ecuaciones Utilizadas para el Cálculo del Grado de Modificación y el Comportamiento Cinético de las Proteínas Del Gluten de Trigo.....	40
Índice de Degradación Proteolítica (IDP).....	40
Obtención del Grado de Agregación	42
Comportamiento Cinético.....	43
Diseño del Experimento y Análisis Estadístico.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
Análisis Químico de la Harina de Trigo Cristalino.....	47
Purificación de la Enzima Tripsina de Visceras de Sierra.....	49
Identificación de las Fracciones de las Proteínas del Gluten Modificadas, Mediante los Cromatogramas Obtenidos por RP- HPLC.....	53
Gluteninas.....	53
Gliadinas.....	59

Grado de Modificación de las Proteínas del Gluten de Trigo.....	61
Gluteninas.....	61
Gliadinas.....	65
Comportamiento Cinético de las Gluteninas.....	71
Comportamiento Cinético de las Gliadinas.....	74
CONCLUSIONES.....	82
RECOMENDACIONES.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Clasificación de los trigos mexicanos con base en la funcionalidad del gluten	8
2 Composición de aminoácidos en las proteínas del gluten en el trigo.....	21
3 Programa de gradiente de la fase móvil para gliadinas.....	39
4 Programa de gradiente de la fase móvil para gluteninas.....	41
5 Diseño experimental para el análisis de las gliadinas y gluteninas por RP-HPLC.....	45
6 Composición química y parámetros farinográficos de la harina de trigo Rafi.....	48
7 Purificación de la enzima tripsina de vísceras de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>).....	52
8 Modelo matemático de las subunidades de gluteninas.....	75
9 Modelo matemático de las fracciones de gliadinas.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Cantidad porcentual de los principales productores de trigo.....	5
2 Modificación enzimática de las proteínas por una proteasa.....	19
3 Cromatograma de purificación de la tripsina de vísceras de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>).....	50
4 Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 0 min de reacción enzima-sustrato.....	54
5 Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 30 min de reacción enzima-sustrato.....	55
6 Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 90 min de reacción enzima-sustrato.....	56
7 Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 120 min de reacción enzima-sustrato.....	57
8 Comparación de los diferentes tipos de gliadinas (ω , $\alpha+\beta$ y γ - gliadinas), aplicando diferentes dosis de enzima.....	60
9 Índice de Degradación Proteolítica (IDP) de las subunidades de gluteninas de Alto Peso Molecular (APM), aplicando diferentes dosis de enzima.....	62
10 Índice de Degradación Proteolítica (IDP) de las subunidades de gluteninas de Bajo Peso Molecular (BPM), aplicando diferentes dosis de enzima.....	63

11	Grado de modificación de las ω -gliadinas, aplicando diferentes dosis de enzima.....	67
12	Grado de modificación de las $\alpha+\beta$ -gliadinas, aplicando diferentes dosis de enzima.....	68
13	Grado de modificación de las γ -gliadinas, aplicando diferentes dosis de enzima.....	69
14	Comportamiento cinético de las gluteninas de APM con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.....	72
15	Comportamiento cinético de las gluteninas de BPM con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.....	73
16	Comportamiento de las ω -gliadinas con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.....	78
17	Comportamiento de las $\alpha+\beta$ - gliadinas con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima	79
18	Comportamiento de las γ - gliadinas con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima	80

RESUMEN

Se planteó estudiar el grado de modificación de cada una de las fracciones que componen a las proteínas del gluten de trigo (gliadinas y gluteninas), de una variedad Rafi, adicionando una enzima tipo tripsina extraída de vísceras de sierra (*Scomberomorus sierra*). Esta fue aplicada en un sistema harina-agua, los tratamientos aplicados a las masas fueron tres dosis de enzima, 0.0, 0.14 y 0.28 U (unidades de actividad) y cuatro tiempos de reacción enzima-sustrato (0, 30, 90 y 120 min), la extracción de la proteína se hizo de acuerdo a su solubilidad con solventes orgánicos, se utilizó la técnica de RP-HPLC para ver el grado de modificación de cada una de las fracciones que componen a las gliadinas y gluteninas.

La modificación fue revelada por el aumento o la disminución de las áreas de los picos del cromatograma de las fracciones extraídas de la masa, después de transcurrir el tiempo de reacción. La disminución de las áreas de los picos fue considerada como una respuesta debida a una hidrólisis y el aumento de las áreas debida a una agregación. El efecto de las dos dosis estudiadas se obtuvo sustrayendo el efecto obtenido con el tratamiento sin enzima en cada tiempo de reacción.

Las proteínas que manifestaron una mayor modificación por efecto de una hidrólisis fueron las gluteninas de alto peso molecular y las de bajo peso

molecular también la presentaron a los 30 y 90 minutos de reposo de la masa con las dos dosis de enzima.

En las ω -gliadinas se presentó como una agregación durante el tiempo de reacción, y, la hidrólisis se manifestó en $\alpha+\beta$ - gliadinas con una dosis de enzima de 0.28U a los 30 min, y en las γ - gliadinas al inicio y final de la reacción con 0.14 U y al inicio con 0.28 U.

Como consecuencia de la modificación de las proteínas del gluten de trigo mediante la acción de la enzima tripsina, con respecto el tiempo, se obtuvo un comportamiento el cual se ajustó a un modelo cuadrático, que permite predecir el grado de modificación (hidrólisis o agregación) en cualquier tiempo de reacción enzima- sustrato y en cada una de las fracciones de proteínas.

INTRODUCCIÓN

El trigo es uno de los cereales más importantes cosechados en el mundo en términos de producción y utilización (Serna-Saldivar, 1996), es una fuente de energía, proteína y fibra dietaria en la nutrición humana (Kent, 1984; Anjum y col., 2007).

En nuestro país, la producción de trigo es de 3.015 millones de toneladas, es importante mencionar que Sonora ocupa el primer lugar aportando mas de la tercera parte de la producción de este cereal (1.049 millones de toneladas) (INEGI, 2006).

Existen diferentes clasificaciones del trigo en México, dependiendo de la funcionalidad del gluten, los granos que pertenecen al denominado grupo V son conocidos como trigo cristalino, agronómicamente muestran mayor resistencia a los cambios climatológicos y registran rendimientos más elevados por hectárea (Serna– Saldivar, 1996), por esta razón en México, muchos de los estados que producían trigos panaderos y suaves han optado por trigos cristalinos, del total de trigo que se produce en el estado de Sonora el 76% corresponde a los trigos del grupo V (trigos cristalinos) (SAGARPA, 2006).

En algunos países, estudian el comportamiento de trigos cristalinos, para la elaboración tanto de panes como para pastas (Liu y col., 1996). El propósito dual de estos trigos es un objetivo deseable porque muchos cultivares, podrían

tener alternativas de mercado en años de alta producción (Boggini y Pogna 1989).

Debido a esto, se han estado buscando alternativas para darle un valor agregado a este tipo de trigo, se han modificado genéticamente para producir pan con buenas características sensoriales (Peña, y col., 1994; Ammar y col., 2000; Rao y col., 2001) y en el estado de Sonora se han realizado estudios relacionados con la caracterización y utilización de tripsina de origen marino (Olivas, 2001; Cabrera, 2005; Gutiérrez, 2006). Sin embargo, el conocimiento obtenido hasta ahora del comportamiento de las proteínas del gluten de trigos cristalinos adicionando esta enzima, específicamente sobre las gliadinas y las gluteninas, no es suficiente para confirmar cuál de los fragmentos de estas proteínas está contribuyendo en las modificaciones observadas en las masas (Gutiérrez, 2006), debido a esto se planteó estudiar el grado de modificación de las proteínas del gluten de trigo por una tripsina de visceras de sierra (*Scomberomorus sierra*).

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el grado de modificación de las gliadinas y gluteninas de una variedad de trigo cristalino Rafi, por la acción de una enzima tipo tripsina extraída de vísceras de sierra (*Scomberomorus sierra*).

Objetivos particulares

- Identificar las fracciones de las proteínas del gluten que se modifican utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución de tipo fase inversa (RP-HPLC).
- Obtener un índice de modificación de las proteínas del gluten de trigo (gliadina y glutenina) de variedad Rafi por medio de RP- HPLC.
- Obtener el comportamiento cinético de la enzima tipo tripsina sobre las fracciones que forman el gluten en el sistema masa.

ANTECEDENTES

Generalidades del Trigo

El trigo es uno de los cereales más importantes cosechados en el mundo en términos de producción y utilización (Serna-Saldivar, 1996), es una fuente de energía, proteína y de fibra dietaria en la nutrición humana (Kent, 1984; Anjum y col., 2007)

La composición química del grano de trigo en general está dada por carbohidratos, compuestos nitrogenados, lípidos, minerales, agua, pequeñas cantidades de vitamina y pigmentos. Los constituyentes principales del trigo comprenden: 64-70% carbohidratos, 14% proteínas, 2% lípidos, 1.8% minerales y 12% fibra dietaria (Fabriani y Lin̄tas, 1988).

Producción de Trigo

La producción mundial de trigo es de 629.566 millones de toneladas, en el continente americano se produce 110.252 de las cuales México ocupa el 5to lugar después de Estados Unidos, Canadá, Argentina y Brasil con una aportación de 3.015 millones, es importante mencionar que dentro del país, Sonora ocupa el primer lugar ocupando más de la tercera parte con una producción 1.049 millones de toneladas (Figura1) (NEGI, 2006).

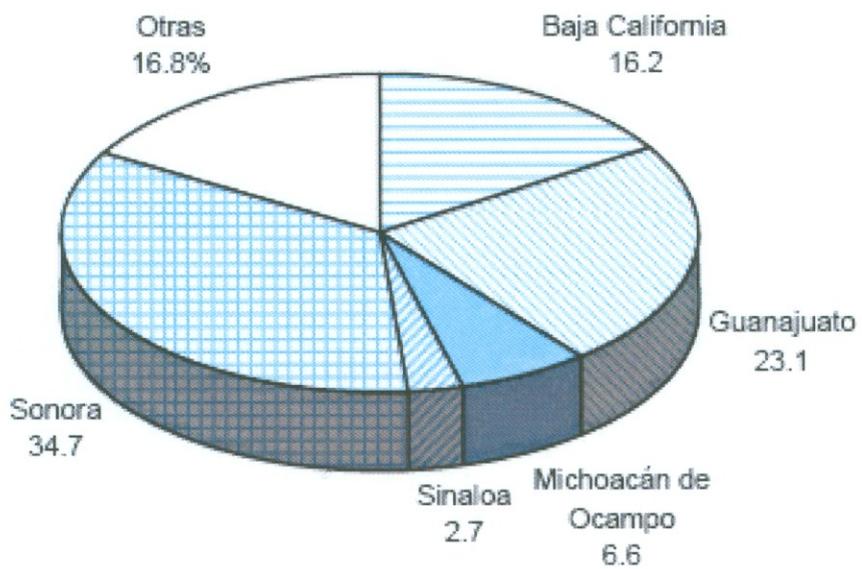


Figura 1. Cantidad porcentual de los principales productores de trigo

Clasificación del Trigo

El trigo es el cereal que tiene más sistemas de clasificación por su alta versatilidad y los distintos usos terminales. Por sus características genéticas, se clasificó en tetraploides (AABB), y hexaploides (AABBDD), el trigo cristalino pertenece a los tetraploides mientras que los panaderos pertenece a los hexaploides, este trigo a diferencia de los cristalinos tienen un genoma D, la ausencia de este genoma, reduce el potencial para la panificación (Atwell, 2001).

Por cosecha el trigo se clasifica en invernal y primaveral; por textura del endospermo, en vítreo y harinoso; por dureza del endospermo, en duros y blandos, y según su fuerza en: fuertes y débiles (Garza, 1999).

En México el trigo se clasifica en cinco grupos de acuerdo a la funcionalidad del gluten (Tabla 1) (Serna-Saldívar, 1996). Los trigos suaves (grupo III) se cosechan principalmente en la región del Bajío y en el estado de Chihuahua, mientras que los trigos panaderos y cristalinos (grupos I, II, IV y V) se siembran principalmente en el estado de Sonora y norte de Sinaloa (Serna-Saldívar, 1996).

Usos del Trigo

En general los trigos que pertenecen al grupo I y II se usan para panificación, los trigos III para la industria galletera y el trigo V, también llamado trigo cristalino se usa principalmente para pastas como ya se mencionó anteriormente (Tabla 1).

En menor proporción, se usa en la elaboración de cerveza, whisky y alcohol industrial. Los trigos de menor calidad y los subproductos de la molienda y de la elaboración de cervezas y destilados se aprovechan como piensos para el ganado (Fabriani y col., 1988).

Usos del trigo cristalino. Los granos que pertenecen al denominado grupo V son conocidos como trigo cristalino y agrónomicamente muestran mayor resistencia a los cambios climatológicos y registra rendimientos mas elevados por hectárea (Serna– Saldivar, 1996); por esta razón, en México, muchos de los estados que producían trigos panaderos y suaves han optado por trigos cristalinos; del total de trigo que se produce en el estado de Sonora el 76% corresponde a los trigos del grupo V (trigos cristalinos) (SAGARPA, 2006). El uso principal de estos trigos es para la producción de pastas debido a que presenta características más favorables que la harina de trigos panaderos, ya que presenta mejor textura, resistencia superficial a la desintegración, características que no se presentan en pastas elaboradas con trigos panaderos,

Tabla 1. Clasificación de los trigos mexicanos con base en la funcionalidad del gluten.

Grupo	Denominación	Características
I	Fuerte	Gluten fuerte y elástico apto para la industria mecanizada de panificación. Usados para mejorar la calidad de trigos débiles.
II	Medio-Fuerte	Gluten medio-fuerte apto para la industria artesana de panificación.
III	Suave	Gluten débil o suave pero extensible apto para la industria galletera. Usado para mejorar las propiedades de trigos tenaces.
IV	Tenaz	Gluten corto o poco extensible pero tenaz, apto para la industria pastelera y galletera
V	Cristalino	Gluten corto y tenaz, apto para la industria de pastas y sopas.

Fuente: Serna – Saldivar, 1996.

aunque también se usa para otros productos como bulgur, couscous, cereales para desayunos y en algunas partes del mundo para elaborar varios tipos de panes, aunque el uso comercial en panificación, ha sido restringido debido a que las proteínas del gluten de este tipo de trigo carece de fuerza elástica (Boyacioglu y D'Appolonia, 1994a). Sin embargo, en países del Mediterráneo, el trigo duro ha sido tradicionalmente usado en panes, estos tienen un color amarillo deseado, una característica de sabor, olor, una estructura de miga uniforme y fina, y tiene una vida de anaquel más prolongada; todo esto es atractivo para algunos consumidores (Lin y col., 1996). La utilización del trigo duro en regiones del mediterráneo ha incrementado, de acuerdo a Palumbo y col., (2000) en Italia en los últimos 10 años, la parte de trigo duro usado para panificación, ha incrementado de 4% a 10% de producción.

Palumbo y col., (2000) examinaron la calidad de masas de genotipos de trigos duros derivados de cruzas con trigos panaderos, para transferir gluteninas de APM codificadas por Glu-A1, ausentes en muchos cultivares de trigos duros, ellos no observaron mejorías, en panificación. Hay reportes de una relación entre calidad panificable y la variación alélica en Glu-B1 para genotipos de trigos duros Italianos (Boggini y col., 1998; Boggini y Pogna 1989) y Mexicanos (Peña y col., 1994), sin embargo Ammar y col., (2000), destacaron una contradicción en las conclusiones, ellos indicaron que la calidad panificable es dependiente de la acción del genotipo evaluado y el tipo de proceso de panificación usado (ejemplo fermentación largo, o corto).

La calidad para panificación y elaboración de otros productos a partir de los trigos duros y trigos panaderos son usualmente correlacionados con el contenido de proteína (Fabriani y Lintas, 1988; Kuktaite y col., 2004; Gianibelli y col., 2001; Anjum y col., 2007).

Proteínas del Gluten de Trigo

La habilidad de la harina de trigo para ser procesada en diferentes alimentos es determinada por las proteínas del gluten (Anjum y col., 2007).

El gluten se forma durante el proceso de amasado, debido a la ruptura e intercambio de enlaces disulfuro, así como a interacciones hidrofóbicas y enlaces hidrógeno, de los dos grupos de proteínas que lo componen (Larré y col., 2000; Bushuk y col., 1997).

El gluten está formado principalmente por proteínas llamadas prolaminas, las cuales fueron inicialmente definidas en base a su solubilidad, en mezclas de alcohol y agua (Osborne 1924). Esta definición ha sido usada para incluir a las proteínas que no son solubles en mezclas de alcohol-agua en el estado nativo. En el trigo estos dos grupos de prolaminas, monoméricas y poliméricas se conocen como gliadinas y gluteninas, respectivamente (Shewry y col., 1986, referenciado por Anjum y col., 2007)

Se ha reportado también otra clasificación de estos dos grupos de proteínas de acuerdo a su estado de agregación (Jackson y col., 1983). Las

gliadinas son una mezcla compleja de polipéptidos simples, mientras que las gluteninas, consisten de subunidades que son agregadas principalmente por enlaces disulfuro (Shewry y col., 1986).

Gluteninas y su Clasificación

Las gluteninas son de las moléculas más grandes en la naturaleza, su tamaño puede llegar hasta 10 millones de Da y contribuyen a la elasticidad del gluten (Wrigley y Békes, 1999; Cherian y Chinachoti, 1996; Hernández y col., 2004), al tratarse con un agente reductor se disocian en varias subunidades que pueden ser de alto y bajo peso molecular (D'Ovidio y Masci, 2004).

Gluteninas de alto peso molecular. Las gluteninas de alto peso molecular (APM) están en menor componente en términos de cantidad, pero son factores claves en el proceso de panificación, son la mayor determinante en la elasticidad del gluten, estas subunidades promueven la formación de polímeros grandes de gluteninas (Anjum y col., 2007; Anjum y col., 2000) y estas han sido estudiadas ampliamente (D'Ovidio y Masci, 2004). En los trigos panaderos se han encontrado de 3 a 5 subunidades, mientras que en los trigos cristalinos contienen de 1 a 3 subunidades (Anjum y col., 2007).

De acuerdo a su peso molecular en SDS-PAGE se ha encontrado dos tipos de subunidades, las gluteninas de APM (80,000 a 130, 000 Da) y las

gluteninas de Bajo Peso Molecular (BPM) (10,000 a 70,000 Da). Sin embargo hay otros estudios donde hablan de este peso molecular y lo llaman "aparente" porque mediante la secuencia de aminoácidos muestran valores diferentes (60,000 a 90,000 Da, para gluteninas de APM (Anderson y Green, 1989; Gianibelli y col., 2001; D'Ovidio y Masci, 2004).

