



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

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

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Hidrofobicidad Superficial de las Subunidades de Glutenina
de Masa Molecular Alta de Trigos Panaderos y
su Relación con Calidad en Panificación

TESIS

que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

María Alba Guadalupe Corella Madueño

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

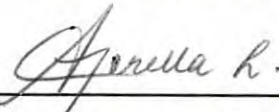
DEL AUTOR

Este trabajo se presenta como un requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos con especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos, del Departamento de Investigación y Posgrado en alimentos de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la Biblioteca de Posgrado en Ciencias e Ingeniería de la Universidad de Sonora, para ponerlo a la disposición de los interesados. Se puede obtener permiso para reproducir y/o referirse a este manuscrito en forma parcial o total a través del Jefe del Departamento, cuando se considere que dicho trabajo apoye el avance académico y científico.

En cualquier situación, se debe obtener permiso directamente del autor.

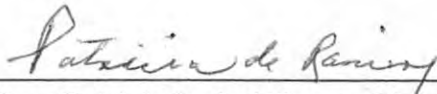
ATENTAMENTE



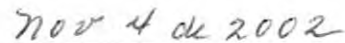
Q. María Alba Guadalupe Corella Madueño

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Este trabajo se aceptó satisfactoriamente en la fecha que abajo se señala



Dra. Patricia Isabel Torres Chávez



Fecha

AGRADECIMIENTOS

A Dios creador de todo lo existente.

A la Universidad de Sonora, nuestra máxima casa de estudios.

Al Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y al Sindicato de Trabajadores Académicos de la Universidad de Sonora, por el apoyo brindado para participar en el programa de Maestría en Ciencias del DIPA, UNI-SON. Así mismo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo y por darme la oportunidad de obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo a través del Proyecto “Estudio Integral de los Trigos Mexicanos y su Uso Potencial” (Clave: G35201-B), bajo la responsabilidad del Dr. Benjamín Ramírez Wong.

A los Laboratorios de Microbiología, Análisis Generales, Bioquímica, Reología y Productos Marinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por su apoyo en la realización del trabajo experimental.

Al Laboratorio de Biotecnología del Programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por las facilidades prestadas para la realización de parte del trabajo experimental.

A los integrantes de mi jurado de tesis: Dra. Luz Vázquez Moreno, Dr. Benjamín Ramírez Wong y Dr. Jesús Manuel Barrón Hoyos, por su valioso apoyo y sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo; y muy especialmente a mi Directora de Tesis, Dra. Patricia Isabel Torres Chávez por su valiosa dirección y asesoría, así como por su apoyo personal en la realización de este trabajo.

Agradezco también el apoyo y sugerencias de la Dra. Carmen Candia Plata del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la UNI-SON, por darme un poco de su valioso tiempo.

A mis maestros del programa de maestría en ciencias que me indicaron que el camino de superación consiste en fijarse una meta y lograrla con disciplina y constancia.

Agradezco también al personal, maestros y estudiantes de la Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos del DIPA quienes de alguna u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

A la M.C. Ana Irene Ledesma Osuna por su apoyo experimental en cromatografía.

A Lucy y Daniel por su valioso apoyo, Gracias.

En especial también al Dr. Francisco Javier Cinco por su apoyo y recomendaciones.

A todos mis compañeros de trabajo en el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y a todas aquellas personas que estuvieron cerca de mí y me brindaron su amistad, la lista es muy grande... Gracias a todos por su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres: María Madueño de Corella, "Gracias mamá" por tu amor y paciencia y a mi padre J. Alberto Corella Molina, que con sólo mirar al cielo, me acompaña en todo momento.

A mis queridos hermanos: Jesús, Virginia; (Enrique y Alberto, q.p.d), Artemisa, Silvia, María Elena, Ricardo, René y Adalberto por toda esta espera y a mis cuñados y cuñadas. Mery, Francisco, Norma, Daniel, Leonardo, Martha, Mercedes y Olga, por la misma espera.

A mi esposo, muy especialmente por su incondicional apoyo, pero muy especialmente por su amor y a mis hijos, Francisco Alberto, José Carlos y Jorge Alejandro a quienes amo.

A mis compañeros de generación, ese tiempo que compartimos es un grato recuerdo.

Una dedicatoria muy especial a mi Directora de Tesis: Dra. Patricia Isabel Torres Chávez, a quien su pasión por las "Proteínas de Cereales" la ha colocado como un ejemplo de superación y lucha constante en el logro de sus objetivos.

Gracias, a todos...

Alba Guadalupe Corella M.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
Proteínas de Almacenamiento de los Cereales	5
Origen y Constitución Genética del Trigo Panadero	6
Gluten de Trigo	9
Clasificación de las Proteínas del Gluten.....	10
Clasificación por Solubilidad	10
Clasificación por Carácter Polimérico	11
Clasificación por Contenido de Azufre	14
Prolaminas ricas en azufre	14
Prolaminas pobres en azufre.....	16
Prolaminas de masa molecular alta	16
Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta.....	16
Composición	16
Estructura de las HMW-GS	17
Las Proteínas Como Determinantes de Calidad en Trigo	20
Contenido de Proteína	20
Relación Gliadina-Glutenina	21
Relación de las HMW-GS con Calidad del Trigo	22
Calificación de Calidad Panadera	26
Interacción Molecular y Funcionalidad.....	31
Interacciones Hidrofóbicas	33
Evaluación de la Hidrofobicidad de las Proteínas del Gluten.....	34
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC)	39
Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa	40

CONTENIDO (Cont...)

Cromatografía de Fase Reversa.....	41
Ventajas de la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica en Comparación con la Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
Muestras de Harina de Trigo	44
Esquema General del Trabajo	44
Procedimiento de Extracción de Gluteninas de las Harinas.....	47
Extracción y Estabilización de las Subunidades de Gluteninas de las Muestras de Harina para la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	47
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	48
Diálisis y Liofilización de las Fracciones Proteicas	50
Electroforesis Desnaturalizante y Reductora de Estándares y Muestras	50
Calificación de Calidad de las Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta	51
Calidad de las Harinas.....	53
Contenido de Proteína de la Harina	53
Mixograma	53
Volumen de Pan.....	55
Calidad de la Miga	55
Proteína Polimérica Insoluble.....	55
Análisis Estadístico	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
Identificación de Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta.....	56
Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta y Correlación con Calidad.....	69

CONTENIDO (Cont...)

Características de Calidad de las Harinas de las Variedades de Trigo Rojo Fuerte de Invierno (HRW)	70
Correlación entre las Características de Calidad y Calificación de Calidad	72
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	74
Patrones Cromatográficos de las Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta	74
Proteína Eluida en las Fracciones Cromatográficas y Recuperación.....	77
Electroforesis de Fracciones Cromatográficas de Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta.....	82
Distribución de las Subunidades en Fracciones de Diferente Hidrofobicidad	96
CONCLUSIONES	100
RECOMENDACIONES	102
RELEVANCIA DEL ESTUDIO	103
REFERENCIAS	104
ANEXO A.....	124

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Los Cromosomas del Trigo Panadero	7
II.	Muestras de Harina de Trigo Rojo Fuerte de Invierno Utilizadas en el Estudio	45
III.	Variantes Alélicas para el Locus Glu-1 y Calificación de Calidad para Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta Individuales o por Pares	54
IV.	Composición de HMW-GS y Calificación de Calidad de Payne Para Variedades de Trigo Rojo Fuerte de Invierno Cosechado en Estados Unidos en 1998.....	66
V.	Composición de HMW-GS y Calificación de Calidad de Payne por Genomas, para Variedades de Trigo Rojo Fuerte de Invierno Cosechado en Estados Unidos en 1998.....	67
VI.	Característica de Calidad de las Muestras de Trigo Panadero Rojo Fuerte de Invierno (HRW).....	71
VII.	Correlación entre Características de Calidad y Calificación de Calidad de Payne	73
VIII.	Proteína Eluida en las Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	78

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Localización Cromosomal de los Genes que Codifican para las Principales Clases de Proteínas del Gluten.....	8
2. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Proteína Polimérica después de la reducción a Subunidades	13
3. Clasificación de las Proteínas del Gluten de Trigo.....	15
4. Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta	18
5. Representación Esquemática de HMW-GS.....	19
6. Variación Alélica en HMW-GS para los Loci de los Tres Genomas.....	28
7. Diagrama General de la Experimentación	46
8. Diagrama de Extracción, Estabilización y Preparación de las Gluteninas para la Electroforésis	49
9. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Extractos de Gluteninas de Variedades de Referencia.....	52
10. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de HMW-GS de a) Muestras 1 - 4 y b) Muestras 5 - 8.....	57
11. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de HMW-GS de a) Muestras 9 -12 y b) Muestras 13 -16	58
12. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de HMW-GS de a) Muestras 17 – 20 y b) Muestras 21 - 25	59
13. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de HM-GS de Muestras 1- 4.....	61
14. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de HMW-GS de Muestras 5 – 8.....	62
15. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de HMW-GS de Muestras 5 - 8.....	63
16. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de HMW-GS de Muestras 7 y 11	65
17. Patrones de Elución en Cromatografía de Interacción Hidrofóbica: A) Muestras 5 y B) Muestra 6	75
18. Patrones de Elución en Cromatografía de Interacción Hidrofóbica: A) Muestras 7 y B) Muestra 8	76

LISTA DE FIGURAS (Cont...)

19. Variación en los Porcentajes de Proteína Eluida en las Fracciones Cromatográficas de Diferente Hidrofobicidad	81
20. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 1 y B) 2.....	83
21. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 3 y B) 4.....	84
22. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 5 y B) 6.....	85
23. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 7 y B) 8.....	86
24. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 9 y B) 10.....	87
25. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 11 y B) 12.....	88
26. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 13 y B) 14.....	89
27. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 15 y B) 16.....	90
28. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 17 y B) 18.....	91
29. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 19 y B) 20.....	92
30. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 21 y B) 22.....	93
31. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de las Muestras A) 23 y B) 24	94
32. Patrón Electroforético (SDS-PAGE) de Fracciones de Proteína en HIC de la Muestra A) 25	95

RESUMEN

La calidad del trigo se debe principalmente a las proteínas de almacenamiento del endospermo que componen al gluten, de las cuales, la fracción de glutenina es la más importante en la definición de calidad de los trigos panaderos. El entrecruzamiento resultante de los enlaces covalentes disulfuro, los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas confieren a las gluteninas sus propiedades de agregación y funcionales.

Se realizó un estudio a 25 variedades de harina de trigo panadero rojo fuerte de invierno (Hard Red Winter), con el objetivo de evaluar la hidrofobicidad relativa de las subunidades de glutenina de masa molecular alta y conocer su contribución a la definición de calidad en panificación. Para lograr este objetivo se identificaron las subunidades de masa molecular alta, asignándoles el correspondiente número de Payne, por comparación con los patrones electroforéticos de harinas estándar de composición de subunidades conocida. Conociendo la composición de subunidades fue posible obtener la calificación de calidad "Glu-1".

Se empleó cromatografía de interacción hidrofóbica para separar a las proteínas del gluten en fracciones de diferente hidrofobicidad, utilizando columnas empacadas con agarosa altamente acetilada. El contenido de proteína de las fracciones colectadas se determinó empleando el método de Bradford. Además, se usó electroforesis desnaturante y reductora para obtener la distribución de las subunidades de glutenina de masa molecular alta en cada una de las fracciones cromatográficas.

Los resultados obtenidos de calificación de calidad Glu-1, se correlacionaron con las características reológicas, determinadas previamente en las muestras de harina, así como con características de calidad en panificación, entre ellas, volumen de pan, calidad de la miga y proteína polimérica insoluble.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de almacenamiento de los cereales son importantes ya que proporcionan un gran número de nutrientes esenciales para la germinación del embrión. También estas proteínas son importantes por sus propiedades funcionales únicas en los productos alimentarios y por sus múltiples aplicaciones industriales (Bietz y Kruger, 1994).

La relevancia bioquímica de estas proteínas está determinada genéticamente debido al fuerte polimorfismo de los genes que las codifican. Los especialistas en genética utilizan el análisis de proteínas para identificar variedades que pueden ser utilizadas para la producción y también pueden proporcionar información valiosa para mercadeo y clasificación de granos (Bietz y Kruger, 1994)

Probablemente el mejor ejemplo de la funcionalidad de las proteínas de cereales, es el gluten de trigo, considerado como materia proteica, polimérica y visco elástica, debido al cual las masas de trigo se expanden y retienen el gas generado durante la fermentación, obteniéndose un pan de textura única después del horneado (Wrigley y Bietz, 1988).

Sin embargo, trabajar con proteínas de cereales es difícil por muchas razones; su heterogeneidad, la composición atípica de aminoácidos, alta en glutamina, prolina y aminoácidos hidrofóbicos, que las hace poco solubles en agua o en soluciones amortiguadoras, y exigen el uso de soluciones que contengan concentraciones altas de solventes orgánicos, ácidos o bases, desnaturalizantes o detergentes, para romper toda interacción no covalente y solubilizarlas. Además, en estas proteínas las interacciones intermoleculares directas, con residuos de cisteína son comunes, llevando a la formación de polímeros extensos, mallas o redes de polipéptidos unidos directamente por

enlaces disulfuro. Por ello, es necesario el uso de agentes reductores tales como, 2-mercaptoetanol o ditioneitol, para romper esos enlaces y solubilizar a estas proteínas. La alquilación de los residuos resultantes previene su reoxidación a través de la reformación de enlaces disulfuro que pueden causar la insolubilización de las proteínas (Wrigley y Bietz, 1988). Debido a la complejidad de este grupo de proteínas del trigo, se han tenido muchas dificultades para su aislamiento y caracterización por los métodos tradicionales y ha sido necesario llevar a cabo numerosas modificaciones de estos métodos. Se han utilizado técnicas como la electroforesis desnaturalizante y reductora y combinaciones de varios métodos electroforéticos (Payne y col., 1985).

Se han desarrollado investigaciones importantes en la separación de las proteínas de trigo por cromatografía de interacción hidrofóbica y por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (Chung y Pomeranz, 1979; Magnus y Khan, 1992), usando matrices tales como fenil-Sefarosa y agarosa derivatizada con grupos alquilo (C8 y C18). Los resultados han indicado que las gluteninas de harinas de baja calidad panadera fueron menos hidrofóbicas que las gluteninas de harinas de buena calidad.

La hidrofobicidad superficial de las proteínas de trigo se reconoce como un factor importante en la interacción entre estas proteínas y con otros componentes de la harina para formar la red de gluten hidratado (Hoseney y col., 1970). Estudios llevados a cabo por Torres y Vázquez Moreno (2000) utilizando HIC en agarosa altamente acetilada mostraron su utilidad para el estudio de gliadinas y gluteninas. Este método permitió estimar la hidrofobicidad relativa de las proteínas de gluten de trigo y establecer su clara relación con características reológicas específicas de las masas.

Las subunidades de masa molecular alta, siendo sólo una pequeña parte de la composición de las proteínas del gluten, tienen una gran influencia en las características de calidad de los trigos panaderos, debido a la formación de

polímeros de gran tamaño por polimerización a través de enlaces disulfuro (Veraverbeke y Delcour, 2002). En el presente estudio se pretende conocer la contribución de la hidrofobicidad superficial de estas subunidades en la definición de calidad de los trigos panaderos.

OBJETIVOS

General

Evaluar la hidrofobicidad superficial relativa de las subunidades de glutenina de masa molecular alta de diferentes variedades de trigos panaderos para conocer su contribución a la definición de calidad en panificación.

Específicos

1. Determinar la composición de subunidades de glutenina de masa molecular alta y obtener la calificación de calidad (Glu-1 Score) de las muestras de trigo panadero.
2. Estimar la hidrofobicidad superficial relativa de las subunidades de glutenina de masa molecular alta utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica.
3. Relacionar la hidrofobicidad superficial de las subunidades de glutenina de masa molecular alta con la calificación de calidad asignada a cada una de las variedades de trigo incluidas en el estudio y con características de calidad de las harinas como propiedades reológicas, volumen de pan y calidad de la miga.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Proteínas de Almacenamiento de los Cereales

Las prolaminas son las proteínas de almacenamiento de los cereales, constituyen aproximadamente la mitad del total de la proteína en la semilla madura, excepto en avena y arroz (Shewry y Miflin, 1985), influyendo en gran medida en la calidad del grano. Son prolaminas: las gliadinas y gluteninas del trigo, las hordeínas de la cebada, las secalinas del arroz, las zeínas y algunas glutelinas del maíz, y la kafirina del sorgo.

Las prolaminas fueron definidas como un grupo en base a sus propiedades de solubilidad y composición de aminoácidos. La extracción y la solubilidad de estas proteínas en alcohol acuoso está limitada por la formación de enlaces disulfuro entre sus cadenas o posiblemente con otras proteínas del grano, dando polímeros de masa molecular alta conocidos como gluteninas en el trigo. Una vez que los enlaces disulfuro son reducidos, las subunidades individuales de proteína son extraídas y solubilizadas en alcohol acuoso (Pomeranz, 1990).

La composición de aminoácidos de estas proteínas es inusual. Se caracterizan por un alto contenido de glutamina (20 moles %) y prolina (10 moles %), y tienen sólo pequeñas cantidades de lisina y otros aminoácidos básicos (Pomeranz, 1990), lo que las hace responsables de las deficiencias nutricionales de los cereales como alimento para el hombre y ganado monogástrico (Shewry y Miflin, 1985; Tatham y col., 1990). En el trigo, las prolaminas son las principales componentes del gluten y por lo tanto afectan la calidad tecnológica del grano (Shewry y Miflin, 1985).

Origen y Constitución Genética del Trigo Panadero

Las especies de trigo son diploides, tetraploides y hexaploides. Las especies tetraploides y hexaploides se originaron de especies diploides de trigos primitivos. El trigo panadero (*Triticum aestivum*) es hexaploide, consiste de tres genomas diploides diferentes y cada genoma tiene 7 pares de cromosomas, llamados AA, BB y DD (Tabla I). Los genomas A y D se considera que se derivaron de un trigo silvestre diploide (*Triticum sp.*) y los zacates salvajes *Aegilops squarrosa* (*T. tauschii*), respectivamente. Los orígenes del genoma B se desconocen. Los trigos cristalinos o para pasta (*T. durum*) son tetraploides, con genomas A y B solamente (Pomeranz, 1990). A cada par de cromosomas se le asigna un número seguido de una letra, la letra se refiere al genoma del cual el par fue heredado. Los genomas A, B y D codifican grupos de proteínas de almacenamiento que son electroforéticamente distinguibles entre sí (Payne y col., 1984). Los cromosomas del trigo hexaploide están triplicados, parcial o totalmente. La delección de los cromosomas generalmente no es letal, ya que los genes de los cromosomas eliminados, estarán presentes en sus homólogos. (La Fig. 1, es un esquema simplificado del loci de los genes).

Los genes que codifican para las proteínas almacenadas en el endospermo se encuentran en nueve loci complejos de seis cromosomas diferentes Glu-A1, Glu-B1, y Glu-D1. Los genes que codifican a las subunidades de glutenina de masa molecular alta están presentes en el loci Glu-1 localizado en el brazo largo de los cromosomas del grupo 1 (1A, 1B y 1D) del trigo panadero. Cada loci contiene dos genes ligados estrechamente, correspondientes a una subunidad de tamaño molecular alto y a una subunidad de tamaño molecular bajo, llamadas tipo x y tipo y, respectivamente. En el brazo corto del mismo cromosoma, se encuentran los loci Gli-A1, Gli-B1 y Gli-D1.

Tabla I. Cromosomas del Trigo Panadero

Posible donador cromosoma	Genoma A Triticum urartu	Genoma B desconocido	Genoma D Aegilops squarrosa
1	1 ^a	1B	1D
2	2 ^a	2B	2D
3	3 ^a	3B	3D
4	4 ^a	4B	4D
5	5 ^a	5B	5D
6	6 ^a	6B	6D
7	7 ^a	7B	7D

Fuente: Payne y col., 1984.

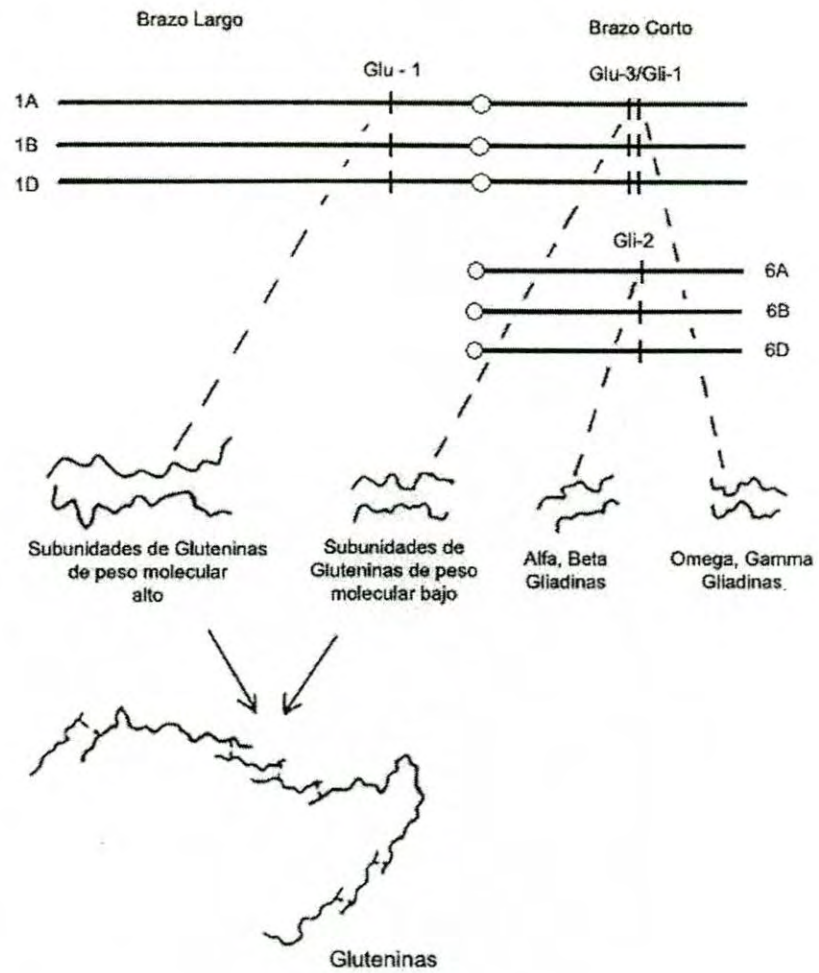


Figura 1. Localización Cromosomal de los Genes que Codifican para las Principales Clases de Proteínas del Gluten.

Fuente: MacRitchie, 1999.

Cada uno de estos loci tiene tres familias de genes (alelos) que codifican para las gliadinas ω , las gliadinas γ , y las subunidades de glutenina de masa molecular baja (loci Glu-3) (Gianibelli y col., 2001). Los loci permanentes, Gli-A2, Gli-B2 y Gli-D2 están, cerca de la parte final del brazo corto de los cromosomas 6A, 6B, y 6D respectivamente y cada uno codifica para las gliadinas α y las gliadinas β .

La constitución genética del trigo panadero es importante debido a que todos los rasgos de calidad resultan de la expresión de genes y su interacción con el medio, por ejemplo, las proteínas codificadas por la interacción de diferentes genomas, son importantes en la determinación de propiedades físicas y tecnológicas de las masas producidas para elaboración de pan y pasta (Pomeranz, 1990).

Gluten de Trigo

El gluten de trigo puede definirse como el material viscoelástico remanente del lavado de la masa de harina de trigo con agua o soluciones salinas diluidas para remover el almidón y los componentes solubles (incluyendo proteínas). El material viscoelástico final consiste predominantemente de proteínas (70-80 % del peso seco); pero también contiene almidón residual y lípidos. La mayoría de las proteínas del gluten son prolaminas (Pomeranz, 1990).

El gluten o las proteínas que forman la masa (85%) están constituidas por las gliadinas, solubles en alcohol y las gluteninas solubles en ácido o alcalí. Las proteínas que no forman gluten constituyen el 15% del total de proteínas y entre ellas se encuentran las Albúminas (60%), solubles en agua, globulinas (40%) solubles en soluciones salinas, así como péptidos y aminoácidos. Las enzimas de la harina se incluyen en esta categoría (Pomeranz, 1990).

Clasificación de las Proteínas del Gluten

Clasificación por Solubilidad

Todos los esquemas de extracción de las proteínas de cereales están basados en el trabajo pionero de Osborne (1907). La clasificación de Osborne originalmente usada para trigo ha sido aplicada virtualmente a casi todos los cereales con cierta modificación. El esquema de fraccionamiento de Osborne divide a las proteínas de cereales en 4 clases principales: albúminas solubles en agua, globulinas solubles en solución salina 0.5M, prolaminas solubles en alcohol y glutelinas solubles en ácido o base. En el trigo, la fracción soluble en solución de alcohol al 70% corresponde a gliadina y la fracción insoluble en alcohol, pero soluble en ácido acético 0.5M, urea y detergentes iónicos, corresponde a glutenina (Jackson y col., 1983; Pomeranz, 1990; Bean y Lookhart, 2000). La extracción de estas proteínas se realiza en forma secuencial, es decir, primero las solubles en agua, seguidas por las solubles en sal y así sucesivamente.