Las gluteninas de APM son controladas por genes de brazos largos de cromosomas 1D y 1B, y mediante el análisis de RP-HPLC indican que estas subunidades son más hidrofílicas que las gluteninas de BPM (Gianibelli y col., 2001).

Estas subunidades son ricas en glicina (17%), glutamina (32.36 %) y prolina (10.13%) por mol de proteína, estos aminoácidos se derivan de la secuencia repetitiva la cual forma la parte central de la proteína (Shewry y Lookhart, 2003), el dominio de la parte central presenta características hidrofílicas, mientras que la características de hidrofobicidad se las confiere los dominios de C y N terminal (Anjum y col., 2007), el dominio repetitivo central les confiere elasticidad a las moléculas de proteínas (Gianibelli y col., 2001).

Gluteninas de bajo peso molecular. Las gluteninas de BPM representan cerca del 60% del total de las gluteninas, las subunidades de BPM (20,000 y 45,000 Da, en base a su secuencia de aminoácidos) incluyen un largo número de polipéptidos y su estructura, organización y relación con la calidad

en el procesamiento del grano todavía no han sido investigado como las de APM (D'Ovidio y Masci, 2004).

En los trigos las subunidades de BPM, tienen la habilidad para formar grandes agregados que están relacionados con la fuerza de la masa, Payne y col. (1984), fueron los primeros en asociar las gluteninas de BPM con características de calidad en trigos tetraploides.

Con base a sus características bioquímicas y estructurales, las gluteninas de BPM se clasifican en tres grupos: B, C y D (D'Ovidio y Masci, 2004). Con respecto a las secuencias de las subunidades de B, se sabe que se subdividen en BPM-s, BPM-m y BPM-i, cuyos aminotermiales son serina, metionina e isoleucina, respectivamente. También se sabe que los polipéptidos con mayor presencia son los de BPM-s y BPM-m, mientras que los de BPM-i, hasta hace muy poco tiempo, se ha confirmado su expresión en el endospermo del trigo como parte de la fracción glutenina (Ferrante y col., 2004; Ikeda y col., 2004; referenciado por Ferrante y col., 2007). Mediante el análisis secuencial del grupo D de las gluteninas de BPM, se han encontrado componentes de omegas-gliadinas, que han adquirido un residuo de cisteína. La identificación de residuos de cisteína en omegas-gliadinas, (típicamente carece de este residuo de aminoácido), fue la primera evidencia que subunidades ricas en gliadinas, estuvieran presentes en polímeros de gluteninas (Masci, 1999, referenciado por D'Ovidio y Masci, 2004).

En general los subgrupos C y D están compuestos principalmente de α/β -, γ - y ω -gliadinas con cantidades distintas de residuos de cisteína. Hay evidencia de que se incorporan a la red polimérica del gluten con un residuo extra de cisteína (Ferrante y col., 2006).

Gliadinas y su Clasificación

La gliadina es un polipéptido monomérico de tamaño mediano, en un rango de 30,000 a 50,000 Da y es responsable de las propiedades de extensibilidad y cohesividad. Con base en el peso molecular, de acuerdo a estudios genéticos y composición de aminoácidos, las gliadinas se clasifican en α , β , γ y ω gliadinas (Wrigley y Békes, 1999; Cherian y Chinachoti, 1996).

Las gliadinas componen acerca del 50% del gluten, son proteínas monoméricas solubles en alcohol e interactúan con enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Pueden ser clasificadas en varias fracciones como α , β , γ , y ω , basado en la movilidad electroforética en geles de poli(acrilamida) ácidos (pH 3.1) (Uthayakumaran y col., 2001). Las α , β y γ gliadinas son ricas en enlaces disulfuros mientras las ω gliadinas son pobres en estos (Shewry y Tatham, 1997).

Las masas suplementadas con gliadinas generalmente tienen un tiempo corto de mezclado, gran resistencia a la ruptura, baja la resistencia máxima a la extensión, y disminuye el volumen del pan (MacRitchie, 1987; Uthayakumaran y

col., 1999). Sin embargo, estudios realizados como el de Uthayakumaran (2001), demostraron que la fracción $\alpha + \beta$ gliadinas fue menos perjudicial para la altura del pan y fue útil para reducir el tiempo de mezclado, pero también aportaron un incremento a la resistencia de ruptura mientras que las ω tuvieron un efecto negativo en la altura del pan.

En base a su hidrofobicidad utilizando la técnica de RP-HPLC, las γ son más hidrofóbicas que las $\alpha + \beta$, y estas a su vez que las ω - gliadinas. En el estudio de Uthayakumaran (2001), se observó que cuando incrementa la hidrofobicidad (γ gliadinas), disminuye el tiempo de mezclado, la máxima resistencia a la extensión y el pico de resistencia, mientras la extensibilidad incrementa. Sin embargo hay otros estudios que correlacionan a las γ gliadinas con efectos positivos con la fuerza de la masa, tolerancia al mezclado y en la panificación (Van Lonkhuijsen y col.1992; Branlard y Dardevet, 1985; Dong y col., 1992; citado por Uthayakumaran, 2001).

Modificación de las Proteínas del Gluten de Trigo

Las proteínas del gluten de trigo se han modificado con diferentes propósitos, para que puedan ser utilizadas en la industria alimentaria (Kong y col., 2007), o bien para modificar las propiedades de la masa y ampliar las alternativas de utilización de las diferentes variedades de este cereal

(Boyacioglu y D'Appolonia, 1994a, 1994b; Boggini y col., 1995, Ammar y col., 2000).

Las proteínas del gluten pueden ser modificadas genéticamente, por medio de aditivos químicos o empleando enzimas (Boyacioglu y D'Appolonia, 1994b; Kong y col., 2007).

Aproximadamente hace 50 años se encontró que existían compuestos químicos que podían ser utilizados para mejorar las propiedades del pan como el bromato de potasio y el ácido ascórbico. En general estos aditivos son agentes oxidantes que actúan sobre los grupos sulfhidrilos de la proteína en la fracción de glutenina, favoreciendo la formación de una red que retiene agua y gas provenientes de la fermentación. Sin embargo, en estudios realizados en animales de laboratorio se ha demostrado que el bromato de potasio es un mutágeno con potencial para provocar cáncer (Velich y col., 2004), la acción de estos agentes oxidantes todavía ha sido sujeto de muchas investigaciones (Larré y col., 2000)

La industria de panificación utiliza mezclas de harinas de diferentes clases de trigos, para obtener así harinas con características adecuadas.

López Ahumada y col., (1991), evaluaron mezclas de trigos duros y trigos panaderos para la preparación de masas, los resultados del estudio mostraron que la mejor mezcla fue hecha de 40% de trigo duro y 60% de trigo panadero, y además de la mezcla, la fermentación fue importante para obtener una masa con buenas características.

Estudios realizados como el de Uthayakumaran y col., (2000), han incorporado a las masas subunidades de APM para mejorar las propiedades de la masa y han encontrado que el tiempo de mezclado, el pico de resistencia, la máxima resistencia a la extensión y el volumen del pan incrementan.

El uso de enzimas proteolíticas es un método eficiente para modificar las proteínas. Controlando las condiciones de reacción durante la hidrólisis enzimática, es posible obtener diferentes características de estas proteínas (Kong y col., 2007).

Fuentes de Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos; es decir, tienen la capacidad de acelerar ciertas reacciones químicas. En los últimos años su uso en muchas industrias ha adquirido gran relevancia. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores no biológicos (Horcasitas y col., 2002).

Las enzimas se obtienen de diversas fuentes, éstas pueden ser de origen fúngico, bacteriano y animal (Nightingale y col., 1999), por lo general estas enzimas se usan en la industria alimentaria como auxiliares de procesos. De todos estos procesos, posiblemente el uso más importante de las enzimas es en la hidrólisis de carbohidratos y proteínas (Whitaker, 1994).

Existen diferentes tipos de enzimas, sin embargo las de mayor aplicación en la industria alimentaria son las hidrolasas.

Enzimas hidrolíticas. Estas enzimas, forman un grupo muy numeroso que comprende cerca de 200 enzimas, que poseen en común, la capacidad de introducir los elementos del agua (H^+ y OH^-) en el sustrato, produciendo así una hidrólisis (Lehninger, 1995). Dentro de las enzimas hidrolíticas se encuentran las proteasas, que además de hidrolisar pueden catalizar la reacción inversa, esto es la formación de un enlace peptídico (Figura 2). En la reacción I, un sustrato activado (péptido ó aminoácido) es utilizado por la enzima que cataliza la transferencia del grupo acil a un nucleófilo que puede ser un aminoácido ó un péptido. En esta reacción la proteasa actúa como una transferasa. Competiendo con esta reacción, está la hidrólisis del sustrato activado (reacción II). El producto es también un sustrato para la proteasa y puede ser hidrolizado en la reacción III.

Dentro de las proteasas, la tripsina es una de las más estudiadas, la cual se ha observado que es abundante en el tracto digestivo de las especies mamíferas. En el estado de Sonora se han estudiado tripsinas de diferentes especies marinas, entre las cuales destacan *Scomberomorus sierra*, *Mugil cephalus* y *Sardinops sagax* (Olivas y col., 2001; Cabrera, 2005; Castillo y col., 2005).

Para que se lleve a cabo la hidrólisis, las enzimas tipo tripsina, por la

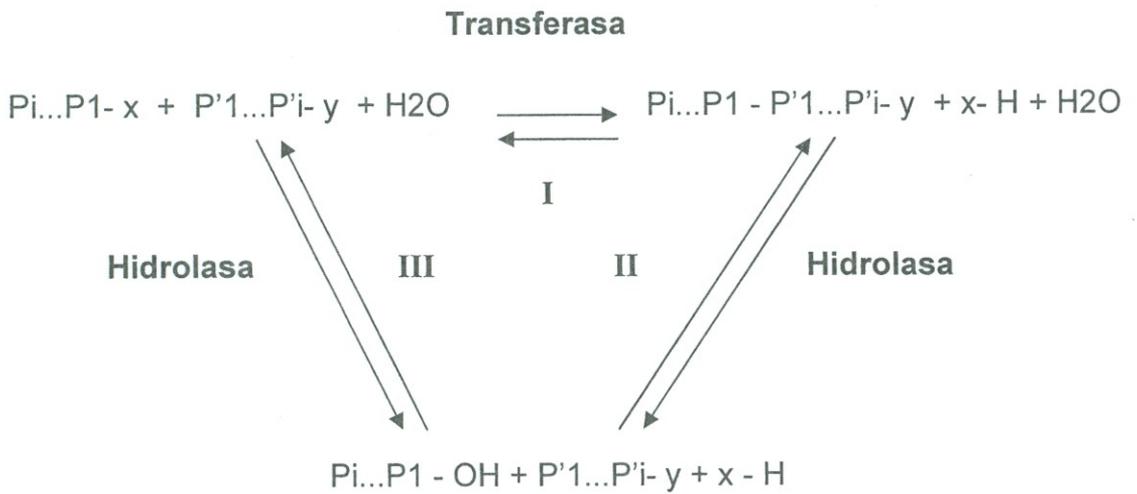


Figura 2. Modificación enzimática de las proteínas por una proteasa

Pi, P'i : Residuo de aminoácido

- X : Grupo que activa el grupo carboxilo terminal del péptido Pi...P1

- Y : Grupo que protege el carboxilo terminal del péptido
(aminoácido) P'1...P'i

presencia de un residuo de aspártico, presentan una preferencia muy alta por sustratos con residuos de arginina (Arg) y lisina (Lis) (Copeland, 2000). Sin embargo, cuando catalizan una síntesis, hay evidencia de que los aminoácidos específicos además de Lis y Arg son Asparagina (Asn), Glutamina (Glu), Tirosina (Tir), Valina (Val), Leucina (Leu), Fenilalanina (Fen) y Metionina (Met) (Kasche 1990).

De los aminoácidos antes mencionados para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas por tripsina, Fen y Glu se encuentran en cantidades considerables en gliadinas, los valores se muestran en la Tabla 2, así como las cantidades de aminoácidos para que lleve a cabo la hidrólisis (Arg y Lis), se puede observar que la cantidad de lisina y arginina es mayor en las gluteninas (Atwell, 2001). Además, las subunidades de glutenina de APM contienen de 6 a 8 mol de lisina/mol de proteína (Thompson y col., 1985, Anderson y col., 1989) y 1 mol de lisina/mol de proteína en subunidades de glutenina de BPM (Pitts y col., 1988, Colot y col., 1989); de acuerdo a esto se favorecería una hidrólisis parcial y controlada y se propiciarían cambios que diversificarían el uso de las harinas de trigo.

Características de la tripsina de origen marino. El tracto digestivo de muchas especies marinas es rico en enzima tipo tripsina, muchos trabajos han descrito que la actividad de las enzimas digestivas en peces es influenciado por la edad y/o por la etapa de desarrollo (Rathore y col., 2005). Sin embargo, hay otros factores como el tipo de alimentación, la época y la temperatura de

Tabla 2. Composición de aminoácidos en las proteínas del gluten en el trigo

Aminoácido	Grano ^a	Harina ^a	Gliadina ^{*,a}	Glutenina ^{**,a}
Triptófano	1.5	1.5	33	16
Lisina	2.3	1.9	0.5	1.5
Histidina	2	1.9	1.6	1.7
Arginina	4	3.1	1.9	3.0
Ác. Aspártico	4.7	3.7	1.9	2.7
Treonina	2.4	2.4	1.5	2.4
Serina	4.2	4.4	3.8	4.7
Ác. Glutámico	30.3	34.7	41.1	34.2
Prolina	10.1	11.8	14.3	10.7
Glicina	3.8	3.4	1.5	4.2
Alanina	3.1	2.6	1.5	2.3
Cisteína	2.8	2.8	2.7	2.2
Valina	3.6	3.4	2.7	3.2
Metionina	1.2	1.3	1.0	1.3
Isoleucina	3.0	3.1	3.2	2.7
Leucina	6.3	6.6	6.1	6.2
Tirosina	2.7	2.8	2.2	3.4
Fenilalanina	4.6	4.8	6.0	4.1

* Solubilidad de la gliadina en una solución de etanol al 70%

** Solubilidad de la glutenina en una solución de ácido acético 0.5M

^a g/16g de N

Fuente: Atwell, 2001

climatización, en si estas enzimas reflejan los patrones de alimentación del hábitat y la capacidad digestiva (Lundstedt y col., 2004).

Las tripsinas de origen marino pueden ser de aguas frías y aguas tropicales (Olivas, 2001).

a) Tripsinas purificadas de especies de aguas frías: Se ha observado que las tripsinas purificadas de intestinos de especies de aguas frías como las del Atlántico norte y Groenlandia muestran rangos de actividad óptima a pH de 7.5, esto para el bacalao *Gadus morhua* y *Gadus ogac* respectivamente (Simpson y Haard, 1984). Para anchoveta (*Engraulis japonica*) se tiene una actividad óptima a pH de 8-9 (Heu y col., 1995).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de tripsinas de especies de aguas frías tienen por lo general su óptimo a 40°C, para la tripsina de bacalao (*Gadus ogac*) de Groenlandia se tuvo una temperatura de 30°C y la del Atlántico norte (*Gadus morhua*) mostró una temperatura de 40°C (Simpson y Haard, 1984; Simpson y col., 1990).

b) Tripsinas purificadas de especies de aguas tropicales: Las tripsinas purificadas de especies de aguas tropicales como las del Golfo de California muestran rangos de actividad óptima a pH de 7.8-9.0; esto para la lisa (*Mugil ssp*) y es estable en un rango de 7.0-10.0 (Pavlisiko, 1999). Otro estudio para la lisa (*Mugil cephalus*), mostró estabilidad a pH de 4.0, 7.0 y 9.0 donde mantuvo su actividad de 65, 61 y 90% respectivamente (Olivas, 2001). La tripsina purificada de sardina (*Sardinops sagax caerulea*) mostró un pH de 8.0 de

máxima actividad y estabilidad a pH de 7.0-8.0 (Castillo, 2005). En un estudio para sierra (*Scomberomorus concolor*) se mostró que la actividad óptima se dio a un pH de 9.0 y fue estable a pH de 4.0, 7.0 y 9.0 (Olivas, 2001).

La lisa (*Mugil cephalus*) mostró dos picos de temperatura óptima a 40°C y a 60°C (Olivas, 2001). Pavlisco (1999) para la lisa (*Mugil spp*) obtuvo una temperatura óptima a 60°C. La sardina (*Sardinops sagax caerulea*) mostró una temperatura óptima de 50°C (Castillo, 2005). Mientras que la tripsina de sierra (*Scomberomorus concolor*) muestra una temperatura óptima a 40°C, observándose a su vez, un rango de estabilidad más amplio con temperaturas de 30-60°C (Olivas y col., 2001). La diferencia de estas enzimas son las características que presentan para llevar a cabo la reacción. La enzima tripsina de sierra, como ya se mencionó anteriormente presenta un rango de estabilidad más amplio, lo que puede ser una ventaja para su uso en la industria alimentaria.

Aplicación de Enzimas en Proteínas del Gluten de Trigo

Las enzimas se aplican a las proteínas del gluten con el único fin de mejorar las propiedades en panificación, u obtener un producto que tengan ciertas características deseadas.

Una variedad de enzimas son usadas para modificar las proteínas del gluten de trigo. En la industria de panificación, se utilizan para modificar la masa

que conduzca a mejorar las propiedades mecánicas. Las proteasas se usan para hidrolizar a las proteínas del gluten y disminuir su fuerza elástica (Harada y col., 2000).

Hay reportes, donde las enzimas hidrolíticas, además de modificar las proteínas del gluten para mejorar las propiedades de las masas, también se han aplicado para modificar el gluten, con el fin de hacerlo más soluble y que pueda servir como ingrediente en la industria alimentaria. Los péptidos liberados como consecuencia de la hidrólisis, han sido evaluados para conocer sus propiedades fisicoquímicas, tales como las propiedades emulsificantes y espumantes (Kong y col., 2007; Wang y col., 2007). Todos estos trabajos se han realizado con el fin de aprovechar el gluten ya que hoy en día es un subproducto de la industria del almidón (Linares y col., 2000)

En un estudio realizado por Kong y col., 2007, se evaluó la hidrólisis enzimática del gluten de trigo empleando diferentes proteasas (se utilizó una tripsina comercial) y encontraron que la mayor liberación de péptidos se llevó a cabo entre los primeros 30 min de la reacción.

Otra enzima empleada en las proteínas del gluten es la transglutaminasa, se usa para mejorar la elasticidad de las masas, estudios como el de Larré y col., 2000, han encontrado que al tratar las masas con esta enzima, las proteínas solubles decrecen drásticamente, debido a la formación de largos polímeros insolubles.

Aplicación de enzima tipo tripsina de origen marino en proteínas de trigo. Para modificar las proteínas del trigo provenientes de trigos cristalinos hay muy pocos trabajos y aun más cuando se utiliza una enzima tripsina de origen marino.