La extracción selectiva por solventes puede proporcionar buena resolución, pero no produce clases de proteínas puras y solo proporciona información cuantitativa limitada. Para obtener mayor información se tiene que hacer uso de técnicas de más alta resolución, como cromatografía o electroforesis.

Clasificación por Carácter Polimérico

En este esquema, las gliadinas y gluteninas se clasifican de acuerdo a su estado de agregación más bien que por su solubilidad. Las gliadinas se encuentran como una mezcla compleja de polipéptidos (monómeros), mientras que las gluteninas consisten de agregados unidos principalmente por enlaces disulfuro (polímeros).

Las gliadinas se caracterizan por su alto contenido de glutamina y prolina y por su solubilidad en soluciones neutras conteniendo altas concentraciones de alcoholes. Se dividen en 4 grupos, llamados gliadinas alfa (α), beta (β), gamma (γ) y omega (ω), con base en su movilidad electroforética decreciente a pH bajo (Kasarda y col., 1983). Los pesos moleculares relativos, M_r s de gliadinas, varían entre 44,000 y 74,000 con un promedio aproximado de 50,000 (Kasarda y col., 1983). Las gliadinas α , β , y γ tienen M_r s muy bajos, en el rango de 30,000 y 45,000, determinados por electroforesis desnaturizante y reductora (SDS-PAGE) y por secuenciación de aminoácidos. Las gliadinas α y β están ligadas estrechamente, y ambos grupos actualmente se refieren como tipo- α , en contraste con las gliadinas tipo- γ . Aunque hay algunos traslapes, las gliadinas tipo- α generalmente tienen M_r s más bajos que las gliadinas tipo- γ (Pomeranz, 1990). Las gliadinas son muy ricas en glutamina, 36.1 moles %, tienen 17.7 moles % de prolina y 2.4 moles % de glicina (Shewry y col., 1986).

Las gluteninas consisten de subunidades individuales de polipéptidos que forman polímeros estabilizados por enlaces disulfuro. Los pesos moleculares de estos polímeros de glutenina alcanzan cerca de 20 millones de Daltones, obtenidos con estudios de cromatografía de exclusión molecular (Bietz and Wall 1972) y de fraccionamiento de campo de flujo (FFF) (Stevenson y Preston 1996), por lo que estas proteínas se encuentran entre las moléculas más grandes de la naturaleza (Wrigley, 1996).

Las gluteninas son clasificadas en 4 grupos de acuerdo a su movilidad electroforética en electroforesis desnaturizante y reductora (SDS-PAGE), después de la reducción de los enlaces disulfuro (regiones A, B, C, y D, de movilidad electroforética). El grupo A con un aparente rango de peso molecular de 80,000 a 130,000 Da, corresponde a las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS, por sus siglas en inglés) (Payne y Corfield 1979) y los

grupos B, C, y D son gluteninas de masa molecular baja (LMW-GS por sus siglas en inglés,) con masas de 10,000 a 70,000 Da, esta clasificación es relativa a diferencias en tamaño y puntos isoeléctricos (Payne y Corfield 1979; Jackson y col., 1983).

Las HMW-GS y las LMW-GS, difieren significativamente en su composición de aminoácidos: Las subunidades de masa molecular baja, son semejantes en su composición de aminoácidos a las gliadinas monoméricas tipo- α y tipo- γ (Shewry y col. 1984).

Las LMW-GS de los grupos B (M_r , 42,000 a 51,000 Da) y C (M_r , 30,000 a 40,000 Da), están relacionadas lejanamente con las gliadinas γ y α (Payne y Corfield, 1979; Payne y col., 1985). El grupo D de LMW-GS, son altamente ácidas y se relacionan con las gliadinas- ω (Jackson y col. 1983; Masci y col., 1993) (Fig. 2).

Las subunidades de glutenina han sido también caracterizadas por otros métodos como electroforesis capilar (Lookhart y Bean, 1996; Bean y col., 1998; Bean y Lookhart, 2000) y por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC) (Bietz, 1983; Bournouf y Bietz, 1984,1985).

Las HMW-GS son codificadas en el loci Glu-1 del brazo largo de los cromosomas del grupo 1 (1A, 1B, y 1D) (Bietz y col., 1975; Payne y col. 1980). Estos loci son Glu-A1, Glu-B1, y Glu-D1, respectivamente. Cada locus incluye dos genes ligados estrechamente codificando dos tipos diferentes de HMW-GS: subunidades tipo x y tipo y (Payne, 1987; Shewry y col., 1992) (Fig.2).

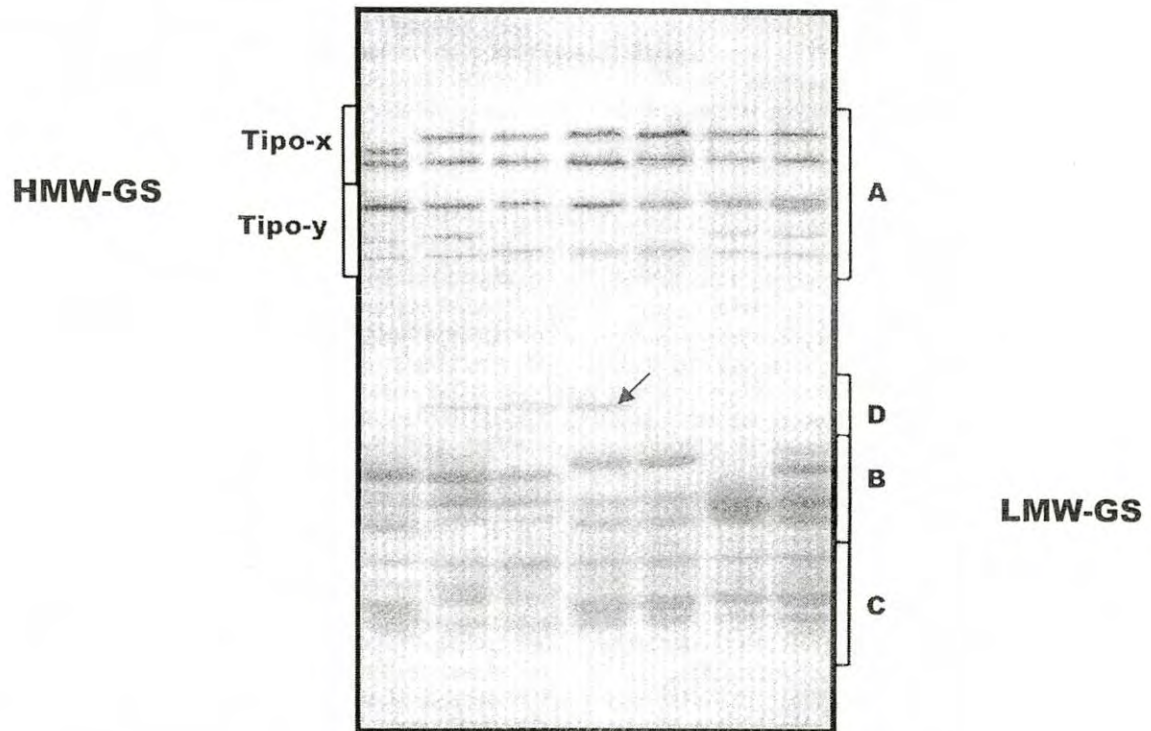


Figura 2. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de proteína polimérica después de la reducción a subunidades. Grupo A: subunidades de glutenina de masa molecular alta mostrando subunidades de glutenina tipo-x y tipo-y. Grupos B, C y D: subunidades de glutenina de masa molecular baja. La flecha indica una subunidad D.

Fuente: Gupta y MacRitchie (1991).

Las subunidades tipo x, generalmente tienen baja movilidad electroforética en SDS-PAGE y peso molecular más alto que las subunidades tipo y. Estudios electroforéticos han revelado apreciable polimorfismo en el número y movilidad de las HMW-GS en trigos panaderos y trigos para pasta (Payne y col., 1980; Payne, 1987, Branlard y col., 1989). Por lo tanto, los loci Glu-1, presentan alelismo múltiple. El loci Glu-1 tiene tres formas alélicas para el Glu-1A; Glu-B1 tiene 11 alelos y Glu-D1 tiene 6 alelos (Payne y Lawrence, 1983).

Clasificación por Contenido de Azufre

Esta clasificación se basa en la estructura primaria de las proteínas ya que compara las secuencias de aminoácidos de las prolaminas individuales en lugar de las interacciones de subunidades como en la clasificación gliadina-glutenina. En esta clasificación se reconocen tres grupos de proteínas: ricas en azufre, pobres en azufre y prolaminas de masa molecular alta (Fig. 3) (Shewry y col., 1986).

Prolaminas Ricas en Azufre. Esta clasificación comprende al menos tres tipos de proteínas del trigo: gliadinas tipo- α (gliadinas $\alpha + \beta$), las gliadinas tipo- γ y las subunidades de glutenina de masa molecular baja solubles en etanol. Son más variables en composición de aminoácidos que los otros tipos de prolaminas (reflejando su gran heterogeneidad), pero todas son generalmente muy ricas en aminoácidos azufrados (conteniendo 2-3 %) y respectivamente pobres en glutamina y prolina (Pomeranz, 1990). Muchas proteínas están en esta clase; por ejemplo, las gliadinas que contienen enlaces disulfuro intramoleculares, que se pueden extraer con alcohol acuoso; otras requieren condiciones reductoras para su extracción como las subunidades de glutenina de masa molecular baja (Wrigley y Bietz, 1988; Pomeranz, 1990).

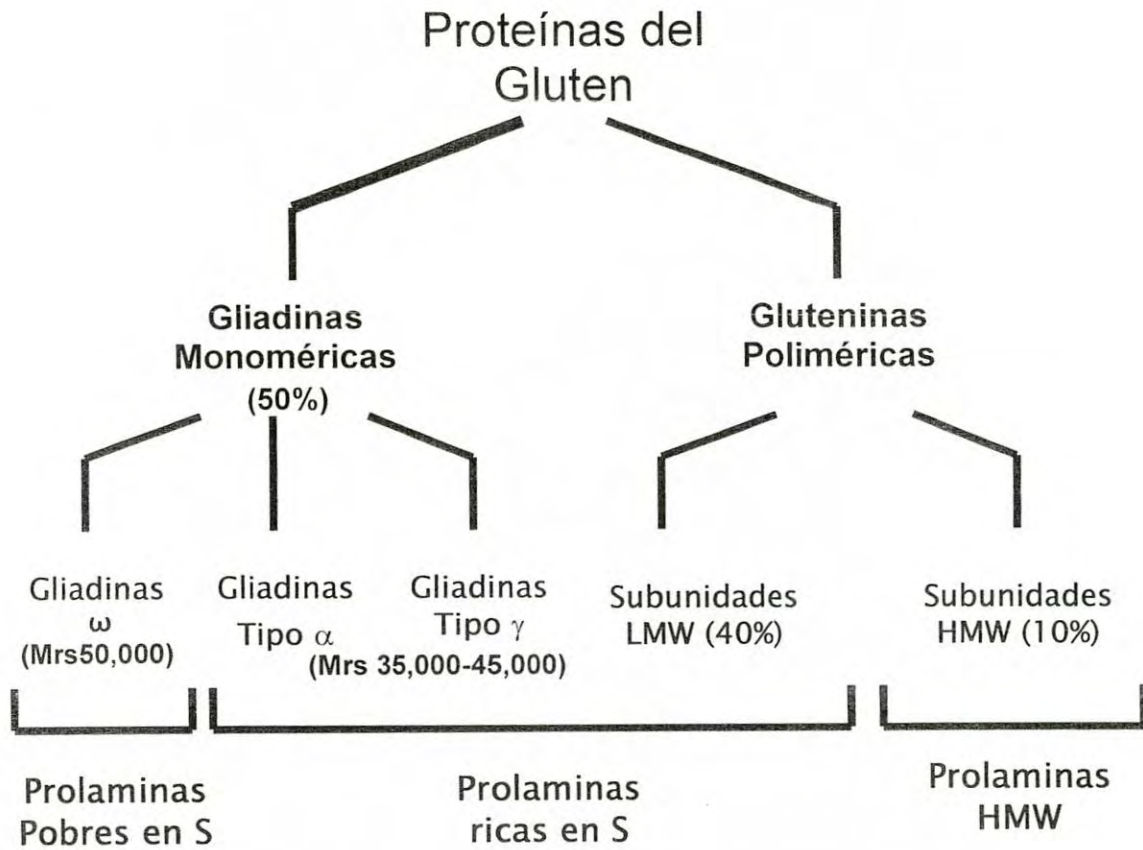


Figura 3. Clasificación de las Proteínas del Gluten de Trigo.

Fuente: Shewry y col. (1990)

Prolaminas Pobres en Azufre. Las principales prolaminas pobres en azufre presentes en trigo, son las gliadinas- ω , las cuales carecen de residuos de cisteína o metionina pero tienen cantidades muy grandes de glutamina (más del 50 %) y prolina; estos dos aminoácidos juntos constituyen más que el 70% del total. También contienen más fenilalanina (aproximadamente 8 moles %) que la encontrada en otras prolaminas. Trabajos recientes han demostrado que las subunidades tipo D de subunidades de glutenina de masa molecular baja, que contienen cisteína, pertenecen a las prolaminas pobres en azufre (Pomeranz, 1990).

Prolaminas de Masa Molecular Alta. Corresponden a las subunidades de gluteninas de masa molecular alta, Estos polipéptidos son muy difíciles de solubilizar se encuentran como agregados unidos por enlaces disulfuro por lo que son extraídos sólo con agentes reductores.

Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta

Se han estudiado en detalle las subunidades de masa molecular alta, a nivel fisicoquímico y molecular, porque la variación alélica en su composición está asociada con diferencias en las propiedades de elaboración de pan de los trigos (Shewry y col., 1992; Mills y col., 2000).

Composición

Las HMW-GS son generalmente muy ricas en aminoácidos azufrados (contienen 2 - 3 %). Su contenido de ácido glutámico es generalmente alto, principalmente en la forma amida (glutamina: 35 moles %), tienen también alto contenido de glicina (20 moles %) y prolina (13 moles %) así como un bajo contenido de lisina (Shewry y col. 1984).

Tienen masas moleculares relativas (M_r) determinadas por electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE) de aproximadamente 80,000-146,000 Da, dependiendo de la subunidad de glutenina y del sistema de gel empleado (Bunce y col., 1985; Mills y col., 2000). Se han identificado unas 30 variantes de HMW-GS por SDS-PAGE, con 3, 4, o 5 subunidades presentes en cada variedad de trigo (Ng y Bushuk, 1989, en Mills y col., 2000), (Fig. 4). Las masas moleculares relativas (M_r s) verdaderos determinados por secuenciación de aminoácidos son mucho más bajos, están en el rango de 60,000 a 90,000 Da (Anderson y Green, 1989; Pomeranz, 1990).

Estructura de las HMW-GS

Las HMW-GS están constituidas por dos dominios no repetitivos. El dominio amino terminal (N), tiene de 88 – 104 residuos de aminoácidos y el dominio carboxilo terminal (C), tiene 42 residuos, los dos dominios están separados por un gran dominio repetitivo, constituido por 481-690 residuos. Este dominio repetitivo es responsable de la variación en el tamaño de la proteína completa (constituye el 75-85 %), y está formado por repeticiones al azar y entremezcladas de hexapéptidos y nonapéptidos, así como de tripéptidos presentes sólo en las subunidades tipo x (Fig.5).

Los dominios terminales amino y carboxilo son predominantemente α helicoidales, mientras que el dominio repetitivo central es rico en giros β . Estos dominios contienen la mayoría de los residuos de cisteína presentes en las HMW-GS y se presume que forman la base molecular del papel que juegan estas subunidades en la funcionalidad del gluten. El dominio repetitivo central es de naturaleza hidrofílica y los dominios terminales amino y carboxilo, tienen características hidrofóbicas (Shewry y col., 1989).

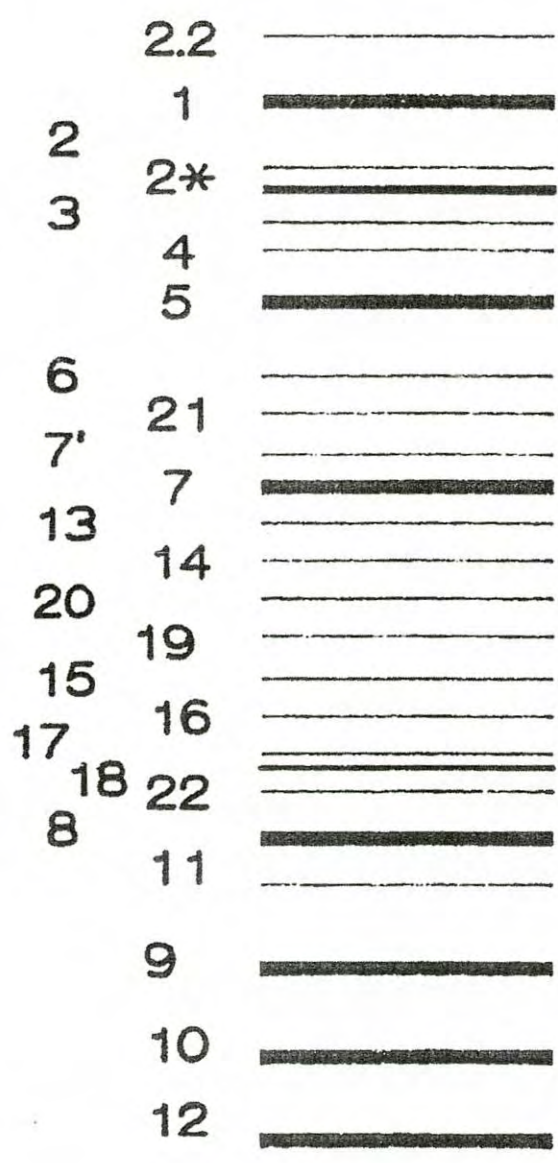


Figura 4. Subunidades de Gluteninas de Masa Molecular Alta.

Fuente: Ng y Bushuk (1989).

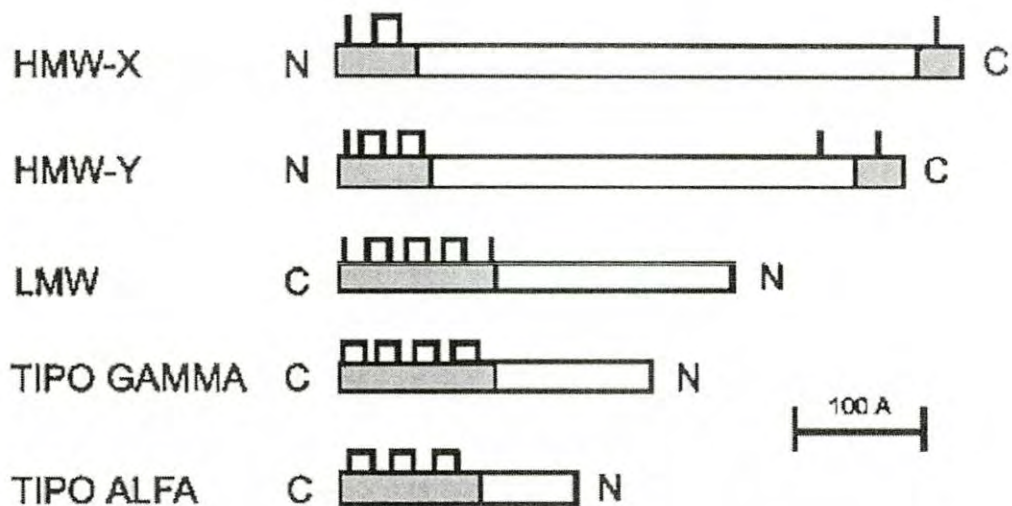


Figura 5. Representación esquemática de subunidades de glutenina de masa molecular alta, tipo x y subunidades de glutenina de masa molecular baja, tipo y. LMW-GS, gliadinas tipo gamma (γ) y tipo alfa (α). El área sombreada representa la secuencia única y el área blanca representa la secuencia repetitiva. Las barras negras representan los enlaces disulfuro intermoleculares y las barras negras unidas representan los enlaces disulfuro intramoleculares; N, terminal amino; C, terminal Carboxilo.

Fuente: Pomeranz (1994).

Estudios biofísicos han mostrado que las subunidades individuales tienen una forma extendida como bastón o caña de pescar, debida a muchas secuencias repetidas de aminoácidos (principalmente glutamina, prolina, glicina y tirosina), que forman una estructura espiral suelta (Field y col., 1987; Shewry y col., 1992; Mills y col., 2000). Estas secuencias repetitivas difieren ligeramente entre las subunidades tipo "x" y "y" (Shewry y col., 1989). Una diferencia muy notable es el número de residuos de cisteína en su estructura primaria. Las subunidades tipo "x", tienen 3 o 4 cisteínas localizadas cerca del extremo N-terminal y una cerca del extremo C-terminal de la molécula de proteína, mientras que las subunidades tipo "y" tienen 5 cisteínas cerca del extremo amino-terminal y 2 cerca del extremo carboxilo-terminal (Greene y Anderson, 1989; Shewry y col., 1989), con las que participan en enlaces disulfuro intermoleculares, pero no se sabe si participan con enlaces disulfuro de manera intramolecular.

Las Proteínas como Determinantes de Calidad en trigo

Contenido de Proteína

Las propiedades únicas de la harina de trigo para formar una masa con propiedades viscoelásticas que son esenciales en la elaboración de pan y de muchos otros productos alimenticios, se deben principalmente a las proteínas del gluten (Shewry, 1996). Por esta razón, el contenido de proteína es el atributo más importante en la composición del trigo, determinando su valor en el mercado y la calidad en el procesamiento. Se ha estimado que el contenido de proteína del trigo, varía en el rango de 9 % - 16 %. Este porcentaje depende de la variedad de trigo y de las condiciones ambientales durante el crecimiento de la planta. Sin embargo, el contenido de proteína solamente es un factor a través del cual puede verse la calidad del trigo proporcionando una visión incompleta que puede ampliarse para predecir, calidad en el procesamiento, considerando: contenido de aminoácidos (indicadores el valor alimenticio), contenido de gluten (mejor que contenido de proteína total), relación gliadina:glutenina

(proporcionando conocimiento de la calidad del gluten) y la distribución del tamaño de las cadenas del polímero de glutenina (probablemente el mejor indicador de la fuerza de la masa) (Wrigley y Lookhart, 1990). Esto se debe a que la calidad en el procesamiento es determinada por la estructura molecular de las proteínas de almacenamiento del trigo, las cuales controlan las interacciones de la proteína durante el proceso de elaboración de pan (Bushuk 1998; Shewry y col., 1999 (en Gianibelli y col., 2001).

Relación Gliadina-Glutenina

La principal distinción entre los dos tipos de proteínas del gluten fue demostrada por Osborne (1907), con base en la solubilidad de la proteína gliadina en etanol acuoso, comparada con la insolubilidad extrema de la glutenina nativa.

Actualmente se conoce que la principal diferencia es el tamaño molecular de estos dos componentes, lo que explica la diferencia en solubilidad; principalmente porque los polipéptidos de gliadina se encuentran en el gluten como cadenas simples, con enlaces disulfuro formados entre cisteínas del mismo polipéptido. Por otro lado, muchos de los enlaces disulfuro del complejo de glutenina se forman entre diferentes polipéptidos, resultando moléculas muy grandes, con pesos moleculares en el rango de 10-20 millones de Daltones (Wrigley y Lookhart, 1990).

La relación entre proteínas del gluten monoméricas (gliadinas) y poliméricas (gluteninas), ha sido determinada por extracción selectiva con solventes. Sin embargo, este método no es suficiente para las necesidades analíticas modernas, ya que da resultados de una pobre reproducibilidad. Por ejemplo, Tracey (1967) estableció la relación gliadina:glutenina en el rango de 0.3 – 4.0. Un Análisis más detallados de la relación gliadina a glutenina son proporcionados por métodos de fraccionamiento en base a tamaño, tales como:

cromatografía líquida de alta resolución - exclusión molecular (SE-HPLC por sus siglas en inglés), electroforesis desnaturalizante (SDS-gel electrophoresis), no reductora, preferentemente con geles de poro grande en la versión conocida como electroforesis en gel múltiple de aglomeración (multi-stacking gel electrophoresis); extracción de las proteínas del gluten en detergente (SDS), sin agentes reductores y luego con sonicación para aumentar la dispersión; fraccionamiento de flujo de campo (FFF, por sus siglas en inglés) y electroforesis capilar de zona (CZE, por sus siglas en inglés). Las descripciones de todos estos métodos se encuentran en una revisión de Lookhart y Bean (1996) y Lookhart (1997). La distribución por tamaño de las proteínas del gluten, sugiere que el tamaño aparente de corte de 100,000 daltones es la línea divisoria entre gliadinas monoméricas y gluteninas poliméricas.