Uno de los trabajos es el de Olivas (2001), encontró mediante la técnica de caída de pH, que la tripsina era capaz de hidrolizar a las proteínas de gluten de tres variedades de trigo (dos cristalinas y una harinera), con peso molecular de 36 a 84 kDa, que corresponden a las subunidades de glutenina de BPM y a las ω -gliadinas. Además se ha caracterizado la reacción enzimática con gluten, gliadina y glutenina por separado, y se encontró por los parámetros cinéticos que la tripsina (extraída de vísceras de sierra (*Scomberomorus sierra*)) presenta mayor afinidad por gluteninas de una variedad panadera como de una cristalina (Cabrera, 2005).

Gutiérrez (2006), realizó un estudio sobre la hidrólisis de las proteínas en las masas de una variedad de trigo cristalino mediante las técnicas de calorimetría de barrido diferencial, viscosidad extensional biaxial, y la fuerza de la miga, además determinó la influencia de la concentración de enzima sobre los parámetros de calidad del pan elaborado con esta harina.

En este estudio se encontró por medio de calorimetría de barrido diferencial que la enzima presentó una mayor catálisis en las proteínas a los 120 min ya que la masa control requirió una mayor energía (entalpía mayor)

para desnaturalizar a las proteínas, indicando que la adición de la enzima afecta a la estructura nativa de la proteína disminuyendo su estabilidad térmica.

Utilizando la técnica de compresión uniaxial, la viscosidad extensional biaxial fue menor aplicando ambas dosis de enzima con respecto al control en todos los tiempos de reacción enzima-sustrato, indicando que la enzima afecta a las proteínas del trigo responsables de esta propiedad fisicoquímica. También encontró que con una concentración de 0.28 U de enzima tipo tripsina, la firmeza de la miga del pan aumentaba.

Lograr que el trigo cristalino tenga un uso en panificación podría incrementar las alternativas de mercado, sobre todo en los años de alta producción o en regiones donde se produce en mayor proporción, (Boggini y col., 1995), o simplemente la modificación de estas proteínas mediante la hidrólisis enzimática con tripsina de origen marino, podría tener un uso en la industria de los alimentos.

Análisis de las Proteínas del Gluten de Trigo

Para analizar las proteínas del gluten de trigo existen muchas técnicas, la más usada es cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) esta técnica ofrece excelente resolución, automatización, cuantificación y se basa en la separación por diferencias en hidrofobicidad (Gianibelli y col., 2001).

Separación de Proteínas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Inversa (RP- HPLC)

En general, la cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Dependiendo del tipo de fase y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación la cromatografía líquida de alta resolución puede ser: a) cromatografía de adsorción, b) cromatografía de reparto, c) cromatografía iónica y d) cromatografía de exclusión por tamaño (Skoog, 2001).

En lo particular, la cromatografía de reparto se subdivide en cromatografía en fase normal y fase reversa. En esta, el compuesto unido químicamente al soporte sólido de sílica es un hidrocarburo alifático y se emplean fases móviles polares, provocando que las sustancias más polares eluyan primero (Skoog, 2001).

Existen dos teorías sobre el principio de retención en cromatografía de fase inversa llamadas teoría solvofóbica y de partición. En la teoría solvofóbica la fase estacionaria tiene un comportamiento parecido al sólido más que al líquido y la retención es considerada con interacciones hidrofóbicas entre los solutos y la fase móvil. En la teoría de partición el soluto está completamente embebido entre las cadenas de la fase estacionaria más que adsorbido sobre la

superficie y por lo tanto se considera que hay partición entre la fase móvil y la fase estacionaria “como líquido” (Weston y Brown, 1997 referenciado por Bañuelos, 2003).

La cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) es la técnica más empleada para el análisis de proteínas del gluten. Tiene a su favor que la resolución es equivalente o excede a otros métodos utilizados, es rápida, reproducible, sensible, cuantificable, y da buena recuperación. Este método separa a las proteínas de acuerdo a sus diferentes fases de hidrofobicidad (Shewry y Lookhart, 2003), y puede ser usada sola o complementarla con otros métodos de separación, como la electroforesis en geles de poliacrilamida (Gianibelli y col., 2001).

Esta técnica se ha utilizado para relacionar la hidrofobicidad de las proteínas de trigo, su estructura y sus tendencias de agregación con sus propiedades funcionales tales como viscoelasticidad, emulsificación y formación de espumas (Popineau, 1994).

En lo referente a la caracterización de estas proteínas utilizando RP-HPLC, se tiene que los picos que presentan menos hidrofobicidad corresponden a las gluteninas de APM, y los picos que contienen más hidrofobicidad pertenecen a las gluteninas de BPM. De las gliadinas, las ω -gliadinas son menos hidrofóbicas, y en seguida aparecen los picos correspondientes a las $\alpha+\beta$ -gliadinas y por último las γ -gliadinas (Uthayakumaran, 2001). Esta técnica se ha empleado para caracterizar

hidrolizados derivados de hidrólisis enzimática de gluten (Wang y col., 2007), para observar los cambios en el perfil de las proteínas del gluten cuando se emplea una enzima transglutaminasa (Mujo y Ng, 2003), para ver cambios en las proteínas del gluten durante la elaboración de la masa (Singh, 2004), los resultados que se obtienen permiten obtener una cuantificación por medio de las áreas, empleando formulas.

Ecuaciones Utilizadas Para Medir Hidrólisis

Para medir la hidrólisis de proteínas se han empleado muchos métodos y ecuaciones, uno de ellos es el grado de hidrólisis, el cual es definido como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados o rotos (ecuación 1) (Nielsen y col., 2001), otra forma de medir hidrólisis es midiendo la desaminación la cual es expresado como una proporción (%) de la cantidad de amonio relacionada con la completa desaminación del gluten (ecuación 2) (Mimouni y col., 1999), en este mismo estudio se empleó otra ecuación para obtener un Índice de nitrógeno soluble después de haber tratado al gluten con enzimas (ecuación 3).

También se conoce que mediante el alveógrafo se puede determinar el índice de degradación proteolítica de una harina atacada por insectos (ecuación 4) (manual del fabricante Chopin, 2001), y por ultimo en un estudio realizado por Gutiérrez (2006) utilizó una fórmula para obtener un IDP (ecuación

5), donde involucra, la modificación de las proteínas mediante enzimas empleando calorimetría diferencial de barrido.

$$DH\% = \frac{h \times 100}{h_{\text{tot}}} \text{----- Ecuación 1}$$

DH= Grado de hidrólisis

h_{tot} = el numero total de enlaces por unidad de peso.

h= numero de enlaces peptidicos rotos.

$$\% \text{ de Desaminacion} = \frac{\text{(NH}_3\text{) relacionada con la desaminación parcial del gluten}}{\text{(NH}_3\text{) relacionada con la desaminación total del gluten}} \times 100 \text{----- Ecuación 2}$$

$$INS (\%) = \frac{\text{Cantidad de nitrógeno en el sobrenadante}}{\text{Cantidad total de nitrógeno}} \times 100 \text{----- Ecuación 3}$$

INS= Índice de Solubilidad de Nitrógeno

$$\%IDP = \frac{W_{20} - W_{120}}{W_{20}} * 100 \text{----- Ecuación 4}$$

Donde:

IDP= Índice de Degradación Proteolítica

W_{20} = W después de ocurrir 20 min de reposo

W_{120} = W después de ocurrir 3 horas de reposo

W= Energía de deformación

$$\%IDP = \Delta H_{TC} - \frac{\Delta H_{TE}}{\Delta H_{TC}} * 100\% \text{ ----- Ecuación 5}$$

% IDP= Índice de Degradación Proteolítica.

El tratamiento control (ΔH_{TC}) menos la relación de tratamiento con enzima (ΔH_{TE}) sobre el tratamiento control (ΔH_{TC}) por 100%.

ΔH = Entalpía

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Como materia prima se utilizaron peces de la especie *Scomberomorus sierra*, los cuales se capturaron en el Golfo de California en el mes de Noviembre del 2006, los pescados se transportaron al Laboratorio de Productos Marinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA); y se llevó a cabo el eviscerado de la sierra. También se usó un trigo de la variedad Rafi, cosechado en el verano del 2006.

Obtención de la Harina

El trigo se limpió en un Clipper M2BC, se acondicionó y se realizó la molienda en un molino Brabender Instrument modelo Quadrumat Sr. y posteriormente se le realizó algunos análisis químicos como contenidos de humedad y proteína y se le realizó una prueba en el farinógrafo, necesario para la elaboración de la masa.

Obtención de la Enzima Tipo Tripsina

Para la obtención de la enzima tipo tripsina, se siguió la metodología descrita por Olivas (2001). Las vísceras de sierra se molieron, homogenizaron,

congelaron y liofilizaron. Posteriormente se pesaron 30 g a los cuales se les adicionó 5 volúmenes de solución amortiguadora de extracción 0.05M de Tris-HCl a un pH de 7.8, conteniendo 0.02M de CaCl_2 a 4°C (1:5 p/v). La mezcla obtenida se agitó por 4 h. a 4 °C y se centrifugó por 30 min. a 3,000 x g; el precipitado se descartó y al sobrenadante (F1) se le adicionó una solución Brij 35 (polioxietilen laurel éter) hasta obtener una concentración final de 0.3%. El sobrenadante se mantuvo por 8 h a 4°C, después se centrifugó a 10,000 x g por 30 min. a 4 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante (F2), se fraccionó con sulfato de amonio a 4°C (30 – 60 % de saturación). Posteriormente se centrifugó a 6,000 x g por 30 min. 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue disuelto en 100 ml de solución amortiguadora de extracción 0.05M de Tris-HCl a un pH de 7.8, conteniendo 0.02M de CaCl_2 a 4°C para obtener la fracción (F3). La solución obtenida se dializó utilizando una membrana de celulosa marca Spectrum con un limite de exclusión molecular de 25,000 Da por 16 h con tres recambios de buffer obteniéndose así la fracción (F4).

Para la obtención de la enzima tripsina, la fracción 4 (F4) se pasó por una columna de afinidad. La columna de afinidad se preparó de acuerdo a lo descrito por el fabricante Pharmacia Fine Chemicals (1979). La F4 fue inyectada en la columna de afinidad SBTI – Sefarosa 4B (4 ml). El material retenido fue eliminado por lavados con buffer Tris – HCl, y la tripsina fue eluída

con HCl 5 mM. El eluato de la columna fue colectado en fracciones de 3 ml. (F5) (Olivas 2001).

Cromatografía de afinidad. Como se mencionó anteriormente, para la obtención de la enzima tripsina, se utilizó una columna de afinidad, esta fue preparada de acuerdo a lo descrito por el fabricante Pharmacia Fine Chemicals (1979), la cual consiste en pesar 2 g de Sepharose® 4B a los cuales se les adiciona 20 mL de HCl 1mM, y posteriormente se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionan 200 mL del mismo ácido, se deja sedimentar por 10 minutos. Posteriormente se centrifuga a 180 x g por 2 min en una centrifuga Beckman GS-15R, solo se recolecta el sedimento. Este último paso se realiza dos veces. Al gel sedimentado se le agregan 10 mL de NaHCO₃ 0.1M, pH 8.3 y se deja agitando por 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga a 180 x g por un min y el sobrenadante se descarta. Posteriormente se adicionan 10 mL más de NaHCO₃ 0.1M, se agita por 5 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 180 x g por un min, el sobrenadante se descarta y el gel se mezcla con la solución que contiene al ligando (inhibidor de tripsina de soya).

La preparación del ligando se realiza de la siguiente manera: se pesan 38.5mg de SBTI (inhibidor de tripsina de soya), los cuales se suspenden en 7 mL de NaHCO₃ 0.1M, pH de 8.3, esta solución se mezcla con el gel de Sheparose anteriormente preparado, se deja incubar por 2 h a 25°C con

agitación suave, después se centrifuga a 180 x g por 2 min y el sobrenadante se descarta. El bloqueo de los grupos activos de la matriz se realiza utilizando glicina 0.2 M a pH de 8.0 incubándose por 48 h en refrigeración. Después el gel se lava con NaHCO_3 0.1M, pH 8.3 y se mantiene en refrigeración hasta su utilización.

Actividad de la tripsina. La actividad de tripsina se midió en cada una de las fracciones (F1, F2, F3, F4) y en la fracción 5 (F5), con la finalidad de observar que tanto se purificó a partir del extracto crudo (F1), es importante mencionar, que en F5 se obtiene la mayor actividad específica ya que el último paso consiste en pasar F4 por cromatografía de afinidad y esta es ampliamente recomendada para este tipo de separación (Simpson y Haard, 1987).

Para medir la actividad se utilizó el sustrato sintético Benzoil-Arginina-p-Nitroanilida (BAPNA) de acuerdo a Erlenger y col., (1961). El BAPNA fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una solución 1 mM. Después se ajustó el volumen con una solución buffer Tris-HCl 50mM a pH de 7.8. La determinación se realizó a 37°C. En tubos de ensayo se adicionó 1.25 mL de la solución buffer conteniendo el BAPNA y 0.025 mL de cada fracción colectada (F₁, F₂, F₃, F₄ y F₅). La reacción se detuvo a los 30 minutos añadiendo 0.25 mL de ácido acético al 30% y se leyó la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro. La actividad específica de la tripsina se obtuvo de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{(Abs_{410nm} / \text{min}) * 1000 * \text{mlRx}}{8800 * \text{mg Proteína}} \text{----- Ecuación 6}$$

donde, 8800 es el coeficiente de extinción de la p-nitroanilida. Las unidades de actividad se definen como la unidad de actividad que cataliza la hidrólisis de un μmol de BAPNA a 25°C y $\text{pH} = 7.8$.

Determinación de la concentración de la proteína. En la etapa de extracción y purificación de la enzima tripsina se determinó la concentración de la proteína mediante el método de Bradford (1976). Utilizando una curva estándar con seroalbumina de bovino (1mg/mL y 0.1 mg/mL). Leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS modelo Lambda 2S.

Elaboración de la Masa

Se tomaron 100 gramos de harina al cual se le adicionó la cantidad de agua requerida para obtener el desarrollo del gluten (parámetro obtenido del farinógrafo). En esta agua se diluyó la dosis de enzima obtenida a partir de la actividad específica calculada, utilizando el sustrato sintético BAPNA, la dosis aplicada fue de acuerdo al diseño de experimento (Tabla 5), posteriormente se mezcló en una mezcladora Kitchen Aid (St. Joseph, Michigan, USA) durante

1.40 minutos según el tiempo de desarrollo (parámetro obtenido del farinógrafo).

Análisis de Gliadinas y Gluteninas por RP-HPLC

Una vez obtenida la masa se tomaron 250 mg a diferente tiempo de reacción (0, 30, 90 y 120 min) para extraer las gliadinas y gluteninas para su análisis por RP- HPLC y electroforesis.

Gliadinas

Extracción de la proteína. Se partió de 250 mg de masa, se le agregó 0.25 mL de ácido acético para detener la reacción y posteriormente se siguió la metodología descrita por Bietz y col. (1984). Se le agregó 1 mL de una solución de etanol/agua al 70% se agitó con vortex por 30 min y posteriormente se llevó a cabo una centrifugación por 25 min a 15,000 x g. y posteriormente se analizó por RP-HPLC .

Separación de las fracciones de gliadinas mediante RP-HPLC. Para la separación de proteínas en RP-HPLC se utilizó una columna ZORBAX 300SB-CN, tamaño de poro de 300 Angstrom, 4.6 mm de diámetro, 150 mm de longitud y un tamaño de partícula de 5 μm (marca Agilent).

Se utilizó un gradiente en pasos y una fase móvil de acetonitrilo (ACN) y agua con 0.1% de ácido trifluoracético (TFA) cada uno. En la tabla 3, se presenta el programa del gradiente y la fase móvil utilizada en cada paso, el solvente A consistió en ACN, el solvente B en ACN con 0.1% de TFA y el solvente C agua con 0.1 % de TFA, el volumen de inyección fue de 10 μ L y el flujo de 0.5 mL/min a 65 °C por 71 min, el gradiente inició con 25% B, aumentando a 33% B por 10 min, después a 40% B por 10 min, después 50% de B por 40 min, manteniendo la misma concentración por 8 min mas; por último se realizó un lavado por 3 min con 100% A y después se tomaron las condiciones iniciales; el tiempo de equilibrio entre inyecciones fue de 10 min y la lectura a 210 nm (Bañuelos 2003). Se utilizó un programa Varian Star, versión 5.5, para la integración de los picos y se obtuvo como resultado las areas de los picos en Unidades de Absorbancia (UA).

Gluteninas

Extracción de la proteína. Se partió de 250 mg de masa, se le agregó la concentración de enzima de la forma antes mencionada. Después se siguió la metodología de Bean y col. (1998) con algunas modificaciones, se le agregaron 950 μ L de 1-propanol al 50% y 50 μ L de 2-mercaptoetanol y se agitó con vortex por 1 h y se centrifugó por 15 min a 15, 000 x g antes de su análisis por RP-HPLC.

Tabla 3. Programa de gradiente¹ de la fase móvil para gliadinas

Tiempo (min)	ACN (%A)	ACN+ 0.1% TFA (%B)	Agua + 0.1% TFA (%C)
Inicial	0	25	75
10	0	33	67
20	0	40	60
60	0	50	50
68	0	50	50
69	100	0	0
71	100	0	0

¹ Gradiente modificado ligeramente del reportado por Bañuelos (2003)

Separación de las fracciones de gluteninas mediante RP-HPLC. El equipo, la columna y las fases móviles fueron las mismas que se utilizaron para el análisis de gliadinas.

El gradiente en pasos inició con 23% B aumentando a 33% B por 5 min, después a 43% B por 30 min, posteriormente 55% B en 1 min y siguió aumentando hasta 58% B en 14 min manteniendo la misma concentración por 2 min mas; por ultimo se lavó con 100% de A por 3 min y después se regresó a las condiciones iniciales (Tabla 4). El tiempo de equilibrio entre inyecciones fue de 10 min, la temperatura 50°C, el volumen de inyección fue de 10 μ L y la lectura fue a 210 nm (Bañuelos 2003). Se utilizó un programa Varian Star, versión 5.5, para la integración de los picos y se obtuvo como resultado las areas de los picos en Unidades de Absorbancia (UA).

Ecuaciones Utilizadas Para el Cálculo del Grado de Modificación y el Comportamiento Cinético de las Proteínas del Gluten de Trigo.

Índice de Degradación Proteolítica (IDP)

Midiendo la diferencia entre las areas del pico en unidades de absorbancia (UA) (concentración relativa (Wieser 2000)) de la proteína sin enzima al tiempo t y la de la proteína con enzima al mismo tiempo, fue posible

Tabla 4. Programa de gradiente¹ de la fase móvil para gluteninas.

Tiempo (min)	ACN (%A)	ACN+ 0.1% TFA (%B)	Agua + 0.1% TFA (%C)
Inicial	0	23	77
5	0	33	67
35	0	43	57
36	0	55	45
50	0	58	42
52	0	58	42
53	100	0	0
55	100	0	0

¹Gradiente modificado ligeramente del reportado por Bañuelos (2003)

determinar el grado de modificación de dicha proteína durante la reacción enzimática.

Para cuantificar el grado de modificación se obtuvo un índice de degradación proteolítica (IDP), el cual se expresó como la proporción (%) de la proteína que ha sido modificada por la enzima en base al total de proteína que no lo ha sido en el mismo tiempo de la reacción; la ecuación fue basada en las fórmulas anteriormente mencionadas (Nielsen y col., 2001; Mimouni y col., 1999; Manual del fabricante Chopin, 2001; Gutiérrez, 2006).

La ecuación se expresa de la siguiente manera:

$$IDP = \frac{Ase_{t=n} - Ace_{t=n}}{Ase_{t=n}} \times 100 \text{-----Ecuación 7}$$

IDP= Índice de Degradación Proteolítica.

Ase= Área del tratamiento control (sin enzima)

Ace= Área del tratamiento con enzima

t= Tiempo de reacción enzima-sustrato

n= Puede ser 0, 30, 90 y 120 min

Obtención del Grado de Agregación

En el análisis de gliadinas, las áreas de los picos obtenidos de cada fracción extraída de la masa tratada con enzima, fueron ligeramente mayores al

control, lo que significa que los productos de la reacción, por la enzima tipo tripsina extraída de vísceras de sierra en proteínas, interaccionaron y formaron agregados con gliadinas.

La ecuación empleada para determinar el grado de agregación para gliadinas, fue basada en la de Qin Wang y Kulozik, (2006).

$$GA = \left(1 - \frac{Ace_{t=n}}{Ase_{t=n}} \right) * 100 \text{ -----Ecuación 8}$$

GA= Grado de agregación

Ace= Área del tratamiento con enzima

Ase= Área del tratamiento control (sin enzima)

t= Tiempo de reacción enzima-sustrato

n= Puede ser 0, 30, 90 y 120 min

Comportamiento Cinético

La diferencia entre las áreas de los picos de absorción (UA), del tratamiento sin enzima y con enzima, al mismo tiempo de reacción, indica la concentración de sustrato que ha sido modificado por la enzima, y mediante estos valores, se obtuvo el comportamiento cinético de las proteínas con respecto al tiempo de reacción.

La fórmula que se empleó fue la siguiente:

$$Cs = Ase_{t=n} - Ace_{t=n} \text{-----Ecuación 9}$$

Donde:

Cs= Concentración de sustrato

Ase= Área del tratamiento sin enzima

Ace= Área del tratamiento con enzima

t= Tiempo de reacción enzima-sustrato

n= Puede ser 0, 30, 90 y 120 min

Diseño del Experimento y Análisis Estadístico

En la Tabla 5 se muestra el diseño experimental, que consiste de un diseño factorial de dos factores completamente al azar, los factores fueron la dosis de enzima y el tiempo de reacción. Los niveles para la dosis de enzima fueron 0.14 y 0.28 U y para el tiempo fueron 0, 30, 90 y 120 minutos.

La unidad experimental fue la masa que se elaboró mezclando harina, agua y la enzima diluida en el agua cuando el diseño así lo requirió y según lo explicado en el apartado de elaboración de la masa.

Las variables respuestas fueron:

- a) La concentración en unidades de absorbancia (UA) correspondiente al área de los picos de cada una de las subfracciones de las gliadinas y gluteninas.

Tabla 5. Diseño experimental para el análisis de las gliadinas y gluteninas por RP-HPLC.

Tiempos	ENZIMA		
	D ₀	D ₁	D ₂
t ₁	D ₀ t ₁	D ₁ t ₁	D ₂ t ₁
t ₂	D ₀ t ₂	D ₁ t ₂	D ₂ t ₂
t ₃	D ₀ t ₃	D ₁ t ₃	D ₂ t ₃
t ₄	D ₀ t ₄	D ₁ t ₄	D ₂ t ₄

Donde D es la Dosis de enzima, D₀: 0 U (control), D₁: 0.14 U y D₂: 0.28 U, t es el tiempo de la reacción enzima-sustrato t₁: 0, t₂: 30, t₃: 90 y t₄: 120 min.

b) El índice de degradación proteolítica o de agregación de las fracciones de las proteínas del gluten, calculados por las ecuación 7 y 8 , respectivamente.

Los datos que se obtuvieron se analizaron aplicando un análisis de varianza (ANDEVA), una comparación de medias por la prueba de contrastes, para establecer diferencias entre los tratamientos. Los analisis se realizaron utilizando el paquete estadístico JMP 5.1 con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Químico de la Harina de Trigo Cristalino

En la Tabla 6 se muestran los resultados del análisis químico y del farinógrafo de la harina utilizada de trigo cristalino variedad Rafi. El contenido de proteína de la harina en estudio fue de 11% y el contenido de humedad de 13.25%, estos resultados fueron similares a los reportados por Bañuelos 2003 para la misma variedad. La composición de proteína y humedad del trigo, varía ampliamente en cantidad y depende de la variedad y del medio ambiente en el que se desarrolla la planta (Feillet, 1988). Conocer el contenido de humedad y de proteína de la harina fue necesario para realizar el análisis reológico (farinógrafo) y así obtener los parámetros para la elaboración de la masa.

El tiempo de desarrollo fue de 2.4 min, este indica el tiempo en que tarda la masa en alcanzar la máxima consistencia, este parámetro reológico es importante para la preparación de masas, ya que proporciona el tiempo que se deberá mezclar la harina con los ingredientes para la elaboración de masas para panificación, en este estudio solo fue agua más harina, al comparar el valor obtenido en este estudio con el de Gutiérrez (2006), es la mitad, sin embargo, es similar a lo encontrado por Cabrera (2006) (3 min para variedad Júpare) y Bañuelos (2003) (3.5 min para variedad Rafi).

Tabla 6. Composición química y parámetros farinográficos de la harina de trigo variedad Rafi.

Composición/Parámetro	Trigo Rafi
Contenido de humedad (%)	13.25
Contenido de proteína (%)	11.00
Tiempo de llegada (min)	1.40
Tiempo de salida (min)	3.40
Tiempo de desarrollo (min)	2.40
Absorción de agua (%)	63.50

El valor de absorción de agua obtenido mediante el farinógrafo fue de 63.5 %, esto indica la cantidad de agua que se deberá agregar a la harina para alcanzar una consistencia de 500 Unidades Branbender, el valor obtenido en este estudio es similar al reportado por Gutierrez (2006), quien utilizó un trigo cristalino de variedad Júpare.

Purificación de la Enzima Tripsina de Vísceras de Sierra.

En la Figura 3, se puede observar el cromatograma de purificación de la enzima, obtenido después de pasar la fracción 4 (F4) por la columna de afinidad (conteniendo como ligando un inhibidor de tripsina de soya), se puede apreciar que en las primeras 10 alícuotas aparece la proteína que no se unió a la columna, en estas alícuotas, la actividad específica obtenida fue muy baja, debido a la alta concentración de proteína. Las alícuotas de 20 a 30 se observa la mayor absorbancia a 410 nm, lo que indica que hay mayor liberación de producto, al poner la enzima en contacto con el sustrato sintético BAPNA. Las alícuotas donde se obtuvo la mayor actividad específica se recolectaron y se le denominó F5.

En estudios previos a este, se confirmó que el extracto obtenido después de la cromatografía de afinidad (F5), presentó características tipo tripsina ya que usando inhibidores específicos como el inhibidor de tripsina de soya (SBTI)

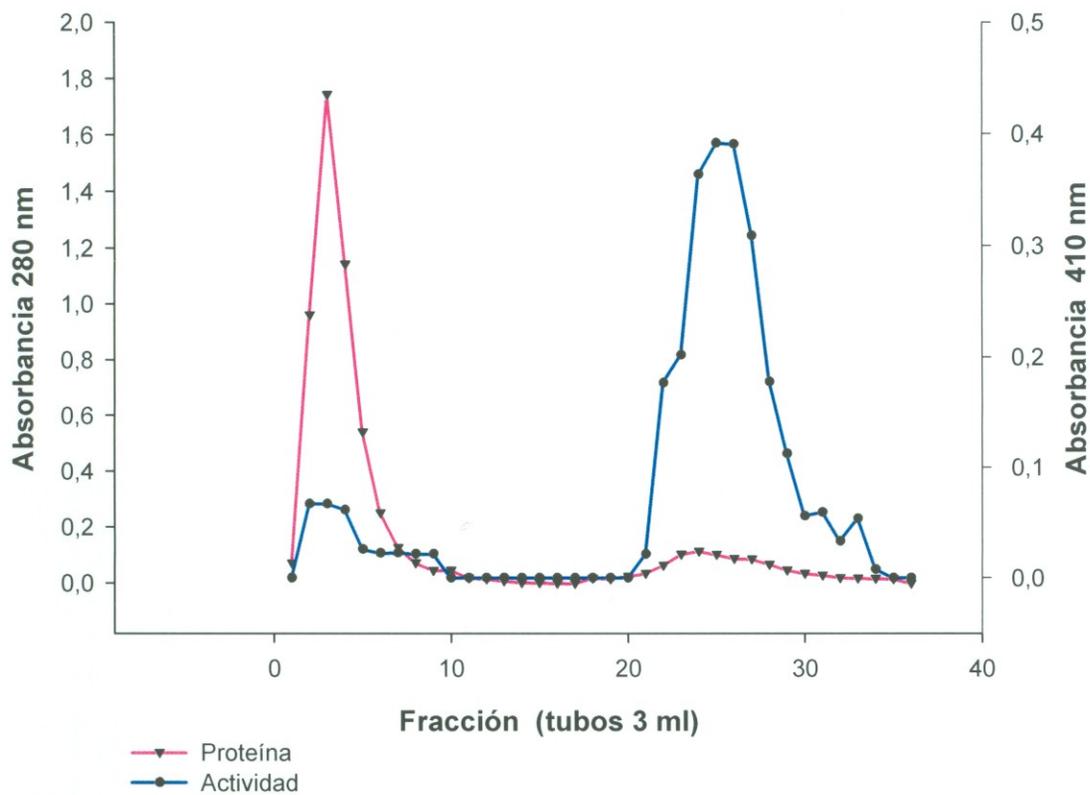


Figura 3. Cromatograma de purificación de la tripsina de visceras de sierra (*Scomberomorus sierra*)

y tosil-lisina-clorometil cetona (TLCK) mostraron un porcentaje de inhibición del 97% y 86% respectivamente (Olivas, 2001).

Los resultados de las etapas de purificación se muestran en la Tabla 7, donde se puede apreciar que la actividad específica más alta (2.12 U/mg) se obtuvo después de la etapa de cromatografía de afinidad (F5), lo cual era esperado; ya que esta técnica es ampliamente recomendada para este tipo de separación (Tejeda y col., 1995).

El valor obtenido, concuerda con lo encontrado por Cabrera (2005), quien utilizó la misma especie (*Scomberomorus sierra*); sin embargo, es menor al reportado por Gutiérrez (2006), a pesar de que se utilizó la misma especie. Se sabe que dependiendo de la talla, época o incluso del año de captura, algunas características fisiológicas de los organismos pueden variar ligeramente (Haard, 1992; Pérez y Ruíz, 1985).

Es importante recordar que la actividad obtenida es usando un sustrato sintético BAPNA, y de acuerdo a esta actividad, se realizaron los cálculos, para agregar las dosis de enzima de 0.14 y 0.28 U de actividad a las masas.

Se logró una purificación de 166.92 veces, tomando como referencia el extracto crudo, este valor es superior a lo encontrado por Cabrera 2005 y Gutiérrez 2006, quienes reportan valores de 52.08 y 51.18 respectivamente, para tripsinas extraídas de la misma especie.

Se obtuvo un rendimiento de 43%, y representa el doble de lo obtenido por Gutiérrez (2006), y más de la mitad de lo encontrado por Olivas (2001),

Tabla 7. Purificación de la enzima tripsina de vísceras de sierra (*Scomberomorus sierra*).

Etapa	Volumen total (mL)	Proteína (mg)	Proteína (mg/mL)	Actividad (U)	Actividad		
					específica (U / mg de proteína)	Rendimiento (%)	Purificación (Veces)
Extracto crudo (F1)	48	403.20	8.40	5.12	0.01	100	1.00
Sol. Brij (F2)	45	318.70	7.08	5.10	0.01	99	1.25
Sulfato de amonio (30-60%) (F3)	25	127.50	5.10	3.23	0.02	63	2.00
Diálisis (F4)	23	28.29	1.23	3.13	0.11	61	8.72
Cromatografía (F5)	48	1.05	0.02	2.23	2.12	43	166.92

* Una unidad cataliza la hidrólisis de un μmol de BAPNA a 25°C, pH de 7.8

quien extrajo la enzima de lisa (*Mugil cephalus*). Sin embargo, es igual o semejante a los obtenidos por Simpson y Haard (1984) y Kristjansson (1991), quienes reportan valores de 46.6 para bacalao y 48.7% para Trucha arcoiris, respectivamente.

Identificación de las Fracciones de las Proteínas del Gluten Modificadas

Mediante los Cromatogramas Obtenidos por RP-HPLC

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución de tipo fase inversa (RP-HPLC) separa a las proteínas debido a su hidrofobicidad molecular (Shewry y Lookhart, 2003; Skoog, 2001) por lo que se consideró útil para identificar aquellas fracciones y subfracciones de las proteínas del gluten que fueron modificadas por la enzima tipo tripsina (ETT) extraída del tracto digestivo de sierra. Los resultados fueron los siguientes:

Gluteninas

En las Figuras 4, 5, 6 y 7 se presentan los cromatogramas correspondientes a diferentes tiempos de reacción y con diferentes dosis de enzima. Aquí se observa que las gluteninas de APM, presentan menor afinidad por la columna que las gluteninas de BPM, debido a que el tiempo de retención es menor, además se puede observar que son varios picos los que

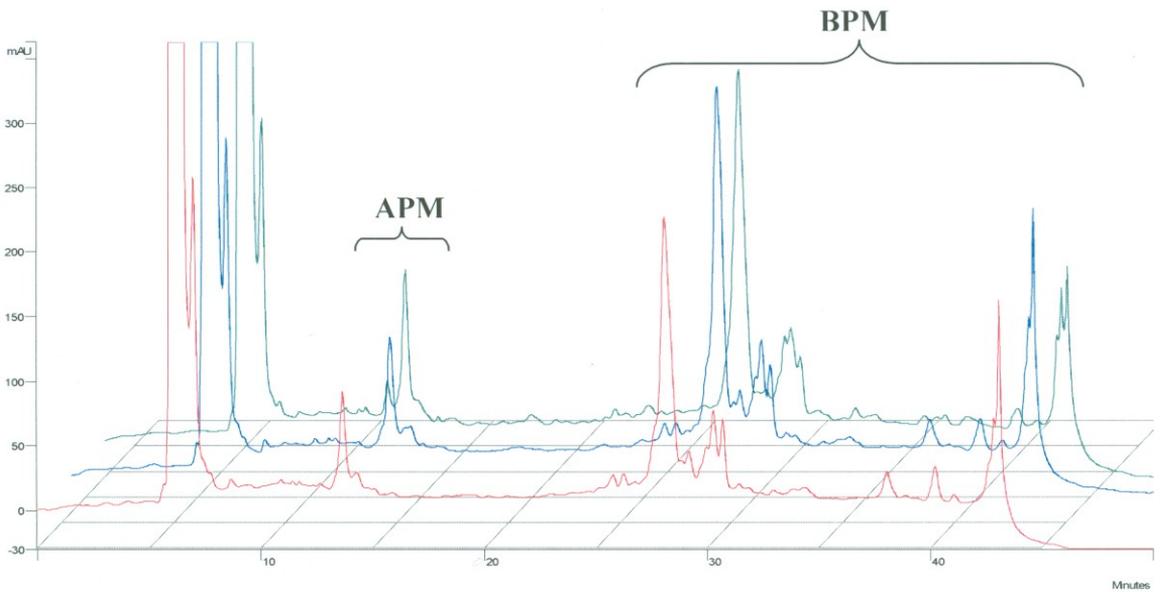


Figura 4. Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 0 min de reacción enzima-sustrato.

- 0 Dosis de enzima
- Dosis de enzima de 0.14 U
- Dosis de enzima de 0.28 U

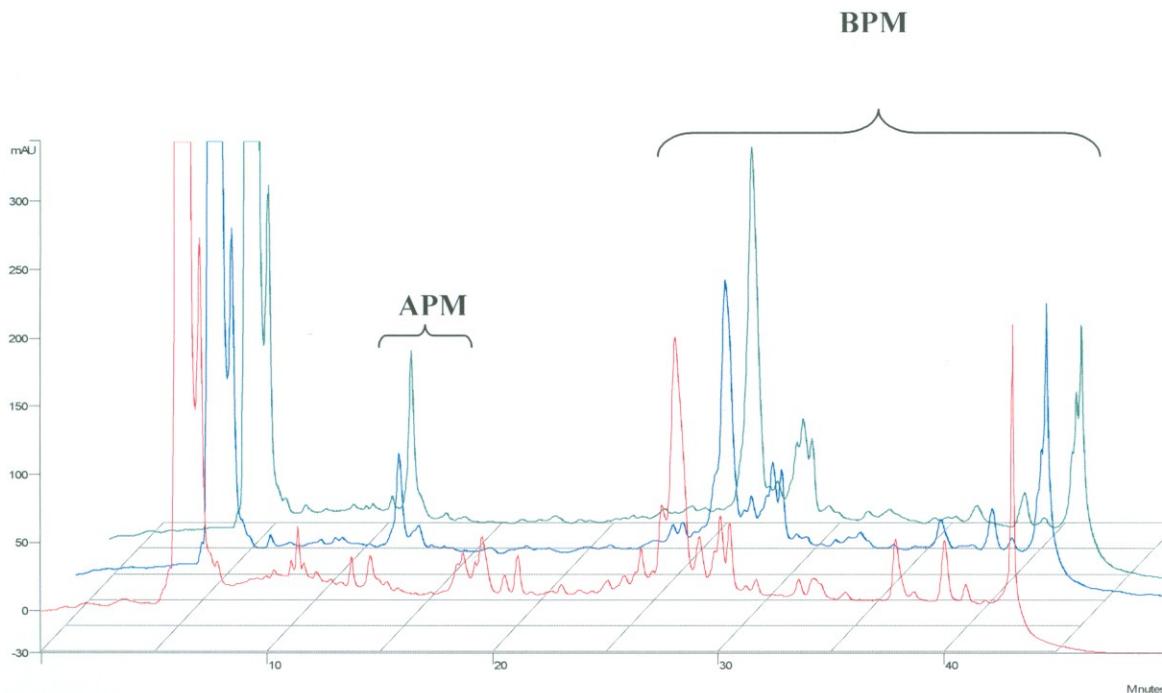


Figura 5. Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 30 min de reacción enzima-sustrato.