Relación de las HMW-GS con la Calidad del Trigo

Las proteínas del gluten de trigo son cruciales para la elaboración de pan y para otros usos en alimentos debido a que confieren propiedades reológicas únicas: una combinación de elasticidad y flujo viscoso a las masas.

Las gliadinas y las gluteninas contribuyen a las propiedades reológicas del gluten y de la masa (Humphris y col., 2000). Los dos grupos de proteínas tienen diferentes propiedades biofísicas: La gliadina es cohesiva, extensible, pero con baja elasticidad; mientras que la glutenina es de baja extensibilidad, pero es cohesiva y elástica, por lo tanto contribuye a la fuerza de la masa (Humphris y col., 2000).

El entendimiento más preciso de las bases fundamentales de los componentes que determinan la calidad en la elaboración de pan se han enfocado con mucha atención en la fracción de glutenina. La estructura molecular de la glutenina y sus subunidades ha sido revisada extensamente.

Cada variedad de trigo tiene una composición química característica que en algunos casos puede ser similar; en estudios anteriores se ha comprobado que estas diferencias en composición están relacionadas directamente con la calidad del producto final (Shewry y col., 1992).

Para confirmar la calidad del trigo se ha realizado un monitoreo de las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) por electroforesis (SDS-PAGE), por cromatografía de alta resolución fase reversa (RP- HPLC) y por electroforesis capilar (CE). Se han publicado varios métodos para extracción y purificación de proteínas de trigos panaderos, los cuales fueron dirigidos para separar a las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) de las subunidades de masa molecular baja (LMW-GS) (Capocchi y col., 2000).

Las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) son los componentes menores en términos de cantidad (8-10 % del total de las proteínas extraídas de la harina), pero son factor clave en el proceso de elaboración de pan, siendo los principales determinantes de la elasticidad del gluten (Tatham y col., 1985), ya que al parecer promueven la formación de grandes polímeros de glutenina (Halford y col., 1992).

En estudios realizados en la década de los 80's fue descrita la correlación de subunidades específicas de masa molecular alta de las proteínas del gluten con la calidad en la elaboración de pan de estos trigos. También se han realizado otros estudios de los que existe gran evidencia de la correlación de la proporción de polímeros de gluteninas de masa molecular alta con la calidad en la elaboración de pan. Sin embargo, algunas variedades de trigo tienen mayor calidad que la esperada en base a su composición de subunidades de masa molecular alta, mientras que otras tienen calidad inesperadamente baja. Estas evidencias indican que las subunidades de glutenina de masa molecular alta no son el único factor que influye en la calidad de algunas variedades de trigo.

La variación alélica en la composición de las HMW-GS, está también asociada con diferencias en elasticidad, lo que implica que estas subunidades juegan un papel crucial en el mecanismo elástico. Sin embargo las bases moleculares para este papel permanecen sin aclarar (Shewry y col., 1992).

La estructura de espiral suelta del dominio repetitivo central, puede contribuir al mecanismo elástico pero es probable que interacciones de entrecruzamiento de enlaces disulfuro y enlaces no covalentes de hidrógeno entre subunidades individuales estén también involucradas (Shewry y col., 1992; Mills y col., 2000).

Algunas HMW-GS están asociadas estrechamente con calidad en la elaboración de pan. Ciertas subunidades imparten diferentes efectos en la calidad del gluten. Un ejemplo es la variación alélica del locus Glu-1D de trigos panaderos, en donde fueron identificadas el par de subunidades 5 + 10 asociadas con buena calidad y el par de subunidades 2 + 12 asociadas con calidad débil de la masa (Payne y col., 1981). Tales resultados han sido confirmados en varios laboratorios. Branlard y Dardevet (1985), reportaron que los parámetros alveográficos W (fuerza del gluten), P (tenacidad) y el valor de sedimentación de Seleny correlacionan positivamente con las subunidades 7 + 9 y 5 + 10, y negativamente con las bandas 2 + 12, mientras que la subunidad 1 correlaciona con W, y la subunidad 2* y 17 + 18 con G (extensibilidad).

Similares resultados han sido encontrados para otros pares alélicos (Glu-B1, subunidades 17 + 18 fuertes, contra subunidades 20x + 20y débiles. Estas diferencias en la fuerza de la masa se deben a las diferencias en el tamaño molecular de los polímeros de glutenina deducidos de las mediciones de solubilidad (Gupta y Mac Ritchie, 1994). En particular, la habilidad de las HMW-GS de formar polímeros unidos por enlaces disulfuro con Mr de varios millones de daltones (1×10^6 o posiblemente 1×10^7), puede contribuir a la viscoelasticidad del gluten (Mills y col., 2000).

El origen de las diferencias alélicas no ha sido bien establecido. Sin embargo, hay evidencias de que los enlaces disulfuro entre las subunidades de masa molecular alta no son al azar (Shewry y tatham, 1997) y se ha sugerido que el residuo de cisteína extra presente en el dominio repetitivo de la subunidad 1Dx5, es responsable, en parte al menos, de la calidad asociada con las subunidades 1Dx5 + 1Dy10 cuando se comparan con las subunidades 1Dx2 + 1Dy12 (Anderson y Greene, 1989; Kasarda, 1999). Además, es probable que la cantidad de subunidades de masa molecular alta presentes en una variedad de trigo sea también importante en la determinación de la viscoelasticidad del gluten (Halford y col., 1992; Kolster y col., 1993; Mills y col., 2000), efecto que puede contribuir a la alta calidad asociada con la expresión de una subunidad 1Ax (Halford y col., 1992).

El residuo extra de cisteína (cys⁹⁷) presente en el dominio repetitivo de la subunidad 1Dx5, no está presente en la subunidad alélica de "baja calidad" 1Dx2 (Anderson y Greene, 1989; Pfluger y col., 2001). La subunidad 1Dx5 está asociada positivamente con calidad y es la única subunidad de masa molecular alta (HMW), caracterizada a la fecha, que tiene un residuo de cisteína al final de dominio repetitivo N-terminal. Por ello, se ha sugerido que este residuo puede jugar un papel importante dando lugar al mayor entrecruzamiento (Shewry y col., 1992). La predicción de la estructura secundaria sugiere que la cisteína⁹⁷ se localiza en una vuelta o giro beta y está expuesta a solventes. Por lo tanto, podría tener capacidad para participar en la formación de los dos tipos de enlaces disulfuro, intra o intermoleculares (Anderson y Greene, 1991).

Tao y col., (1992) y Werner y col., (1992) han indicado que la subunidad 1Dx5 puede formar al menos un enlace disulfuro intramolecular, pero que esto se debe a las cisteínas que están en el dominio C-terminal involucradas en la formación de enlaces disulfuro con la región N-terminal de las subunidades tipo- y Sin embargo es posible que cys⁹⁷ esté involucrada en enlaces disulfuro intercadena que son rotos por reducción parcial usada para liberar los dímeros

del gluten, y/o estar presente en el gluten en una forma reducida. Tales grupos sulfhidrilo libres son altamente reactivos y han mostrado participar en reacciones de intercambio de disulfuro (Freedman, 1979), que se piensa ocurren durante prueba y mezclado de la masa.

La cisteína⁹⁷ de la subunidad de masa molecular alta 1Dx5 puede estar involucrada en un proceso donde los enlaces disulfuro en los polímeros son arreglados durante el procesamiento y su confirmación no depende del aislamiento de péptidos que contienen cys⁹⁷ en cualquier enlace disulfuro y/o forma reducida (Lafiandra y col., 1993; Pfluger y col., 2001).

Calificación de Calidad Panadera

Las subunidades de glutenina de masa molecular alta correlacionan con aspectos de calidad. La caracterización de alelos de las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) y los estudios relacionados con calidad, han mostrado que estas subunidades contribuyen de una manera importante en la elaboración de pan de buena calidad (Payne y Cornfield 1979, 1984; Shewry y col., 1989). El grado de variación en calidad se atribuye a la variación en las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) entre variedades o líneas de producción en un rango del 67 % (Payne y col. 1987) al 13 % (Rousset y col., 1992), para diferentes grupos de materiales. La selección de alelos de subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) se asocia con calidad alta en líneas de producción, y es una práctica común en el Reino Unido. Esta se basa en la correlación de calidad entre las HMW-GS individuales, para predecir las mezclas de variedades y calidad en la elaboración de pan, de acuerdo a los valores de calidad ideados por Payne y col., (1987).

Este sistema de calificación para las HMW-GS fue desarrollado con base en el análisis de gran número de variedades (Payne y col., 1987) en el cual a las subunidades individuales se les asignan números basados en evaluaciones de

calidad (Fig. 6). A una variedad dada se le puede entonces asignar una calificación Glu-1, la cual es la suma de las contribuciones de los tres loci HMW-GS. Las calificaciones de las HMW-GS tienen mayor influencia en algunos grupos de trigos que en otros (MacRitchie y col., 1990), esto puede deberse a la compleja interacción de factores que definen la calidad del trigo. Estos factores, en los cuales las HMW-GS tienen un papel principal, también incluyen LMW-GS, gliadinas y estrés abiótico. Un aspecto que algunas veces se olvida cuando se usa este sistema de calificación, es que las subunidades con la misma movilidad electroforética en SDS-PAGE, difieren en algunos otros aspectos, como diferencias pequeñas en sus secuencias de aminoácidos e hidrofobicidades de superficie. Por ejemplo, después que se estableció el sistema de calificación de calidad (Calificación Glu-1), Sutton (1991) encontró diferencias en el tiempo de retención, para la subunidad 8 en algunas variedades, en RP-HPLC. El autor concluyó que dos diferentes subunidades 8 estaban involucradas (8 y 8*); También, diferentes movilidades electroforéticas fueron reportadas para la subunidad 7 (7 y 7*). Por lo tanto, 4 diferentes alelos son esperados para este par: 7+8, 7* + 8, 7 + 8*, 7* + 8*. (Marchylo y col., 1992). Interesantemente, hay contrastantes efectos en calidad con estos pares y la calificación original dada para el par 7 + 8.

La evolución en la separación de los genes tipo x y tipo y ha aumentado las múltiples formas alélicas de las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS). Debido a la estrecha relación de los genes tipo x y tipo y, pocas veces recombinan en cruza de tal manera que esos pares específicos de proteína usualmente se expresan juntos. Por ejemplo la subunidad 5 y la subunidad 10 codificadas por Glu-D1 generalmente se expresan juntas, así como lo hacen las subunidades 2 y 12, de este modo el alelo 5+10 es el equivalente al alelo 2+12 (Payne 1987), es decir solo un par de esas subunidades puede ser expresada, dando una variedad homocigota. Actualmente se reconocen 6 alelos en el locus Glu-1D, todos correspondientes a pares de subunidades de proteína; al locus glu-B1 corresponden 11 alelos, de los cuales 7 corresponden a pares y los otros

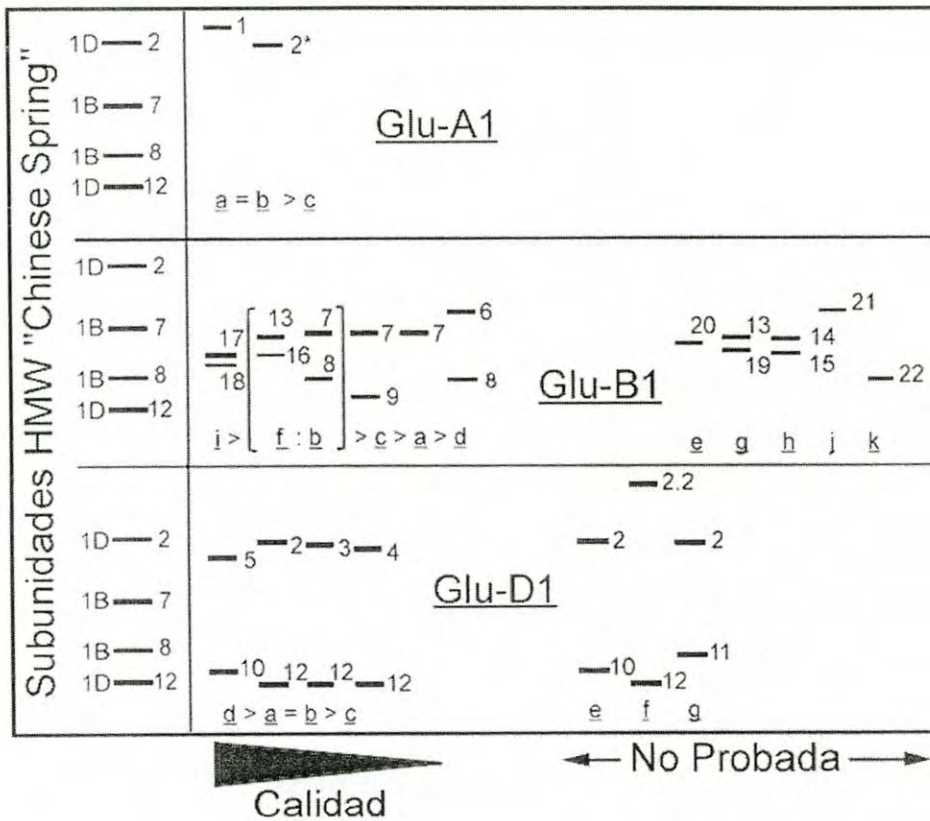


Fig. 6. Variación alélica en HMW-GS para los loci de los tres genomas (Glu-A1, B1 y D1) y su relación con calidad en la elaboración de pan, con base en fraccionamiento por SDS-PAGE (Payne, 1984).
Fuente: Gianibelli (2001).

son expresados como subunidades simples; a Glu-A1 corresponden dos alelos, ambos representados por una subunidad individual, 1 o 2* (Payne y col., 1984). Los alelos del locus 1B, dan lugar a una subunidad individual de masa molecular alta que al parecer no es importante en las variedades de trigo de los Estados Unidos. Para los cromosomas 1A la presencia de subunidades 1Ax1 o 1Ax2* está asociada positivamente con calidad en la elaboración de pan. Sin embargo, debido a que los genes para las subunidades tipo x y tipo y, están estrechamente ligados, no es posible determinar la calificación de calidad para todas las subunidades individuales presentes en los pares alélicos (Shewry y col., 1992).