- 0 Dosis de enzima
- Dosis de enzima de 0.14 U
- Dosis de enzima de 0.28 U

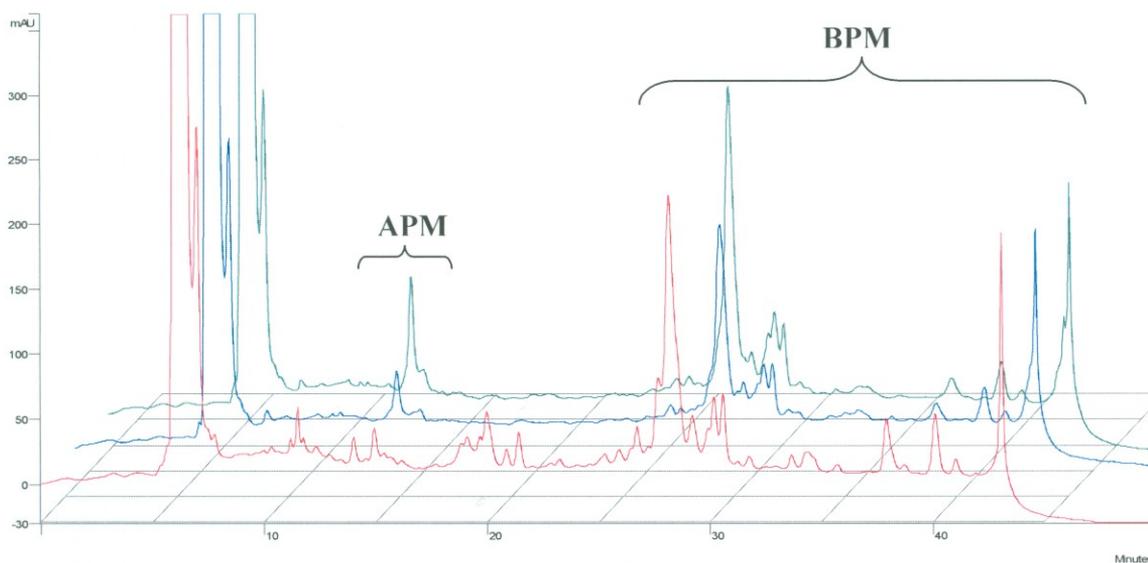


Figura 6. Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 90 min de reacción enzima-sustrato.

- 0 Dosis de enzima
- Dosis de enzima de 0.14 U
- Dosis de enzima de 0.28 U

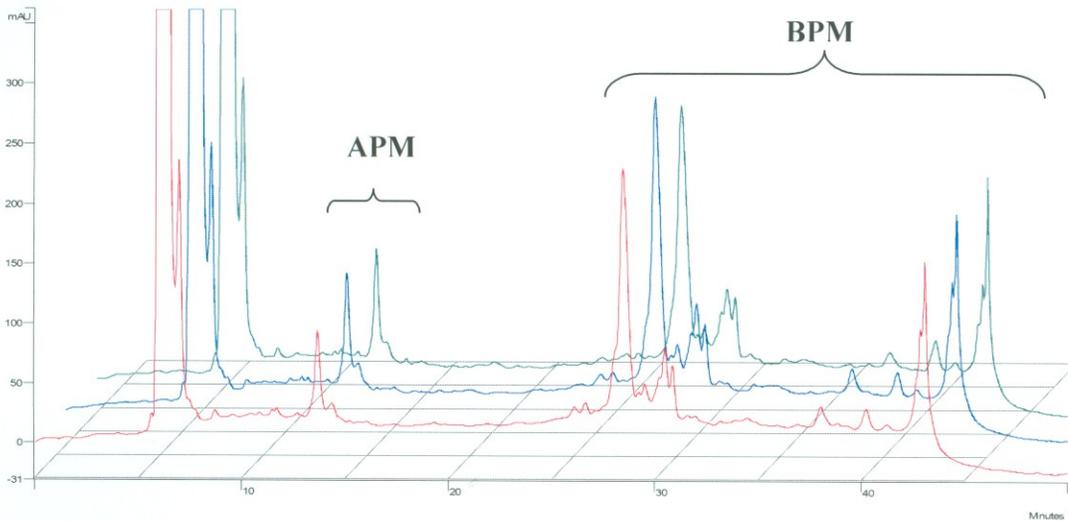


Figura 7. Comparación de las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular aplicando diferentes dosis de enzima a los 120 min de reacción enzima-sustrato.

- 0 Dosis de enzima
- Dosis de enzima de 0.14 U
- Dosis de enzima de 0.28 U

corresponden a las gluteninas de BPM esto era lo esperado ya que las proteínas de BPM representa mas del 60% del total de las gluteninas.

Además se puede observar que sin enzima, la región de las subunidades de APM muestra un solo pico (en los cromatogramas control, color verde), lo que puede tratarse de una sola subunidad de APM, ya que en el estudio de Bañuelos (2003), se encontró que el trigo de variedad Rafi tenía una sola subunidad identificada como la subunidad 20 , además se ha reportado que los trigos cristalinos presentan de 1 a 3 subunidades de APM (Anjum y col., 2007).

Al adicionarle la dosis de enzima de 0.14 y 0.28 U, este pico se presenta con un hombro o con un segundo pico solapado, indicando que esta subunidad ha sido modificada.

Comparando de manera visual los cromatogramas de las Figuras 4, 5, 6 y 7, se ve claramente que las subunidades de APM fueron modificadas por la enzima tipo tripsina cuando se le adicionó una dosis de 0.28 U de actividad, mostrando una reducción del área del pico correspondiente a esta subunidad, siendo más marcado a los 30 y 90 min de reacción enzima-sustrato. Contiguo a este pico, perteneciente a la subunidad 20, aparecen 6 picos más, los que pueden ser péptidos derivados de esta subunidad hidrolizada, que presentan las mismas características hidrofílicas, ya que se presentan en el mismo rango del tiempo de retención.

Transcurridos 120 min de reacción, el area bajo la curva de esta subunidad de APM incrementó ligeramente. Se puede atribuir este aumento, a

que los péptidos liberados de las gluteninas de BPM así como los péptidos que se muestran cerca de la subunidad 20, a los 30 y 90 min de reacción, pudieron haber sido involucrados y formar nuevamente un péptido con el mismo comportamiento cromatográfico. Hay evidencia de que durante el mezclado, las subunidades de APM son disminuídas y durante el reposo se ha visto que hay una agregación de este tipo de proteína (Sluimer, 2005), por lo que a los 120 min, hubo, aparentemente, una agregación de proteína, mientras que a los 30 y 90 min hubo una disminución de las proteínas, por efecto de la hidrólisis con la ETT de visceras de sierra .

En las proteínas de BPM se puede observar que hay un incremento de dos picos, a los 30 y 90 min de reacción, así como disminución de otros picos pertenecientes a las subunidades de gluteninas de BPM.

Gliadinas

En la Figura 8, se pueden observar los cromatogramas obtenidos de las gliadinas, con diferentes concentraciones de ETT, señalándose las regiones correspondientes a cada subclase de gliadina. Las diferentes subclases aparecen en el siguiente orden de elución: ω , $\alpha+\beta$ y γ - gliadinas de acuerdo con Burnouf y Bietz (1985) y Bañuelos (2003). Las ultimas presentan mayor afinidad a la matriz de la columna que las omega gliadinas, debido al principio

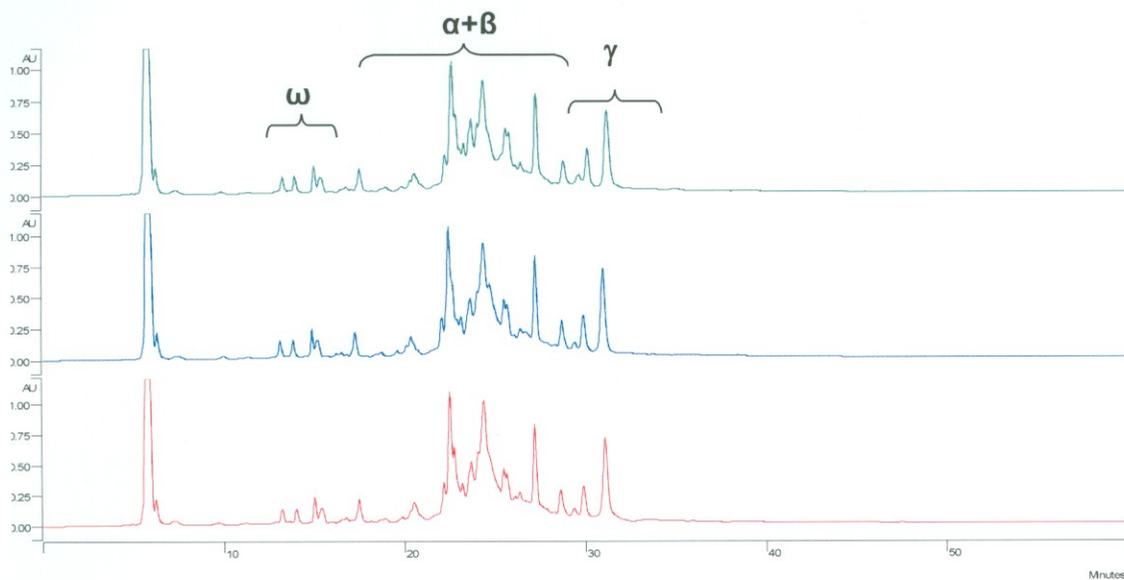


Figura 8. Comparación de las diferentes tipos de gliadinas (ω , $\alpha+\beta$ y γ - gliadinas), aplicando diferentes dosis de enzima.

- 0 Dosis de enzima
- Dosis de enzima de 0.14 U
- Dosis de enzima de 0.28 U

de la técnica empleada. No se observó un efecto de las dosis de enzima y tampoco en el tiempo de reacción.

Grado de Modificación de las Proteínas del Gluten de Trigo

Gluteninas

Para cuantificar el grado de modificación de las gluteninas, se obtuvo un índice de degradación proteolítica (IDP), el cual se expresó como la proporción (%) de la proteína que ha sido modificada por la ETT en base al total de proteína que no lo ha sido en el mismo tiempo de la reacción, el cálculo se realizó de acuerdo a la ecuación número 7.

En la Figura 9 y 10, se muestra el índice de degradación proteolítica de las gluteninas debido al efecto de las dosis de enzima de 0.14 y 0.28 U. Las gluteninas de APM con la dosis de enzima de 0.28 U presentaron valores que superan el doble del obtenido con 0.14 U en cada tiempo de muestreo (Figura 9). En otros estudios, se ha visto que cuando se le agrega una dosis mayor de enzima, hay un aumento en la modificación de las proteínas del gluten, uno de estos trabajos, es el de Valdez, 2007 donde midió IDP utilizando la técnica del alveógrafo, empleando 2 variedades de trigo panadero y 2 concentraciones de enzima tripsina de vísceras de sierra (0.14 y 0.28 U), en este trabajo se observó que cuando se le aplica una dosis mayor, el IDP aumenta en ambas

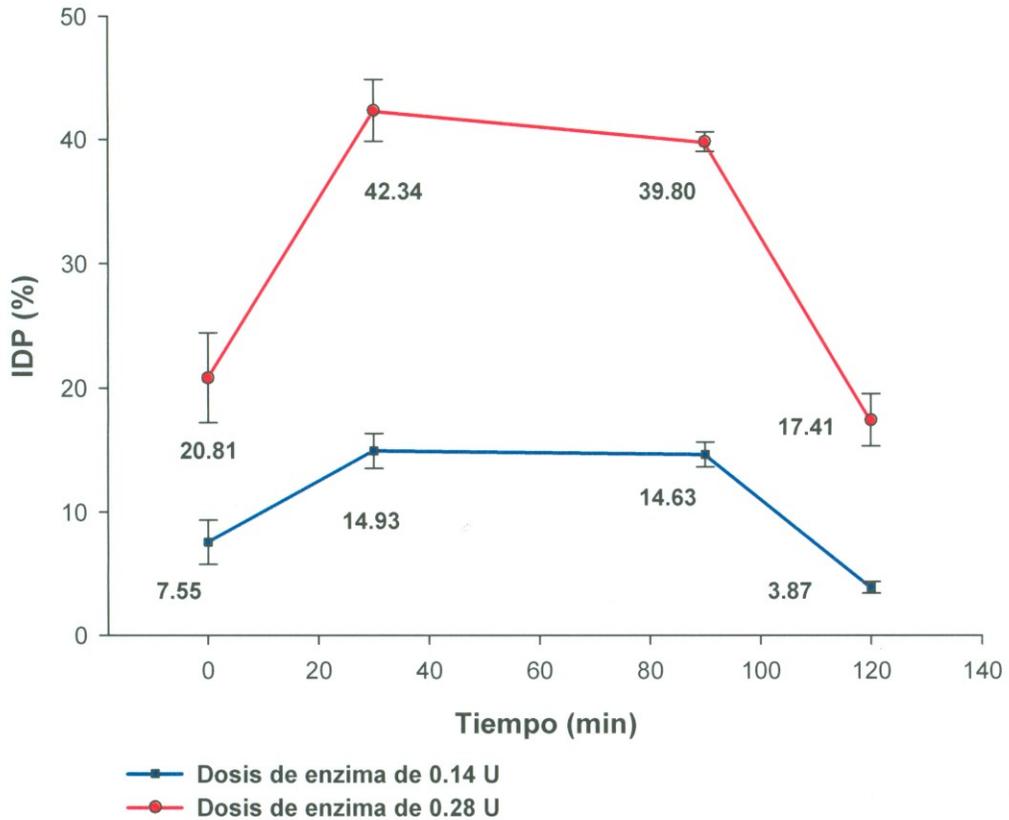


Figura 9. Índice de Degradación Proteolítica (IDP) de las subunidades de gluteninas de Alto Peso Molecular (APM), aplicando diferentes dosis de enzima.

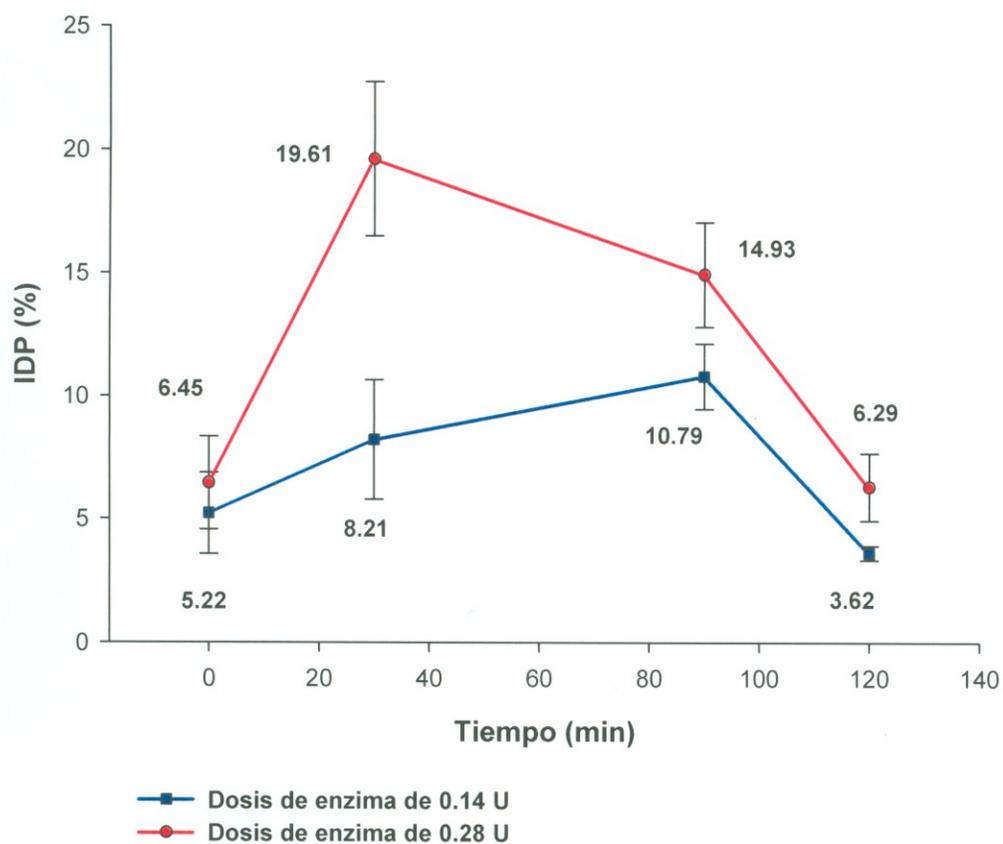


Figura 10. Índice de Degradación Proteolítica (IDP) de las subunidades de gluteninas de Bajo Peso Molecular (BPM), aplicando diferentes dosis de enzima.

variedades, esto concuerda con el resultado obtenido aquí, mediante RP-HPLC. Al analizar el efecto del tiempo de la reacción, sobre el IDP de las gluteninas de APM, por cada dosis de enzima empleada, se puede observar en la Figura 8, que a los tiempos de 30 y 90 min fue diferente significativamente ($P < 0.05$) para la concentración de 0.14 como para 0.28 U, mostrando un índice de 14.93 (30 min) y 14.63 (90 min), para 0.14 U y 42.34 (30 min) y 39.80 (90 min), cuando se le aplica una dosis de enzima de 0.28 U. Esto indica que la acción de la enzima para hidrolizar las subunidades de gluteninas de APM se da en los primeros tiempos de reacción, estos resultados concuerdan con lo reportado por Kong y col., (2007) quienes emplearon proteasas y una de ellas la tripsina fue empleada para hidrolizar el gluten, en este estudio encontraron que la mayor liberación de péptidos se da en los primeros 30 min de reacción.

Al analizar el efecto de las concentraciones de enzima empleada, en las subunidades de gluteninas de BPM (Figura 10), se puede ver que al igual que las subunidades de APM, muestra diferencias significativas ($P < 0.05$), entre las dosis empleadas, excepto en el primer tiempo de reacción. Además en esta misma figura, se puede observar el efecto que tiene el tiempo de reacción, sobre el IDP, en cada una de la dosis de enzima empleada. Cuando se le adiciona 0.28 U a la masa, el índice es mayor a los 30 y 90 min de reacción, mientras que cuando se le agrega 0.14 U de actividad de la enzima tipo tripsina, se observa que hay diferencias significativas entre el tiempo 90 min con

respecto a 0 y 120 min de reacción enzima sustrato, mostrando un valor de 10.79% a los 90 min y 5.22 y 3.62% para 0 y 120 min respectivamente.

Los valores bajos de IDP para esta subunidad son similares a los reportados por Kong y col., (2007), quienes emplearon una enzima comercial y obtuvieron valores alrededor del 5% de hidrólisis. Se sabe que la capacidad hidrolítica de las enzimas dependen de muchos factores, principalmente de su origen y de la disponibilidad de los aminoácidos específicos del sustrato (Nightingale y col., 1999; Lundstedt y col., 2004 y Rathore y col., 2005).

Gliadinas

En el análisis de gliadinas, las áreas de los picos obtenidos de cada fracción extraída de la masa tratada con enzima, fueron ligeramente mayores al control, lo que significa que los productos de la reacción adicionando ETT extraída de vísceras de sierra en las proteínas de la masa, pudieron haber participado y formar agregados.

La ecuación empleada para determinar el grado de agregación para gliadinas, fue basada en la de Qin Wang y col., (2006) (ecuación 8).

Al obtener los valores mediante esa ecuación se pudieron observar valores negativos y en algunos tiempos de reacción valores positivos, los negativos significan que el área del tratamiento con enzima es mayor que el área del tratamiento sin enzima, y significa aumento o formación de agregados

(Singh, 2005, Kasche, 1990), aunque en algunas fracciones de gliadinas como las gama, se obtuvieron números positivos cuando se le adiciona 0.28 U, a los 30 y 90 min de reacción, lo que significa que hubo una hidrólisis.

En la Figura 11, 12 y 13 se puede ver el efecto de la enzima en gliadinas, siendo las ω -gliadinas, las fracciones más afectadas. En la Figura 11 se puede observar un porcentaje muy alto (negativo), desde el tiempo 0 hasta los 120 min, al analizar el efecto de las concentraciones de enzima empleada, se observa que no hay diferencias significativas ($P > 0.05$), mientras que al analizar el efecto del tiempo, se puede ver que el grado de agregación es mayor a los 30, 90 y 120 min cuando se le adiciona 0.14 U, y a los 90 y 120 min cuando se le adicionan 0.28 U.

Se sabe que la tripsina puede actuar como una hidrolasa o como una transferasa, cuando actúa, como transferasa incorpora un aminoácido o péptidos, obteniendo así un aumento en el tamaño de la proteína. Los aminoácidos que favorecen esta unión son Asn, Glu, Lis, Arg, Tir, Val, Leu, Fen, Met, mientras cuando se da la reacción de hidrólisis, actúa en los aminoácidos de Lis y Arg (Kasche 1990).

De los aminoácidos antes mencionados para que se lleve a cabo la síntesis, glutamina y fenilalanina, son los que se encuentran en una cantidad considerable en las gliadinas, por lo que esto, puede ser una explicación a la agregación que se presentó en las fracciones de gliadinas.

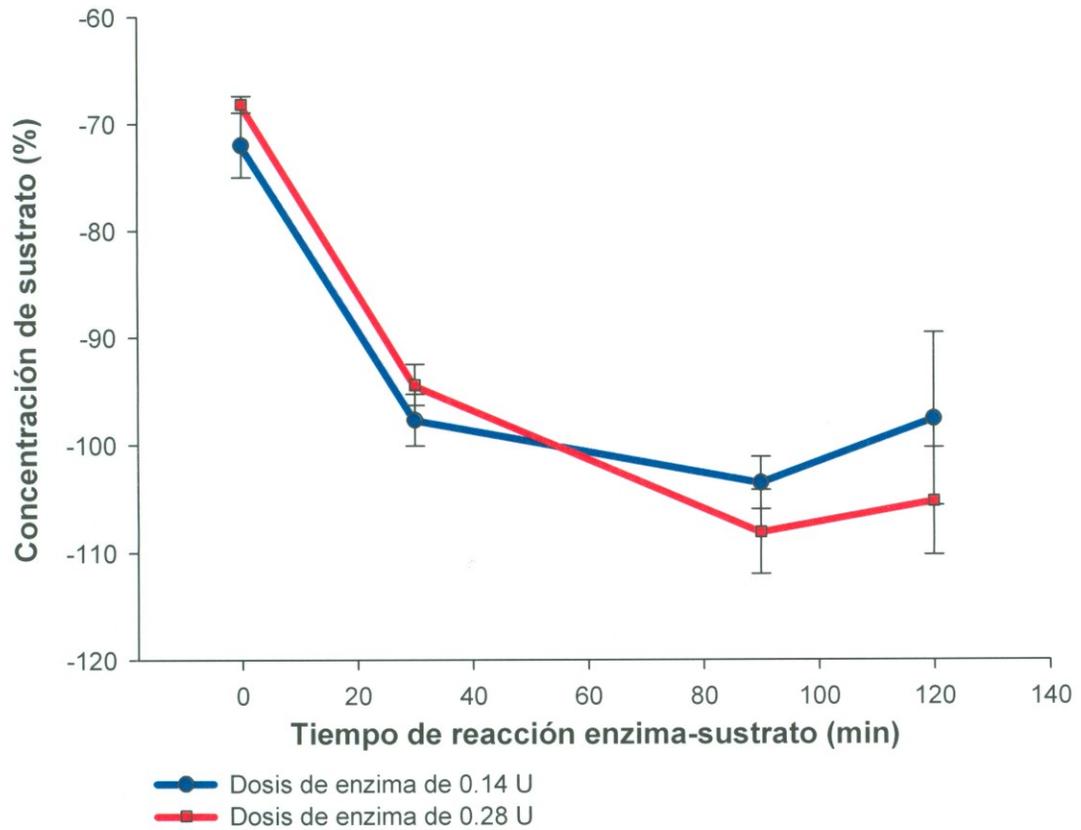


Figura 11. Grado de modificación de las ω -gliadinas, aplicando diferentes dosis de enzima.

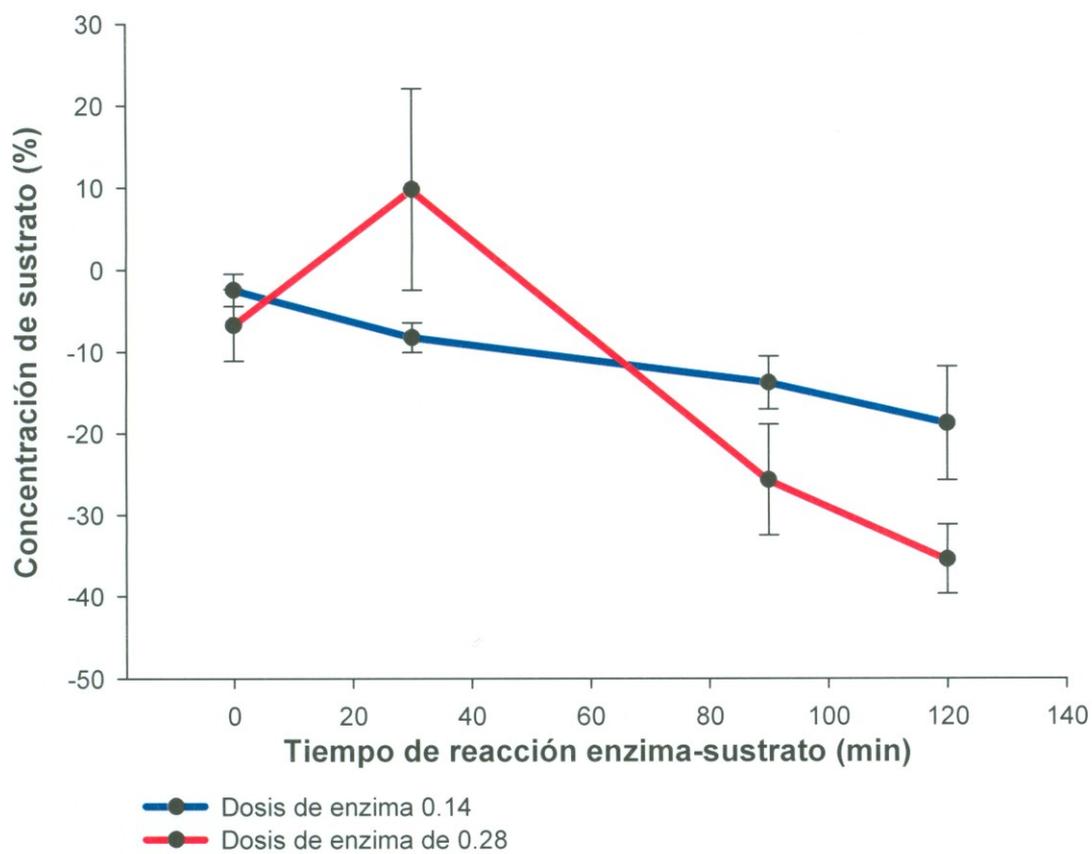


Figura 12. Grado de modificación de las $\alpha+\beta$ -gliadinas, aplicando diferentes dosis de enzima.

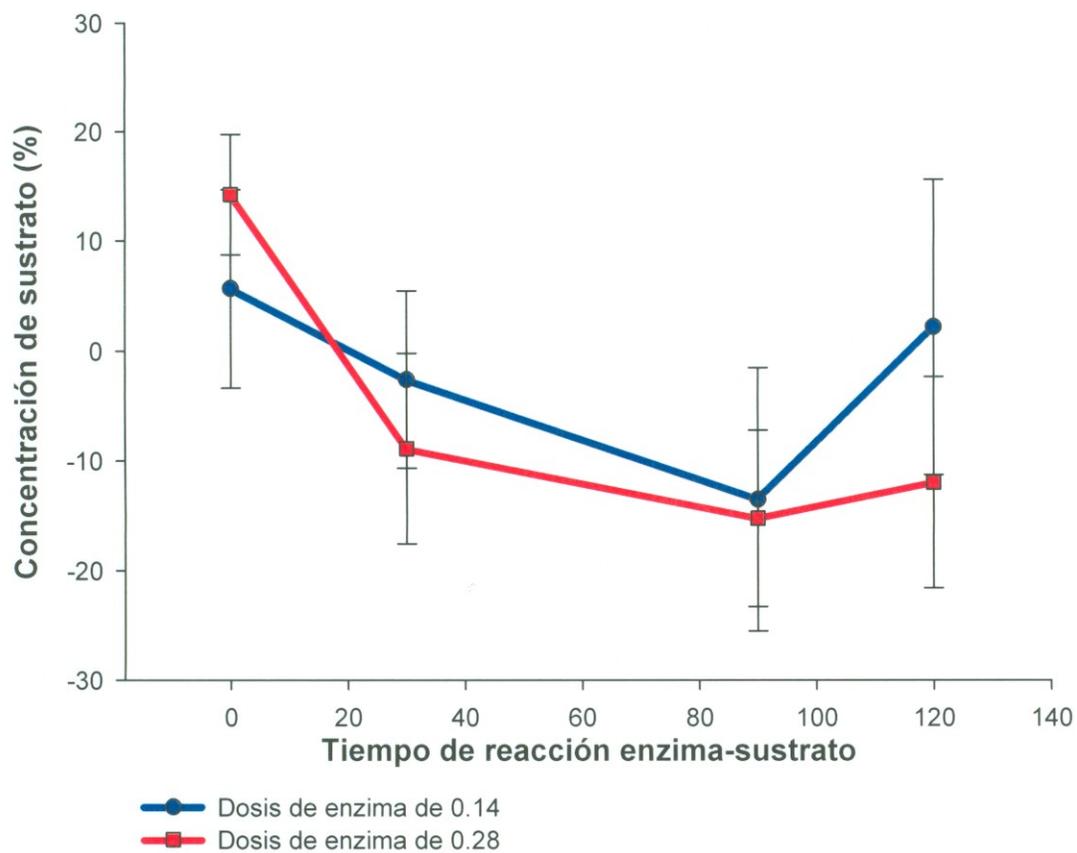


Figura 13. Grado de modificación de las γ -gliadinas, aplicando diferentes dosis de enzima.

En la Figura 12, se muestra el comportamiento de las $\alpha+\beta$ -gliadinas con la adición de las 2 concentraciones de enzima. Se puede ver que en el tiempo de 30 min el valor es positivo con una concentración de 0.28 U, lo que indica que hubo una hidrólisis, mientras en los demás tiempos se presentó una agregación ya que las áreas de estas proteínas aumentaron. Con una concentración de 0.14 el incremento de estas proteínas se dió conforme transcurrió el tiempo.

En las γ -gliadinas (Figura 13), no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$), entre las concentraciones aplicadas, mientras al analizar el efecto del tiempo sobre esta fracción de proteínas, por cada dosis de enzima empleada, solo se encontró que el tiempo 0 fue diferente a 30, 90 y 120 min, cuando se le aplicó una concentración de 0.28 U, mostrando un valor positivo, lo que significa que hubo una hidrólisis, el comportamiento fue diferente al dejar actuar la enzima por mas tiempo (agregación).

En general, podemos observar que la enzima actúo en mayor proporción como una hidrolasa en las gluteninas, sin embargo a los 120 min de reacción, el IDP disminuyó, en comparación a los primeros tiempos de reacción, este comportamiento, es debido a que se trata de una hidrólisis limitante, esto es por la poca cantidad de aminoácidos específicos para la catálisis de hidrólisis (Lis y Arg) lo que significa que el sustrato de la enzima, a ese tiempo, se agotó.

El grado de modificación en gliadinas se presentó como una agregación, y debido al antecedente que se tiene de que la enzima además de hidrolizar, se

puede comportar como una transferasa, en este estudio pudo haberse comportado así.

En el estudio de Cabrera, (2005) obtuvo un grado de hidrólisis mayor en gluteninas que en gliadinas, sin embargo, la diferencia de ese estudio, es que en el de Cabrera (2005) la enzima se puso en contacto con gliadinas y gluteninas aisladas, mientras en este estudio la enzima fue adicionada a la masa, y fue posible analizar por RP- HPLC el tipo de modificación (hidrólisis o agregación) que presenta cada una de las subfracciones de las gliadinas y gluteninas.

Comportamiento Cinético de las Gluteninas

La diferencia entre las áreas de los picos de absorción (UA), del tratamiento sin enzima y con enzima, al mismo tiempo de reacción (ecuación 9), indica la concentración de sustrato que ha sido modificado por la enzima, y mediante estos valores, se obtuvo el comportamiento cinético de las proteínas con respecto al tiempo de reacción.

El comportamiento cinético de las gluteninas de APM y BPM se muestran en la Figura 14 y 15 donde se puede observar que la cantidad de sustrato que ha sido modificado por la enzima, fue mayor en el tiempo 2 que corresponde a los 30 min de reacción, en ambas subunidades (APM y BPM) y en mayor proporción con la dosis empleada de 0.28 U esto era de esperarse, ya que al realizar los cálculos para obtener el IDP el comportamiento fue similar.

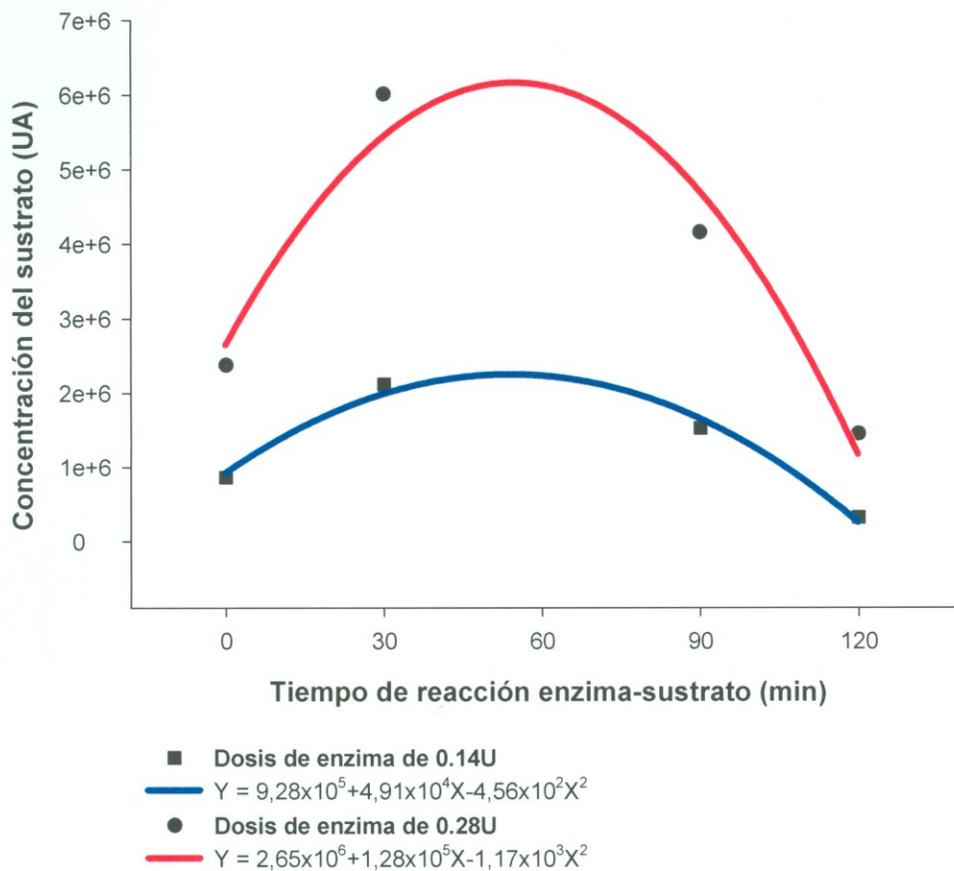


Figura 14. Comportamiento de las gluteninas de APM con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.