Además de la variación en el número de subunidades, hay también considerable variación alélica en la movilidad electroforética de las subunidades de masa molecular alta, aunque un número relativamente pequeño de estas variantes está presente en trigos comerciales (Mills y col., 2000). Por consecuencia, tal como se indicó por el número de bandas en los patrones SDS-PAGE, la mayoría de las variedades de trigo expresan 4 o 5 HMW-GS aunque hay pocas variedades en las cuales sólo uno de los genes 1B se expresa (generalmente el tipo-x) y esas variedades consecuentemente pueden tener solo 3 o 4 HMW-GS en sus patrones electroforéticos; así, si una variedad expresa más de 5 bandas en electroforesis (SDS-PAGE) puede ser una mezcla de genotipos.

Se han realizado estudios de correlación de HMW-GS y características de calidad a través de los años 1980's en un gran número de trigos cultivados en muchos países. Payne, (1987) describió un amplio rango de resultados de los diferentes países. Estos resultados mostraron el significado de la baja calificación obtenida para los grupos de trigos europeos (especialmente el Reino Unido con una significado de calificación de 5.2, Dinamarca con 5.6, Francia y oeste de Alemania con 5.8), comparando el significado de calificaciones de trigos de otros países que se acercaron o aproximaron al máximo de 10 (Por

ejemplo; 9.5 para Argentina). Payne (1987) también examinó el resultado de una calificación de 7.9 para trigos Rusos. Khan y col. (1989), han proporcionado la calificación de calidad para 80 trigos de Dakota del norte, región de los Estados Unidos. El resultado de la calificación fue 9.3. La mayoría tiene alelos 5+10 y 2*, posiblemente indicando la selección de subunidades relacionadas con alta fuerza de la masa.

La estimación independiente de la calificación de calidad (calificación *Glu-1*), de 104 trigos Australianos, basados casi totalmente en los análisis realizados por Lawrence (1986), produjo una calificación significativa de 8.1, pero en este caso muchos de los mejores trigos para la elaboración de pan tenían las subunidades 2+12 del *Glu-1D*, con subunidades tales como 17+18 y 1 o 2* del Loci IB y IA. Esto explica porque los primeros estudios de las subunidades HMW de trigos Australianos por Wrigley y col. (1982) arrojaron resultados diferentes a los basados en otros genotipos y porqué la variación en otras clases de proteínas (Gliadinas y LMW-GS), podía ser más importante en esos trigos que en otros.

Todos los estudios indicaron que las subunidades de masa molecular alta contribuyen en parte a la variación en las correlaciones de la calidad de la masa. Algunos indicaron que las correlaciones pueden ser impartidas también por incorporación de los resultados de la composición de la proteína gliadina (por ejemplo, Branlard y Dardevet, 1985). El examen posterior de los grupos de trigos Británicos y del oeste de Alemania, mostró que las gliadinas toman parte en la variación significativa en calidad en la elaboración de pan, pero su contribución no es tan grande como la debida a la composición de gluteninas de masa molecular alta. Los trabajos indican que de acuerdo a su efecto en calidad en la elaboración de pan; *Glu-1*, tiene más efecto que *Gli-1*, el cual tiene más efecto que *Gli-2* (Pomeranz, 1990).

Como un resultado de líneas de sustitución de cromosomas, se concluye que las proteínas de cada uno de estos tres loci son importantes para la calidad del grano y que el efecto de una subunidad particular HMW, puede depender del contexto genético en que esté presente (Pomeranz, 1990). La composición de HMW-GS es un predictor útil de calidad en la elaboración de pan.

Interacción Molecular y Funcionalidad

En las proteínas uno de los enlaces más importantes de naturaleza no covalente es el enlace de hidrógeno, también son de gran importancia las interacciones hidrofóbicas y los puentes disulfuro, estos últimos de naturaleza covalente (Stryer, 1995).

Las principales características de los dos tipos principales de proteínas del gluten que contribuyen a la estructura de la masa son: La composición de aminoácidos, el peso molecular (la distribución del peso molecular), y la presencia de estructuras secundarias regulares. Esas características ejercen sus contribuciones vía enlazamiento molecular, por medio de interacciones entre las proteínas (gliadina-gliadina, gliadina-glutenina, y glutenina-glutenina) contribuyendo significativamente a las propiedades reológicas de las masas.

Los aminoácidos glutamina/ácido glutámico y prolina juntos contribuyen con aproximadamente el 50 % de los residuos presentes en las proteínas del gluten (Charbonnier y Moose, 1980); la glutamina es responsable del mayor contenido amida. Relativamente existen grandes cantidades de aminoácidos aromáticos o no polares, tales como fenilalanina, leucina e isoleucina, los cuales son capaces de tomar parte en las interacciones hidrofóbicas. Los enlaces iónicos son pocos en las proteínas del gluten debido al bajo contenido de lisina, histidina y residuos de arginina, y por tanto las cadenas laterales amida y las no polares tienen gran oportunidad para influenciar las propiedades de la proteína.

La cisteína presente está disponible para formar (como cistina) enlaces disulfuro intra e intermoleculares (Charbonnier y Moose, 1980).

La proteína glutenina participa en enlaces disulfuro intermoleculares; de hecho, el tratamiento con agentes reductores (tales como el 2-mercaptoetanol) disminuye significativamente el peso molecular y cambia las características electroforéticas de la glutenina (Bietz and Wall, 1972); además, las gluteninas reducidas pierden su elasticidad y cohesividad. Muchos estudios han verificado que las interacciones disulfuro en las gluteninas son predominantemente de tipo intermolecular y que son cruciales para su estructura nativa (Lasztity, 1984).

Además de los enlaces disulfuro otro tipo de interacciones son importantes e imparten a las proteínas del gluten sus propiedades funcionales. Esto se ha demostrado en gliadinas por estudios de su comportamiento de agregación. Holme y Briggs, (1959), especularon, que en contacto con agua, la atracción intermolecular de las gliadinas, involucró enlaces de hidrógeno de los grupos amida de la proteína, que permitieron formar la masa hidratada característica. La presencia de enlazamiento intermolecular amida se demostró por deamidación de la proteína, lo que causó su precipitación a un pH ácido donde la gliadina nativa tuvo condiciones de solubilidad. Beckwith y col. (1963), proporcionaron evidencias de la asociación de proteínas a través de grupos amida.

Se añaden a esta lista de importantes tipos de enlaces, las interacciones de las proteínas del gluten con otros componentes de la harina, tales como lípidos, carbohidratos solubles, almidón y proteínas solubles. Todos estos tipos de enlaces e interacciones pueden ser conservados en cualquier evaluación de componentes fraccionados de la harina, restringiendo grandemente las técnicas admisibles en estudios de fraccionación-reconstitución, para la valoración directa de la calidad en relación a proteínas (Weegels y col., 1996).

Interacciones hidrofóbicas

La hidrofobicidad puede definirse como la repulsión entre un compuesto no polar y un medio polar tal como el agua (Dill, 1990). Así, la tendencia de los solutos no polares para adherirse unos a otros en un medio acuoso es llamada hidrofobicidad (Alizadeh-Pasdar y Li-Chan, 2000).

La interacción hidrofóbica involucra varios aspectos fisicoquímicos y termodinámicos y puede ser entendida a escala macroscópica como una consecuencia del inmoderado gusto de las moléculas de agua por sí mismas, o más bien para el término hidrofóbico, como una antipatía de las cadenas no polares por el agua (Bietz y Kruger, 1994; Stryer, 1995). Los grupos no polares son incapaces de formar puentes de hidrógeno con el agua y por lo tanto se resisten a disolverse en ella (Bietz y Kruger, 1994). La introducción de una sola molécula no polar en el seno del agua da como resultado una condición energéticamente desfavorable. Las fuerzas hidrofóbicas del compuesto rodean al agua en una estructura ordenada formando una cavidad que interrumpe algunos puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua. Las moléculas así dispersas se reorientan y tienden a formar el máximo de nuevos puentes de hidrógeno. Esto se consigue pero a un cierto costo: Las posibilidades de formación de puentes de hidrógeno favorables en la cavidad acuosa que rodea a la molécula no polar son aquí mucho menores que en el agua pura. Las moléculas de agua que rodean a la molécula no polar están mucho más ordenadas de modo que la entropía de la solución disminuye. Si ahora se considera la ordenación de dos moléculas no polares en agua encontraremos que se sitúan en una sola cavidad mayor, es decir las moléculas no polares se agregan espontáneamente; esta agregación se debe a las interacciones hidrofóbicas. Esta asociación se favorece por la liberación de parte de las moléculas de agua ordenadas que rodeaban a las dos moléculas no polares separadas. De este modo la base de la interacción hidrofóbica radica en el

aumento de entropía que resulta del incremento de libertad de las moléculas de agua liberadas (Hubert y Dellachaerie, 1993; Stryer, 1995).

Las interacciones hidrofóbicas son fenómenos que tienen gran importancia en los sistemas biológicos. Son las fuerzas principales que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas (Queiroz y col., 2001) y juegan un importante papel en otros procesos biológicos como en las reacciones antígeno-anticuerpo; en la formación del complejo enzima-sustrato, en el plegamiento de las proteínas globulares; en el enlace de moléculas pequeñas a las proteínas para asegurar su transporte en la sangre, en el reconocimiento de hormonas peptídicas o esteroides por sus receptores, contribuyendo al mantenimiento de la estructura de la bicapa de lípidos de las membranas biológicas y a la unión de proteínas a estas membranas (Hubert y Dellacherie, 1993; Kennedy, 1990).

Evaluación de la Hidrofobicidad de las Proteínas del Gluten

La hidrofobicidad es considerada un factor importante en la determinación de la estructura nativa de las proteínas. Los aminoácidos no polares (por ejemplo, fenilalanina, triptofano, valina) están frecuentemente en la superficie de las proteínas (Queiroz y col., 2001). El grado de hidrofobicidad de una proteína depende de la suma de las hidrofobicidades de los aminoácidos expuestos y no expuestos. Hay varias escalas de hidrofobicidad de aminoácidos basadas en diferentes estudios: Nozaki y Tanford (1971), midieron las solubilidades de aminoácidos individuales en agua y aumentando progresivamente la concentración de solventes orgánicos, obteniendo una escala de hidrofobicidad para los diferentes aminoácidos. Otro estudio se basa en localizar los aminoácidos presentes en la superficie de un número de proteínas conocidas y sus grupos laterales, por medio de difracción de rayos x (Chothia, 1976) y la fracción de aminoácidos que están ocultos en la proteína (Wetz y Scheraga, 1978). Para los aminoácidos anfifílicos (por ejemplo arginina, ácido glutámico,

lisina), Eisenberg y McLachlan (1986) sugirieron una escala basada en las hidrofobicidades de cada átomo individual. Wilce y col. (1991,1995), publicaron un estudio de los tiempos de retención de aminoácidos y péptidos en fase reversa-HPLC.