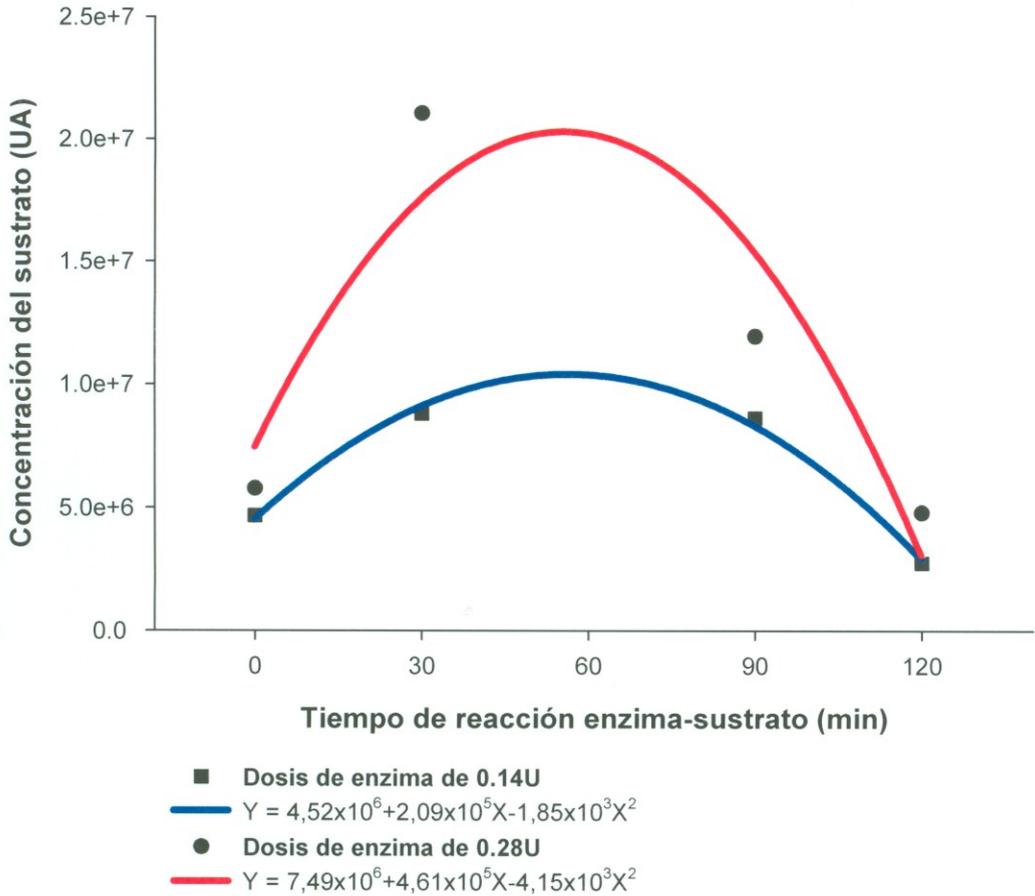


Figura 15. Comportamiento de las gluteninas de BPM con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.

De una manera general, la mayor concentración de sustrato (mayor diferencia en áreas mediante la ecuación 9) se llevó a cabo en gluteninas de BPM que en las de APM, esto indicaría que se está llevando una mayor hidrólisis en las de BPM, sin embargo esto no sucedió así al obtener el IDP, esto es debido a que a pesar de que las proteínas de BPM contienen 1 mol de lisina/mol de proteína (Pitts y col., 1988, Colot y col., 1989) éstas se encuentran en mayor proporción que las de APM, según D'Ovidio y Masci, (2004), representan acerca del 60% del total de las gluteninas.

Así mismo se puede observar en la Tabla 8 que el comportamiento cinético de las proteínas de APM, se ajusta a un modelo cuadrático, con una $R^2=0.97$, para la concentración 0.14 U, y con una $R^2=0.93$ cuando se le aplica 0.28 U de actividad de la enzima tripsina, mientras para las gluteninas de BPM se ajusta al mismo modelo, con una $R^2=0.99$ y 0.82 para 0.14 y 0.28 U respectivamente, la ecuación del modelo, pertenece a una parábola, mediante esta ecuación se puede calcular la concentración de sustrato modificado, a cualquier tiempo de reacción enzima-sustrato.

Comportamiento Cinético de Gliadinas.

El comportamiento cinético que presentaron las fracciones de gliadinas, se ajustó a un modelo cuadrático, en donde la ecuación y la R^2 para cada concentración de enzima empleada se presentan en la Tabla 9, el

Tabla 8. Modelo matemático de las subunidades de gluteninas

Fracción de gluteninas	0.14 U	0.28 U
Subunidades de gluteninas de APM	$Y = 9.28 \cdot 10^5 + 4.91 \cdot 10^4 X -$ $4.56 \cdot 10^2 X^2$ $R^2 = 0.97$	$Y = 2.65 \cdot 10^6 + 1.28 \cdot 10^5 X -$ $1.17 \cdot 10^3 X^2$ $R^2 = 0.93$
Subunidades de gluteninas de BPM	$Y = 4.52 \cdot 10^6 + 2.09 \cdot 10^5 X -$ $1.85 \cdot 10^3 X^2$ $R^2 = 0.99$	$Y = 7.49 \cdot 10^6 + 4.61 \cdot 10^5 X -$ $4.15 \cdot 10^3 X^2$ $R^2 = 0.82$

Tabla 9. Modelo matemático de las fracciones de gliadinas

Fracción de gliadinas	0.14 U	0.28 U
ω- gliadinas	$Y = -1.10 \cdot 10^8 -$	$Y = -1.03 \cdot 10^8 -$
	$6.05 \cdot 10^5 X + 4.12 \cdot 10^3 X^2$	$6.85 \cdot 10^5 X + 3.66 \cdot 10^3 X^2$
	$R^2 = 0.97$	$R^2 = 0.99$
α+β- gliadinas	$Y = -1.91 \cdot 10^7 -$	$Y = -2.06 \cdot 10^7 -$
	$1.76 \cdot 10^6 X - 2.97 \cdot 10^4 X^2$	$1.02 \cdot 10^6 X - 2.54 \cdot 10^3 X^2$
	$R^2 = 0.81$	$R^2 = 0.98$
γ- gliadinas	$Y = 1.06 \cdot 10^7 -$	$Y = 1,93 \cdot 10^7 -$
	$7.82 \cdot 10^5 X + 5.82 \cdot 10^3 X^2$	$1.08 \cdot 10^6 X + 6.79 \cdot 10^3 X^2$
	$R^2 = 0.87$	$R^2 = 0.95$

comportamiento se puede ver en las Figuras 16, 17 y 18.

En la Tabla 9 se puede observar que la fracción de gliadinas que mejor se ajusta son las ω - gliadinas, con ambas dosis de enzima (0.14 y 0.28 U), obteniendo una $R^2=0.97$ y 0.99 , respectivamente.

El comportamiento de las ω - gliadinas, como ya se mencionó tiende a una agregación con respecto al tiempo, es importante recordar que la enzima se adicionó en la formación de la masa, y esta pudiera estar hidrolizando otras proteínas presentes en este medio acuoso (masa).

De las proteínas presentes en la masa, se encuentran las albúminas y globulinas, se sabe que las primeras tienen 3.2 y 5.1 g de lisina y arginina respectivamente por 16 g de N, y para globulinas 5.9 lisina y 8.3 g/16 g de N de arginina, el nivel de estos aminoácidos, es alto comparado con lo que se encuentra en gliadinas y gluteninas (Tabla 2) (Atwell, 2001), como ya se mencionó anteriormente la acción de la enzima para hidrolizar, es sobre estos aminoácidos, lo que significa una mayor hidrólisis o liberación de péptidos, disponibles para llevarse a cabo una agregación en gliadinas.

Además se sabe que la secuencia del N- terminal para las omega gliadinas es PQQPY (Prolina, glutamina, glutamina, prolina y tirosina) y el dominio del C- Terminal es PQQPFPQQ (prolina, glutamina, glutamina, prolina, fenilalanina, prolina, glutamina y glutamina) (Shewry y col., 1986; Dupont, 2000), como ya se señaló la glutamina es uno de los aminoácidos específicos, para que se lleve a cabo la reacción como transferasa y debido a esta información,

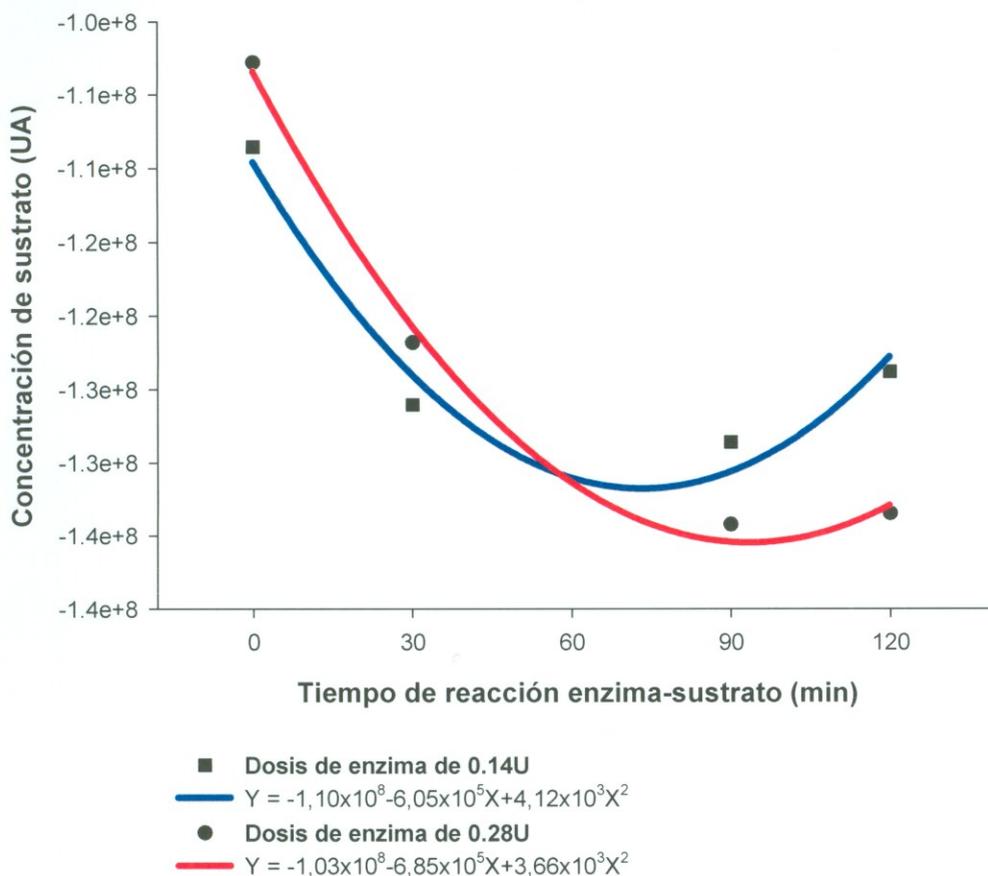


Figura 16. Comportamiento de las ω -gliadinas con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.

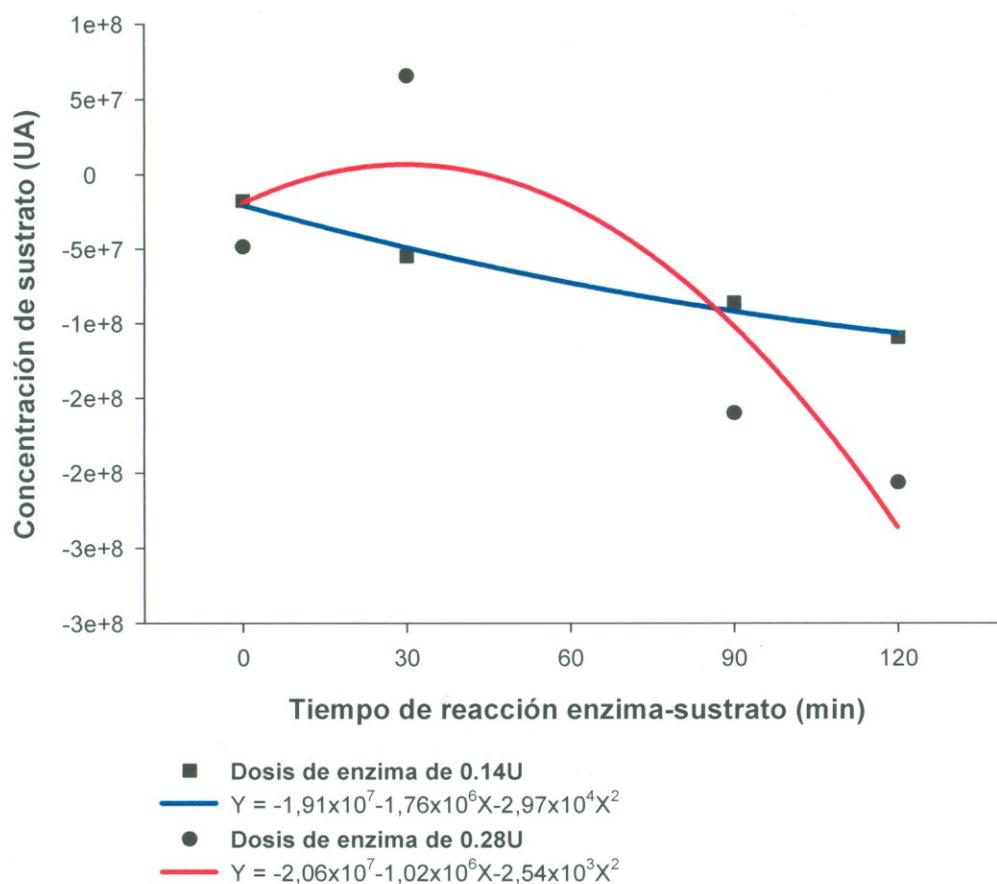


Figura 17. Comportamiento de las α + β -gliadinas con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.

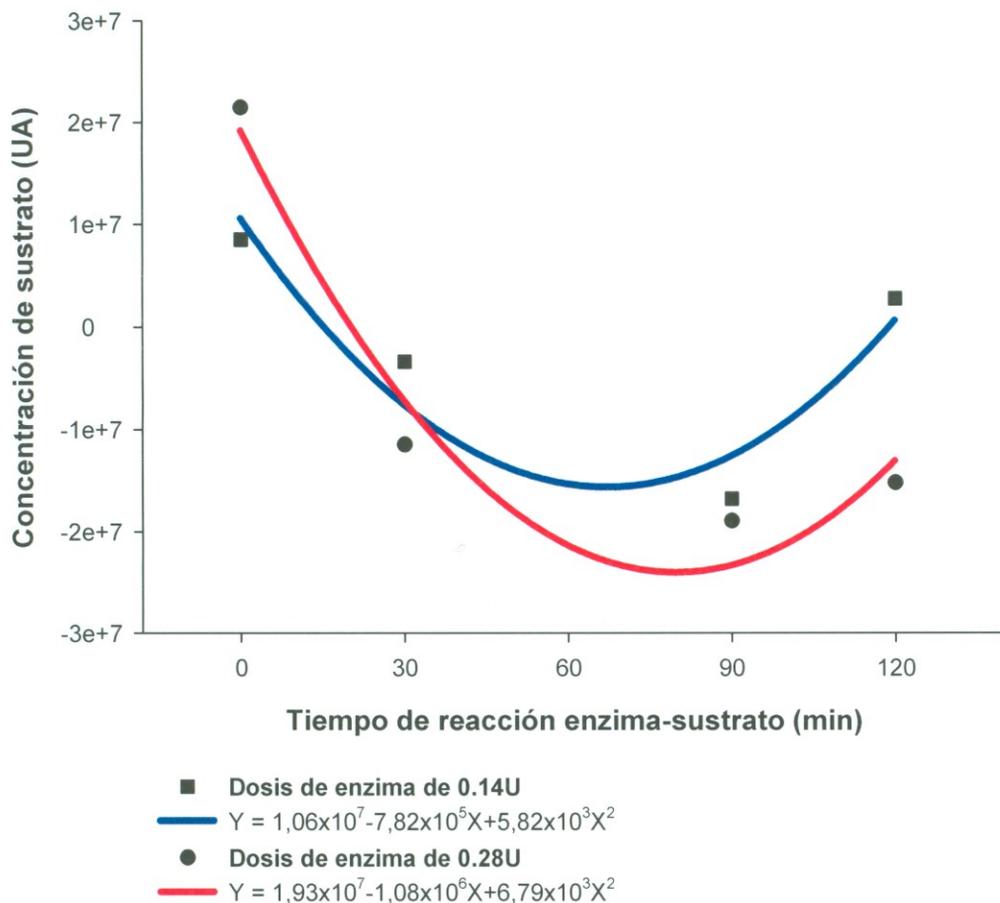


Figura 18. Comportamiento de las γ -gliadinas con respecto al tiempo aplicando diferentes dosis de enzima.

la enzima pudo haber actuado así, favoreciendo la mayor agregación en ω -gliadinas.

Además las gluteninas de BPM pudieron haber participado para que se llevara esa agregación en ω -gliadinas, se sabe que dentro de las gluteninas de BPM se encuentran las del grupo D, estas proteínas de acuerdo a la secuencia de aminoácidos se ha encontrado componentes de ω -gliadinas, con un residuo de cisteína extra, por lo que al momento de llevarse la hidrólisis, péptidos de las gluteninas de este grupo, pudieron incorporarse a las ω -gliadinas con este residuo extra de cisteína, observando así, una mayor agregación en estas subfracciones (D'Ovidio y Masci, 2004).

Estudios como Paananen y col., (2006) dicen que las ω -gliadinas, son responsables del flujo viscoso, sin embargo, en un estudio realizado por Gutiérrez (2006), se evaluó el comportamiento de viscosidad, al aplicarle una enzima tripsina extraída de la misma especie (*Scomberomorus sierra*) y se observó que la viscosidad disminuía desde el tiempo 0 min con respecto al control (sin enzima), el papel que tienen estas proteínas en la formación de la masa y su importancia en la calidad de la harina no ha sido bien definida (Tatham y Shewry 1995, referenciado por Dupont y col., 2000).

CONCLUSIONES

- La modificación que presentaron las proteínas del gluten cuando se aplicó la enzima tipo tripsina extraída de vísceras de sierra (*Scomboromorus sierra*) al iniciar el amasado de una harina de trigo cristalino, fue diferente en cada una de las fracciones de las gluteninas y de las gliadinas analizadas por HPLC de fase inversa.
- La modificación fue revelada por el aumento (agregación) o la disminución (hidrólisis) de las áreas de los picos del cromatograma de las fracciones extraídas de la masa después de transcurridos 0, 30, 90 y 120 minutos, con respecto al control (sin enzima).
- Las proteínas que manifestaron una mayor modificación por efecto de una hidrólisis fueron las gluteninas de alto peso molecular y las de bajo peso molecular también la presentaron a los 30 y 90 minutos de reposo de la masa con las dos dosis de enzima.
- El grado de modificación de las gliadinas dependió de la dosis de enzima y el tiempo de reacción. En las ω -gliadinas se presentó como una agregación durante el tiempo de reacción, y, la hidrólisis se manifestó en $\alpha+\beta$ - gliadinas con una dosis de enzima de 0.28U a los 30 min, y en las γ - gliadinas al inicio y final de la reacción con 0.14 U y al inicio con 0.28 U.

- El comportamiento cinético de las gluteninas y de las gliadinas se ajustó a un modelo cuadrático, que permite predecir el grado de modificación (hidrólisis o agregación) en cualquier tiempo de reacción enzima-sustrato y en cada una de las fracciones de proteínas.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio donde se analicen las proteínas remanentes después de la hidrólisis, mediante la secuencia de aminoácidos, para comprobar la agregación y caracterizar los fragmentos involucrados.

Por lo encontrado en este estudio y aunado a lo encontrado por Gutiérrez 2006, se recomienda dejar actuar la enzima en 30 y 90 min ya que presenta efectos favorables en las propiedades de la masa para la panificación.

Otra recomendación es hidrolizar al gluten de trigo cristalino y caracterizar los productos de hidrólisis, para buscar usos de esos hidrolizados en la industria alimentaria, como agentes espumantes y emulsificantes, para darle un valor agregado a estas proteínas.