Kinsella y Hale (1984), estudiaron el efecto de los aniones de la serie de Hofmeister en la consistencia de la masa. Los resultados mostraron que los diferentes aniones alteraron la consistencia de la masa. Se observó que mientras Cl^- y Br^- mejoran la estabilidad de la masa, los aniones caotrópicos ClO_4^- y SCN^- debilitan las interacciones hidrofóbicas facilitando el desdoblamiento, hidratación y solubilización de los polipéptidos de manera similar a la urea. La acción específica de los aniones caotrópicos indicó la importancia de las interacciones hidrofóbicas y de los enlaces de hidrógeno sobre las propiedades viscoelásticas del gluten.

El número de aminoácidos hidrofóbicos, su diferente distribución e hidrofobicidad, son características de cada proteína, así que una separación específica puede ser posible con soportes o matrices hidrofóbicas (Queiroz y col., 2001). Por lo tanto, la variación en la hidrofobicidad de las proteínas proporciona un medio por el cual estas biomoléculas pueden ser fraccionadas.

Se reconoce que la hidrofobicidad se relaciona significativamente con las propiedades funcionales de las proteínas (Nakai, 1983). Por lo tanto, la evaluación de la hidrofobicidad de las proteínas y de los péptidos es de interés para entender las propiedades funcionales de las proteínas del gluten de trigo en relación a su utilización, debido a que estas propiedades, además de los enlaces disulfuro y puentes de hidrógeno, hacen una contribución importante a la estructura, agregación y viscoelasticidad del gluten (Bushuk y Kawka, 1990; Popineau y Feillet, 1990). Las propiedades de emulsificación y espumado de proteínas de trigo e hidrolizado de gluten, también dependen de la

hidrofobicidad, que en gran medida determina las propiedades de superficie de las proteínas.

La hidrofobicidad de superficie de las proteínas del gluten, ha sido estudiada usando diferentes métodos. Greene y Kasarda (1971), Popineau y Pineau (1987), utilizaron sondas hidrofóbicas para estudiar gliadinas. Además de utilizar métodos cromatográficos, utilizaron el método de enlazamiento a ligando apolar para determinar la hidrofobicidad superficial de los componentes de las gliadinas purificadas escogiendo como ligando hidrofóbico al 2-p-toluidinilnaftaleno-6-sulfonato (TNS). En esta prueba fluorescente, el TNS interactúa con las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas. El enlazamiento del TNS a la proteína puede medirse por la fluorescencia inducida y por la absorbancia a 317 nm. El enlazamiento a ligando apolar es tardado, pero proporciona información sobre la hidrofobicidad de la proteína y permite el control de su estructura. Preston (1989), estudió la agregación de las proteínas del gluten en presencia de sales neutras de la serie liotrópica. En un estudio reciente (Bean y Lookhart, 1998) explicaron la extracción selectiva de subunidades de glutenina de masa molecular alta, en presencia de sales no caotrópicas con la agregación de gliadinas monoméricas. El estudio de la hidrofobicidad superficial de las gluteninas estabilizadas puede ayudar a entender el papel de las interacciones no covalentes en la funcionalidad de estas proteínas.

Para estudiar la hidrofobicidad de las proteínas del gluten, también se ha utilizado la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y la cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC) las cuales fraccionan las proteínas de acuerdo a sus diferencias de hidrofobicidad. El análisis termodinámico de HIC produce esencialmente los mismos resultados que los obtenidos con otros procesos basados en las interacciones hidrofóbicas. (Vailaya y Horváth, 1996).

La interpretación de los parámetros de interacción hidrofóbica de acuerdo con la teoría de Melander y Horvath (1977), permite una evaluación cuantitativa de hidrofobicidad proteica (El Rasi y Horvath, 1986; Fausnaugh y Regnier, 1986). También es posible comparar los dos factores involucrados en las interacciones hidrofóbicas de las proteínas: El área de contacto (por ejemplo, la superficie hidrofóbica de proteínas) determinada principalmente por la conformación proteica (Wu y col., 1986) y, la fuerza de las interacciones, relacionada directamente a la composición y secuencia de aminoácidos de superficies hidrofóbicas accesibles.

La cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa también se ha usado para estudiar la hidrofobicidad de las proteínas del gluten (Bornouf y Bietz 1985). La contribución más importante de esta metodología ha sido la identificación y cuantificación de especies de las proteínas que resulta muy útil en la identificación de variedades (Huebner y Bietz, 1994 a) y en la relación de los grupos de proteínas con calidad (Huebner y Bietz, 1994; Wieser y col., 1994). La cromatografía líquida de alta resolución fase reversa también se ha usado para relacionar una hidrofobicidad alta de gliadinas gamma con volumen de pan y valor de sedimentación de Zeleny (Van Lonkhuijsen (1992). Huebner y col. (1997) también encontraron una correlación muy alta (0.93) entre gamma gliadinas y volumen de pan.

Cadwell (1979), Popineau y Pineau (1987), Popineau y Godon, (1982) usaron con éxito la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para fraccionar y estudiar la hidrofobicidad de superficie de gliadinas. En condiciones que favorecen la agregación, la hidrofobicidad superficial de gliadinas disminuye; esto significa, que las interacciones hidrofóbicas pueden estar involucradas en la asociación de monómeros (Popineau y Pineau, 1988).

Chung y Pomeranz (1978) mostraron que las proteínas de harina de buena calidad de panificación interactúan más fuertemente con lípidos que

aquellas de harina de menor calidad. Ellos sugirieron que la contribución de las gluteninas a las propiedades de la masa involucra interacciones hidrofóbicas. En otro estudio Chung y Pomeranz (1979) usaron HIC en fenil sefarosa como matriz para separar gluteninas solubles, y encontraron que las gluteninas de harinas de baja calidad eran menos hidrofóbicas que las de buena calidad. Magnus y Khan (1992), encontraron resultados similares cuando separaron gluteninas reducidas y alquiladas, usando fenil sefarosa.

Kinsella y Hale (1984), fueron los primeros en indicar la importancia de la hidrofobicidad de superficie de las proteínas del gluten en la hidratación y tiempo de mezclado. Ellos explicaron el efecto de sales neutras simples en el tiempo de desarrollo de la masa como un efecto de interacciones hidrofóbicas acentuadas.

En un estudio realizado por Torres y col. (2000), las gliadinas y las gluteninas solubles en ácido fueron fraccionadas de acuerdo a su hidrofobicidad superficial, usando cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada. Las pequeñas cadenas acetilo, en la matriz de agarosa y la alta densidad de sustitución, se usaron como una alternativa a grupos fenilo o cadenas grandes alquilo de los productos comerciales. La fracción más hidrofóbica, llamada en este trabajo "índice de hidrofobicidad superficial", se relacionó con características reológicas específicas de las masas. Se ha demostrado que las subunidades de masa molecular alta que tienen una hidrofobicidad superficial mayor, contribuyen en mayor proporción a la calificación de calidad (Magnus y Khan, 1992).

La hidrofobicidad superficial de las proteínas de trigo ha sido reconocida como un factor importante en la interacción de estas proteínas entre sí y con otros componentes de la harina para formar la red de gluten hidratado (Hoseney y col., 1990).

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), fue introducida a principios de los años 70's por diversos investigadores y actualmente es una técnica poderosa de bioseparación tanto a escala industrial como de laboratorio para la purificación de una gran variedad de proteínas (Queiroz y col., 2001). Esta técnica aprovecha las propiedades hidrofóbicas de las proteínas para lograr su fraccionamiento promoviendo su separación en base a las interacciones hidrofóbicas entre ligandos hidrofóbicos inmovilizados y regiones no polares en la superficie de la proteína (Caldwell, 1979). La adsorción de proteína aumenta con una concentración alta de sal en la fase móvil y la elución se promueve disminuyendo la concentración de sal del eluyente (Melander y Horvath, 1977). Por lo tanto, a este tipo de cromatografía también se le llama "Adsorción promovida por sal" (Porath, 1986). Se pueden usar diferentes tipos de condiciones de elución para la purificación de mezclas complejas de proteínas que resultan difíciles de separar usando otras técnicas cromatográficas.

En la HIC, la fase estacionaria es de baja hidrofobicidad, de este modo, las proteínas se adsorben en un buffer acuoso de alta fuerza iónica y se eluyen por una disminución en el gradiente de la concentración de sal (Fausnaugh y Col., 1984). Este método preserva la conformación original de la proteína (Ingraham y Col., 1985). La cromatografía de interacción hidrofóbica se basa en la "superficie accesible" o "hidrofobicidad nativa" de las proteínas.

El desarrollo de una gran variedad de fases estacionarias para HIC ha promovido un amplio rango de aplicaciones en la purificación de biomoléculas, como proteínas del suero, proteínas del núcleo, hormonas, proteínas recombinantes y enzimas (Queiroz y col., 1999).

En la cromatografía de interacción hidrofóbica la muestra se aplica en una alta concentración de sal (por ejemplo, mayor de 1.7M de sulfato de

amonio). Las sustancias que se unen son eluidas en un paso o por un gradiente lineal en el amortiguador diluido. Puede requerirse un lavado final con agua pura o con un solvente orgánico miscible en agua (isopropanol, etanol, etc.), para remover la mayoría de los componentes hidrofóbicos.

El mecanismo de acción para todos los soportes en cromatografía de interacción hidrofóbica es el mismo. Los soportes para HIC usan ligandos hidrocarbonados pequeños de baja densidad como la fase estacionaria, en un esfuerzo por reducir el desdoblamiento irreversible de las proteínas y el enlazamiento debido a interacciones fuertes entre residuos hidrofóbicos internos y la columna. Como resultado, la cromatografía de interacción hidrofóbica ha mostrado ser un método cromatográfico no desnaturizante. Las muestras de proteína son inducidas a enlazarse a ese débil ligando hidrofóbico a través del uso de fases móviles con alta fuerza iónica.

La cromatografía de interacción hidrofóbica se ha utilizado para fraccionar a las proteínas con diferente hidrofobicidad, Cadwell en 1979 separaron gliadinas con octil y fenil sefarosa; Chung y Pomeranz (1979), usaron fenil sefarosa para separar gluteninas y encontraron que las gluteninas de harinas de baja calidad fueron menos hidrofóbicas que aquellas harinas de buena calidad. Resultados similares fueron encontrados por Magnus y Khan (1992), cuando separaron gluteninas reducidas y alquiladas, usando fenil sefarosa. Popineau y Pineau, en 1987 separaron gliadinas en cromatografía de interacción hidrofóbica y en cromatografía líquida de alta resolución fase reversa y establecieron una escala de hidrofobicidad para gliadinas.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa

El fraccionamiento de las proteínas de cereales por cromatografía líquida de alta presión es todavía un método reciente. Las primeras separaciones prácticas de proteínas de trigo y maíz por fase reversa (RP-HPLC) y exclusión

por tamaño (SE-HPLC), de alta resolución, fueron reportadas por Bietz 1983-1984. El rápido desarrollo de las técnicas y de las columnas empleadas, así como la rapidez, reproducibilidad y habilidad para la cuantificación adecuada de resultados, comparados con la electroforesis en gel, permitió que la HPLC se convirtiera en uno de los más importantes métodos usado por los investigadores para analizar proteínas de cereales (Huebner y Bietz, 1999).

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica potente para la purificación de péptidos no polares de peso molecular grande o pequeño, con elución mediante solventes polares. La filtración en gel y la cromatografía líquida de alta resolución - fase reversa se emplean juntas para purificar las mezclas complejas de los péptidos, obtenidas por digestión parcial de las proteínas; es también un método importante para la identificación rápida de trigo y otras variedades de cereales y para revelar diferencias en calidad (Huebner y Bietz, 1999).

Cromatografía de Fase Reversa

La cromatografía de fase reversa separa moléculas basándose en pequeñas diferencias en sus hidrofobicidades. Esto se logra generalmente en un medio acuoso/solvente orgánico. Las proteínas grandes tienden a desnaturalizarse bajo las condiciones de fase reversa, esto puede ser optimizado con el fin de mantener la integridad biológica, con la elección del medio apropiado y de condiciones de elución, incluyendo el tiempo de exposición a las condiciones potencialmente desnaturizantes, cuando los materiales provienen de fuentes naturales un problema común es la agregación. Afortunadamente, la fase móvil usada en la cromatografía de fase reversa es de baja polaridad y generalmente es buen solvente para usarse con esos polipéptidos.

El mecanismo de separación en la cromatografía de fase reversa, depende de la partición de las moléculas contenidas en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado. La naturaleza del enlazamiento en la interacción hidrofóbica es el resultado de un efecto de entropía favorable. Las condiciones iniciales de enlazamiento usadas en la fase móvil en cromatografía de fase reversa, son principalmente acuosas lo cual indica un alto grado de la estructura organizada del agua alrededor de la molécula de soluto y el ligando inmovilizado. Cuando el soluto está enlazado al ligando hidrofóbico inmovilizado, el área hidrofóbica expuesta al solvente se minimiza. Por lo tanto, el grado de estructura organizada del agua disminuye con un aumento favorable correspondiente en la entropía del sistema. De esta forma hay ventaja desde el punto de vista de energía para las partes hidrófobas; por ejemplo, soluto y ligando para asociarse (Tanford, 1961).