La recomienda la técnica de RP-HPLC, para dar seguimiento a la modificación de las proteínas por efecto de las reacciones enzimáticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aja, S. Pérez, G., Rosell C.M. (2004). Wheat damage by *Aelia* ssp. And *Erygaster* spp: effects on gluten and water-soluble compounds released by gluten hydrolysis. *Journal of Cereal Science* 39 (187-193).
- Ammar, K., Kronstad, W.E. and Morris, C.F. (2000). Breadmaking quality of selected durum wheat genotypes and its relationship with high molecular weight glutenin subunits allelic variation and gluten protein polymeric composition. *Cereal Chem.* 77:230-236.
- Anderson, O.D., and Green, F.C. (1989). Characterization and comparative analysis of High-molecular-weight glutenin genes from genoma A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor. Apli. Genet.* 77:689-700.
- Anderson, O.D., Greene, F.C., Yip, R.E., Halford N.G., Shewry P.L., Malpica-Romero. J.M. (1989). Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploide bread wheat *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne. *Nucleic Acids Res.* 17:461.
- Anjum F.M., George L.L., Charles E.W. (2000). High molecular weight glutenin subunit composition of Pakistani hard white spring wheats grown at three locations for 2 years and its relationship with and use quality characteristic. *J. Sci Food Agric* 80:219-225.
- Anjum, F. M., Khan, M. R., Din, A., Saeed, M., Pasha I. and Arshad, M. U. (2007). Wheat gluten: High molecular weight glutenin subunits- structure,

genetics and relation to dough elasticity. *Journal of Food Science*. 72(3):56-63.

Atwell., W. *Wheat Flour*. (2001). American Association of Cereal Chemistry. St. Paul MN. USA.

Bañuelos, G. (2003). Caracterización de las proteínas del gluten de los trigos cristalinos (*Triticum durum*) cosechados en el Estado de Sonora y su relación con indicadores de calidad.

Bean, S. R. , Lookhart, G. L. (1998). Influence of salts and aggregation of gluten proteins on reduction and extraction of high molecular weight glutenin subunits of wheat. *Cereal Chem* 75(1): 75-79

Bean, S. R., Lyne, R. K., Tilley, K. A., Chung, O. K., and Lookhard, G. L. (1998). A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flour. *Cereal Chem*. 75:374-379.

Bietz, J. A., Burnouf, T., Cobb, L.A. and Wall, J. S. (1984). Wheat varietal identification and genetic analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem*. 61(2):129-135

Boggini, G., Tusa, P. and Pogna, N.E. (1995). Bread making quality of durum wheat genotypes with some novel glutenin subunit compositions. *J. Cereal Sci.*, 22: 105-113.

Burnouf, T. y Bietz, J.A. (1985). Chromosomal control of glutenin subunits in aneuploid lines of wheat : Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Theor. Appl. Genet.* 70:610.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anales Biochem.* 72:248-254.
- Boyacioglu, M.H., and D'Appolonia, B.L. (1994). Durum Wheat and Bread Products. *Cereal Foods World.* 39(3):168-174.
- Boyacioglu, M.H., and D'Appolonia, B.L. (1994a). Characterization and Utilization of Durum Wheat for Breadmaking. I. Comparision of Chemical, Rheological and Baking Properties Between Bread Wheat flours and Durum Wheat Flours. *Cereal Chemistry.* 71(1): 21-28.
- Boyacioglu, M.H., and D'Appolonia, B.L. (1994b). Characterization and Utilization of Durum Wheat for Breadmaking. II. Study of flour blends and various additives. *Cereal Chemistry.* 71(1): 28-34.
- Bushuk, W., Hay, R.L., Larsen, N.G., Sara, R.G., Simmons, L.D. y Sutton, K.H. (1997). Effect of mechanical dough development on the extractability of wheat storage proteins from bread wheat. *Cereal Chem.* 74:389.
- Cabrera, F. (2005). Caracterización de la cinética de hidrólisis de proteínas de gluten de trigo por la enzima tripsina de vísceras de sierra (*Scomberomorus sierra*). Tesis de maestría. Universidad de Sonora. México.
- Castillo, F. Pacheco, R. García, F. Navarrete, M. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine

Sardinops sagax caerulea. Comparative biochemistry and physiology.

Part B. Biochemistry & molecular biology. 140(1): 91-98.

Cherian, G., y Chinachoti P. (1996). ²H and ¹⁷O nuclear magnetic resonance study of water in gluten in the glassy and tubbery state. Cereal Chem. 73:618

Chopin. (2001). Quality control for grains and flour. Alveolink NG. France.

Colot, V., Bartels, D., Thompson R., y Flavell R. (1989). Molecular characterization of an active wheat LMW glutenin gene and its relation to other wheat and barley prolamin genes. Mol. Gen. Genet. 216:81.

Copeland, R.A. (2000). Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. Segunda edición. John Wiley & Sons, Inc. Publication.

D'Ovidio, R., Masci S. (2004). The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. J. Cereal Sci. 39: 321-339.

Dupont F. M., Vensel W. H., Chan R., Kasarda D. D., (2000), Characterization of the 1B- Gliadins from *Triticum aestivum* Cultivar Butte. Cereal Chem. Vol. 77, No.5:607-613.

Erlanger B. F., Kokwski N. and Cohen W. (1961). The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrate of Trypsin. Archs. Biochemistry Biophysical. 95: 271-278.

Fabriani, G. and Lintas, C. (1988). Durum Wheat: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

- Feillet, P. (1988). Protein and enzyme composition of durum wheat. Capítulo 5 en: Durum Wheat – Chemistry and Technology. Editado por: Giuseppe Fabriani y Claudia Lintas. AACCC. St. Paul, MN, U.S.A.
- Ferrante, P., Gianibelli, M.C., Larroque, O., D'Ovidio R., Lafiandra, D. and Masci, S. (2007). Considerations about the effect of incorporation of two rare LMW-GS in durum wheat in comparison to bread wheat doughs. In: Gluten Proteins 2006. Gluten Workshop 2006. September 14-16. San Francisco, California U.S.A.. Editado por George L. Lookhart and Perry K.W. Ng. AACCC International Inc. St. Paul MN. U.S.A.
- Ferrante, P., Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra D., Volpi Ch. and Mattei B. (2006). A proteomic approach to verify *in vivo* expression of a novel ω -gliadin containing an extra cysteine residue. *Proteomics* 6(6): 1908-1914.
- Garza, G.A. (1999). El Trigo. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Salud Pública y Nutrición.
- Gianibelli, M.C. Larroque O. R. , MacRitchie, F. and Wrigley, C.W. (2001). Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chemistry*. 78(6):635-646.
- Greenfield, J.J.A., Ross-Murphy, S.B., Tamas, L., Bekes, F., Halford, N.G., Tatham, A. S., and Shewry, P.R. (1998). Rheological properties of monomeric and polymeric forms of C hordeins, a sulphur-poor prolamins of barley. *J. Cereal Sci.* 27: 233-236.

- Gobbetti, M., M. S. Simonetti, J. Rossi, L. Cossignani, A. Corsetti, and P. Damiani. (1994). Free D- and L- amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. *J. Food Sci.* 59:881–884.
- Gutiérrez, B. S. N. (2006). Estudio de las propiedades fisicoquímicas de la masa y de la calidad del pan modificadas por tripsina de sierra (*scomberomorus sierra*). Tesis de maestría. Universidad de Sonora.
- Haard, N.F. (1992). A Review of Proteolytic Enzymes from Marine Organisms and Their Application in the Food Industry. *Journal of Aquatic Food Products Technology.* 1(1):17-35.
- Harada, O., Lysenko, E.D. and Preston K.R. (2000). Effects commercial hydrolytic enzyme additives on Canada short process bread properties and processing characteristics. *J. Cereal Chem.* 77(1):70-76.
- Hernández, P.; López, A.; Del valle,; Almenar, E.; Gavara, R. (2004). Mechanical and barrier properties of glutenin films influenced by storage time. *Journal of agricultural and food chemistry.* 52: 79-83.
- Heu, M.S., Kim, H.R. and Pyeun, J.H. (1995). Comparison of Trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. BiochemPhysiol.* Vol 112B.No. 3, 557-567.
- Hideo, H., Ryusuke T., Nobutaka S. and Yoichiro H. (2000). Comparison of protease activity in liver among several species of Squid and Cuttlefish. *Fisheries Science.* 66:182-183.

- Horcasitas, M. M. C. y Magaña, P. I. (2002). Enzimas con aplicación industrial. Avance y perspectiva. 21:279-282.
- INEGI, (2006). Sector Alimentario en México. http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2006/sam2006.pdf
- Jackson, E. A., Holt, L. M., Payne, P. I. (1983). Characterization of high-molecular-weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and chromosomal localization of their controlling genes. *Theor. Appl. Genet.* 66:29-37.
- Kasche, V. (1990). Proteases in peptide synthesis. Capítulo 7 en *Proteolytic Enzymes. A practical Approach*. Editado por R.J. Beynon & J.S. Bond. IRL Press. Oxford, England. P. 125-143.
- Kent, N. L. (1984). *Technology of cereals. An introduction for students of food science and agriculture*. 3rd. Edition. Pergamon Press. Great Britain. Pp. 1-16
- Kong. X., Zhou H., Qian H. (2007). Enzymatic hidrolisis of wheat gluten by proteasas and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*. 759-763.
- Kristjansson M. (1991). Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Agric. Food Chem.* 39:1738-1742.

- Kuktaite, R., Larsson, H., Johansson, E. (2004). Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behaviour. *J. Cereal Sci.* 40:31-39.
- Larré, C., Denery-Papini, S.m Popineau, Y., Deshayes, G., Desserme, C. Y Lefebvre, J. (2000). Biochemical análisis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chem.* 77:32-38.
- Lehninger, A. (1995). *Bioquímica* 2da ed. NY. USA.
- Linares, E., Larre C., Le MM, Popineau Y. (2000). Emulsifying and foaming properties of gluten hydroliysates with an increasing degree of hydrolysis: role of soluble and insoluble fractions. *Cereal Chem.* 77:414-20.
- Lookhart, G. L., Bean , S. R., Bietz J. A. 2003. HPLC of monomeric proteins. Capitulo 4 en: *Wheat gluten protein analysis*. Editado por Shewry P. R. and Lookhart G. L. American Association of Cereal Chemists. P . 61-83.
- López, G. A., Valdez, E. V. A., and Ramirez, W. B. (1991). The use of a mix of emulsifiers to improve the baking characteristics of blends of durum and bakers wheat flours. *Cereal Foods World.* 36:701.
- Lundstedt, L.M., Melo, J. F. B. and Moraes G. (2004). Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology .part B* 137:331-339.
- MacRitchie, F. (1987). Evaluation of contributions from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking. *J. Cereal Sci.* 6:259-268.

- Masci, S., Lew, E. J.-L., Lafiandra, D., Porceddu, E., and Kasarda, D. D. (1995). Characterization of low molecular weight glutenin subunits in durum wheat by reversed-phase High-Performance liquid chromatography and N-Terminal Sequencing. *J. Cereal Chem.* 72(1): 100-104.
- Mimouni, B., Azanza, J.L., and Raymond J. (1999). Influence of double enzyme hydrolyses on gluten functionality. *J. Sci Food Agric* 79:1048-1053.
- Mujoo, R., Ng P. K. W. Identification of Wheat Protein Components Involved in Polymer Formation on Incubation with Transglutaminase. *Cereal Chem.* 80 (6):703-706.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science.* 66(5): 642-646.
- Nightingale, M.J., Marchylo, B.A. , Clear, R.M., Dexter J. E. and Preston K.R. (1999). Fusarium Head Blight: Effect of fungal proteasas on wheat storage proteins. *Cereal Chemistry.* 76(1): 150-158.
- Olivas, B. H., (2001). Purificación y Caracterización de Tripsina del Intestino de la Lisa (*Mugil cephalus*) y Evaluación de su Capacidad Hidrolítica sobre el Gluten de Trigo Duro (*Triticum durum*). Tesis Maestría. UNISON.
- Olivas, B. H. Ezquerro, J. Rouzaud, O. Pacheco, R. (2001). Protease Activity and Partial Characterization of the Trypsin-like Enzyme in the Digestive Tracto of the Tropical Sierra *Scomberomorus concolor*. *J. Aquatic Food Product Tech.* 10(4).

- Osborne , T. B. (1924). *The Vegetable Proteins*, 2nd edn., Longmans, Green and Co., London.
- Paananen , A. Tappura, K. Tathan, A. S. Fido, R. Shewry, P. R. Miles, M. (2006). Nanomechanical force measurements of gliadin protein interactions. *Biopolymers*, 83:658-667.
- Pavlisko, A. Rial, A. Coppes, Z. (1999). Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortia spp*) and mullet (*Mugil spp*) from the southwest Atlantic Region. *Journal of food biochemistry* 23 (2): 225-241.
- Payne, P. I., Jackson, E. A. and Holt, L. M. (1984). The Association between γ -gliadin 45 and gluten strength in durum wheat varieties: A direct causal effect or the result of genetic linkage. *J. Cereal Sci.* 2:73-81.
- Peña, R. Zarco- Hernández J., Amaya-Celis, A., Mujeeb-Kazi, A., (1994). Relationships between chromosome 1B-encoded glutenin subunit compositions and Bread-making quality characteristics of some durum wheat (*Triticum turgidum*) cultivars. *Journal of Cereal Science* 19,243-249.
- Pérez S. L. A., y Ruíz Luna A. (1985). *Los Animales Comestibles de Importancia Comercial en Aguas Mexicanas: Peces, Moluscos, Crustáceos*. 1st ed. Compañía Editorial Continental, S. A de C.V. México.
- Pharmacia Fine Chemicals. (1979). *Affinity Chromatography: Principles and Methods*.

- Pitts, E.G., Rafalski, J.A. y Hedgcoth, C. (1988). Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of a genomic ge region for a low molecular weight glutenin. *Nucleic Acids Res.* 16:11376.
- Popineau, Y., (1994). Evaluation of hydrophobicity of wheat proteins and peptides by HIC and RP-HPLC, in *High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins* (J.E. Krunger and J.A Bietz eds.) Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN. p.393
- Qin Wang, A. Tolkach, y Ulrich Kulozik,. (2006). Quantitative Assessment of Thermal Denaturation of Bovine α - Lactalbumin via Low-Intensity Ultrasound, HPLC, and DSC. *J. Agric. Food Chem.*, Vol.54 (18):6501-6506.
- Rathore, R. M., Kumar, S., Chakrabarti, R. (2005). Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology .part B* 142:98-106.
- Rao, V. K., Mulvaney, S.J., Dexter, J.E. Edwards, N. M. Y Peressini, D. (2001). Stress-relaxation properties of mixograph semolina-water doughs from durum wheat cultivars of variable strength. *J. Cereal Sci.* 34: 215-232.
- SAGARPA (2006). Estadísticas de Producción de Trigo en Sonora.
- Serna-Saldivar, S.O. (1996). Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. Agt editor. México, D.F.

- Shewry, P. R., Tatham A. S., Forde, J., Kreis, M., and Mifflin, B. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *J. Cereal Sci.* 4 :97-106
- Shewry, P. R. and Lookhart G. L. (2003). *Wheat gluten protein analysis*. American Association of Cereal Chemists.
- Shewry, P. R., and Tathan, A. S. (1997). Disulphide bonds in wheat gluten protein. *J. Cereal Sci.* 25:207-227.
- Singh, Harmit. (2005). A study of changes in wheat protein during bread baking using SE-HPLC. *Food Chemistry* . 90:247-250.
- Simpson, B.K. and Haard, N. F. (1987). Trypsin and trypsin like enzyme from the stomachless cunner. Catalytic and other physical characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 35: 652-656.
- Simpson, B. K., Haard, N. F. (1984). Trypsin from Greenland Cod (*Gadus ogac*) Isolation and Comparative Properties. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 79(4):613-622.
- Simpson, B. K., Simpson, M.V. and Haard, N. F. (1990). Properties of trypsin from the pyloric ceca of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. of Food Sci.* Vol. 55(4):959-961.
- Sluimer, P. (2005). *Principles of Breadmaking. Funcionality of Raw Materials and Process Steps*. Published by the A.A.C.C. St. Paul, Minnesota, U.S.A.

- Skoog, D.A., Heller F.J y Nieman T.A. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición Mc.Graw Hill/Interamericana de España 5ª Edición Pag. 785-810.
- Tamas, L., Bekes, F., Greenfield, J., Tatham, A. S., Gras, P. W., Shewry, P.R., and Appels, R. (1998). Heterologous expression and dough mixing studies of wild-type and mutant C hordeins. *J. Cereal Sci.* 27:15-22.
- Tejeda A., Montesinos R., Guzman R. (1995). Bioseparaciones. Editorial Unison. Hermosillo, Sonora.
- Thompson, R.D. Barteles, D. Harberd, N.P. (1985). Nucleotide sequence of a gene from chromosome 1D of wheat encoding a HMW-glutenin subunit. *Nucleic Acids Res.* 13:6833.
- Valdez Melchor R. G, (2007). Comportamiento reológico de harinas de trigo adicionadas con enzima tripsina de vísceras de sierra (*scomberomorus sierra*). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de los Mochis.
- Van Dam, H. W., Hille, J. D. R. (1992). Yeast and enzymes in breadmaking. *Cereal Foods World.* 37(3).
- Velich, T. Delfino, S. Tolentinati, P. Di Lorenzo, C. (2004). Vigilancia del uso indebido de bromato de potasio en la Argentina. Instituto nacional de alimentos – anmat – ministerio de salud y ambiente. Vol. 12 (4,5): 49-80.
- Uthayakumaran, S., Gras, P. W., Stoddard, F. L., and Bekes, F. (1999). Effect of varying protein content and glutenin-to-gliadin ratio on functional properties of wheat dough. *J. Cereal Chem.* 76:389-394.

- Uthayakumaran, S., Stoddard, F.L., Gras, P.W. and Bekes F. (2000). Effects of incorporated glutenins on functional properties of wheat dough. *J. Cereal Chem.* 77(6):737-743.
- Uthayakumaran, S., Tömösközi, S., Tatham, A.S., Savage, A.W.J., Gianibelli, M.C., Stoddard, F.L., and Bekes, F. (2001). Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. *J. Cereal Chem.* 78(2):138-141.
- Wang, J. S., Zhao, M. M., Zhao, Q. Z., Bao, Y., and Jiang, Y. M. (2007). Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *Journal of Food Science. Publicación electrónica*
- Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for the food science.* 2nd ed. New York. Marcel Dekker Inc. Pp. 63-115.
- Wrigley, C. W and F. Bekes. (1999). Glutenin-protein formation during the continuum from anthesis to processing. *Cereal Foods World* 44(8): 562