Las separaciones en cromatografía en fase reversa dependen de la adsorción/desorción reversible de las moléculas de soluto con variación de los grados de hidrofobicidad en relación a una fase estacionaria hidrofóbica. La técnica fue desarrollada en los años 60's para la separación de pequeñas moléculas orgánicas. En años recientes, con el advenimiento de medios de alta resolución e instrumentación, la cromatografía de fase reversa ha sido aplicada a la purificación de biomoléculas tales como péptidos, proteínas y oligonucleótidos.

Ventajas de la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica en Comparación con la Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa

En teoría, la cromatografía de interacción hidrofóbica y la cromatografía de fase reversa, son dos métodos de separación de cromatografía líquida, ambas se basan en interacciones entre los grupos hidrofóbicos no polares de una muestra y un grupo hidrofóbico inmovilizado.

En la cromatografía de interacción hidrofóbica, la matriz es hidrofílica y está sustituida con cadenas cortas de grupos no polares. La fase móvil es generalmente una solución salina. En la cromatografía de fase reversa, la matriz es sílica, que ha sido sustituida con cadenas largas n-alkilo, generalmente C8 (octal-silil) o C18 (octadecil-silil). La matriz es menos polar que la fase móvil. La fase móvil es generalmente una mezcla de agua y un modificador orgánico menos polar. Los sistemas de fase normal son aquellos en los cuales la matriz es sílica y la fase móvil es un solvente no polar, tal como el hexano. En consecuencia, el enlace de las proteínas a los adsorbentes en cromatografía de fase reversa, generalmente es muy fuerte y requiere el uso de solventes no polares para su elución (Kennedy, 1990).

En resumen, estos dos métodos son un camino alternativo de explotación de las propiedades hidrofóbicas de proteínas; la cromatografía de interacción hidrofóbica, depende de grupos hidrofóbicos en la superficie y es llevada a cabo bajo condiciones que mantienen la integridad de la molécula de proteína trabajando en ambientes más polares y menos desnaturizantes. La cromatografía de fase reversa, depende de la hidrofobicidad nativa de la proteína y es llevada a cabo bajo condiciones que exponen todos los grupos hidrofóbicos estrechamente a la matriz, por ejemplo, condiciones desnaturizantes (Kennedy, 1990).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de Harina de Trigo

Se utilizaron 25 muestras de harina de trigo rojo fuerte de invierno (HRW) que fueron proporcionadas por el Centro de Investigación de Producción y Mercadeo de Granos (Grain Marketing and Production Research Center) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Manhattan, Kansas. Estas muestras proceden de varias localidades de los Estados Unidos y comprenden diferentes variedades y líneas experimentales (Tabla II). También fueron proporcionados 10 estándares de harina de composición conocida, los cuales se utilizaron para la identificación de las subunidades de gluteninas de masa molecular alta de las 25 variedades de trigo rojo fuerte de invierno.

Esquema General de Trabajo

En la Fig. 7, se presenta el diagrama general que se utilizó para llevar a cabo el estudio el cual se dividió en las siguientes partes: la extracción de la harina para obtener las gluteninas de las muestras de harina; la utilización de electroforesis desnaturante y reductora (SDS-PAGE) para la caracterización de las subunidades de glutenina de masa molecular alta de las muestras de harina en sus correspondientes patrones electroforéticos; el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para la obtención de la distribución de las subunidades de glutenina de masa molecular alta en fracciones de diferente hidrofobicidad; la electroforesis desnaturante y reductora (SDS-PAGE) de las fracciones que provienen de la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y por último la correlación de resultados con las características de calidad en la elaboración de pan.

Tabla II. Muestras de Harina de Trigo Rojo Fuerte de Invierno* Utilizadas en el Estudio.

No. DE MUESTRA	VARIEDAD O LÍNEA EXPERIMENTAL	PROCEDENCIA
1	Prowers	Colorado
2	CO950043	Colorado
3	CO950379	Colorado
4	Karl 92	Kansas
5	Larned	Kansas
6	KS95H1167-3	Kansas
7	KS95HW62-6	Kansas
8	KS96HW94	Kansas
9	KS96HW115	Kansas
10	Betty KS84063-2W	Kansas
11	Heyne KS85W663-42W	Kansas
12	Scout 66	Nebraska
13	NE93496	Nebraska
14	NE93613	Nebraska
15	N94L205	Nebraska
16	NE94479	Nebraska
17	NE94482	Nebraska
18	N95L158	Nebraska
19	Tandem	S. Dakota
20	SD93267	S. Dakota
21	SD94149	S. Dakota
22	SD94241	S. Dakota
23	Karl 92	Oklahoma
24	OK95571(LA)	Oklahoma
25	OK95571(ST)	Oklahoma

*Muestras proporcionadas por el Centro de Investigación de Producción y Mercadeo de Granos (Grain Marketing and Production Research Center) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Manhattan, Kansas.

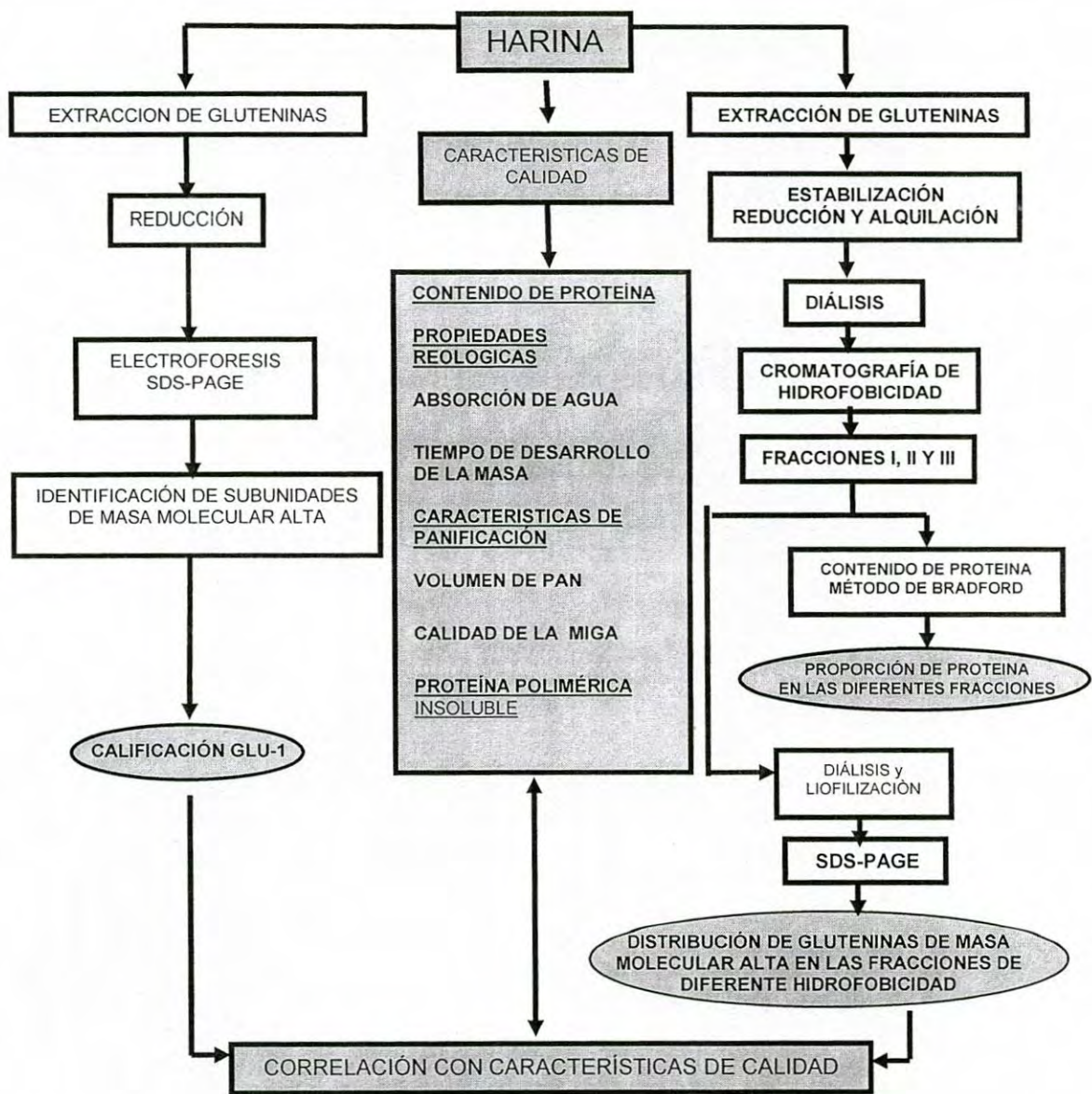


Figura 7. Diagrama General de la Experimentación.

Procedimiento de Extracción de Gluteninas de las Harinas

Para la extracción de las gluteninas, se pesaron 100 mg de las harinas utilizadas como estándares y 250 mg de las muestras de harina en microtubos de 1.5 ml (por duplicado), añadiendo 1 ml de solvente (1-propanol al 50%) a cada tubo y dispersando la muestra con una espátula pequeña. Los microtubos fueron agitados en un agitador vortex (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY) por 5 min y centrifugados en una centrífuga Eppendorf 5810 R por 2 min a 12,000 x g a temperatura ambiente (Bean y col., 1998). Las proteínas solubles se descartaron. El procedimiento de extracción se repitió 3 veces y al residuo insoluble de las harinas utilizadas como estándares se le añadió 400 μ l de buffer de muestra (Lookhart, 1982), mientras que al residuo de las muestras de harina, se añadió 1 ml de 1-propanol al 50 % conteniendo 10 % de 2-mercaptoetanol para obtener a las gluteninas reducidas. Los microtubos se agitaron en vortex por 1 h, se centrifugaron a 12,000 x g x 2 min (centrífuga Eppendorf 5810 R) y las gluteninas reducidas de muestras y estándares, se decantaron a otro microtubo. Los microtubos se colocaron en agua a ebullición por 5 min, fueron enfriados en agua y congelados para su análisis electroforético posterior.

Extracción y Estabilización de las Subunidades de Glutenina de las Muestras de Harina para la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Las gluteninas de las muestras de harina de las 25 variedades de trigo rojo fuerte de invierno, fueron extraídas por el procedimiento anteriormente descrito; las gluteninas reducidas obtenidas, fueron alquiladas a piridietilderivados por la adición de 4 vinil piridina equimolar a grupos sulfhidrilo (Sigma Chemical Co.) de acuerdo al método de Friedman y col. (1970), por 30 min a temperatura ambiente. Las gluteninas estabilizadas fueron fraccionadas por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), (Fig. 8). El exceso de agente

reductor y alquilante fue removido por diálisis contra solución de acetato de sodio pH 3.6, empleando una membrana de celulosa de 25 mm y 16 mm de diametro (Sigma Chemical Co.).

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

En el estudio se utilizó agarosa altamente acetilada (Vázquez-Moreno y col., 1992), como matriz hidrofóbica, ya que experimentos previos mostraron una mejor separación de las gluteninas (reducidas y alquiladas) en esta matriz que en fenil-Sefarosa usada por Magnus y Khan (1992).

Las proteínas fueron analizadas en un sistema de cromatografía de baja presión, utilizando una columna Bio-Rad (180 mm. de long. x 7.0 mm de diámetro), empacada con un mililitro de matriz hidrofóbica agarosa altamente acetilada (HA), sintetizada usando Sefarosa entrecruzada (6B, Pharmacia, Upsala, Sweden) y anhídrido acético (Vázquez-Moreno y Col., 1992). La solución de equilibrio fue acetato de sodio 7mM a pH de 3.6.

La columna se conectó a una bomba peristáltica (Modelo Econo-Column Bio-Rad) para regular el flujo de las soluciones amortiguadoras a 0.5 ml por min y se aplicaron en promedio 2 mg de proteína por corrida cromatográfica. Las fracciones se colectaron manualmente en tubos Falcon de 50 ml de capacidad. La proteína no adsorbida se lavó con búfer de equilibrio (acetato de sodio 7mM a pH 3.6), colectándola como fracción I. En la elución se obtuvieron dos fracciones: Fracción II, con buffer de acetato de sodio pH 3.6 conteniendo 35% de 1-propanol; y fracción III, con urea 8M (Torres y col., 2000). El contenido de proteína recuperada en cada fracción, fue determinado utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

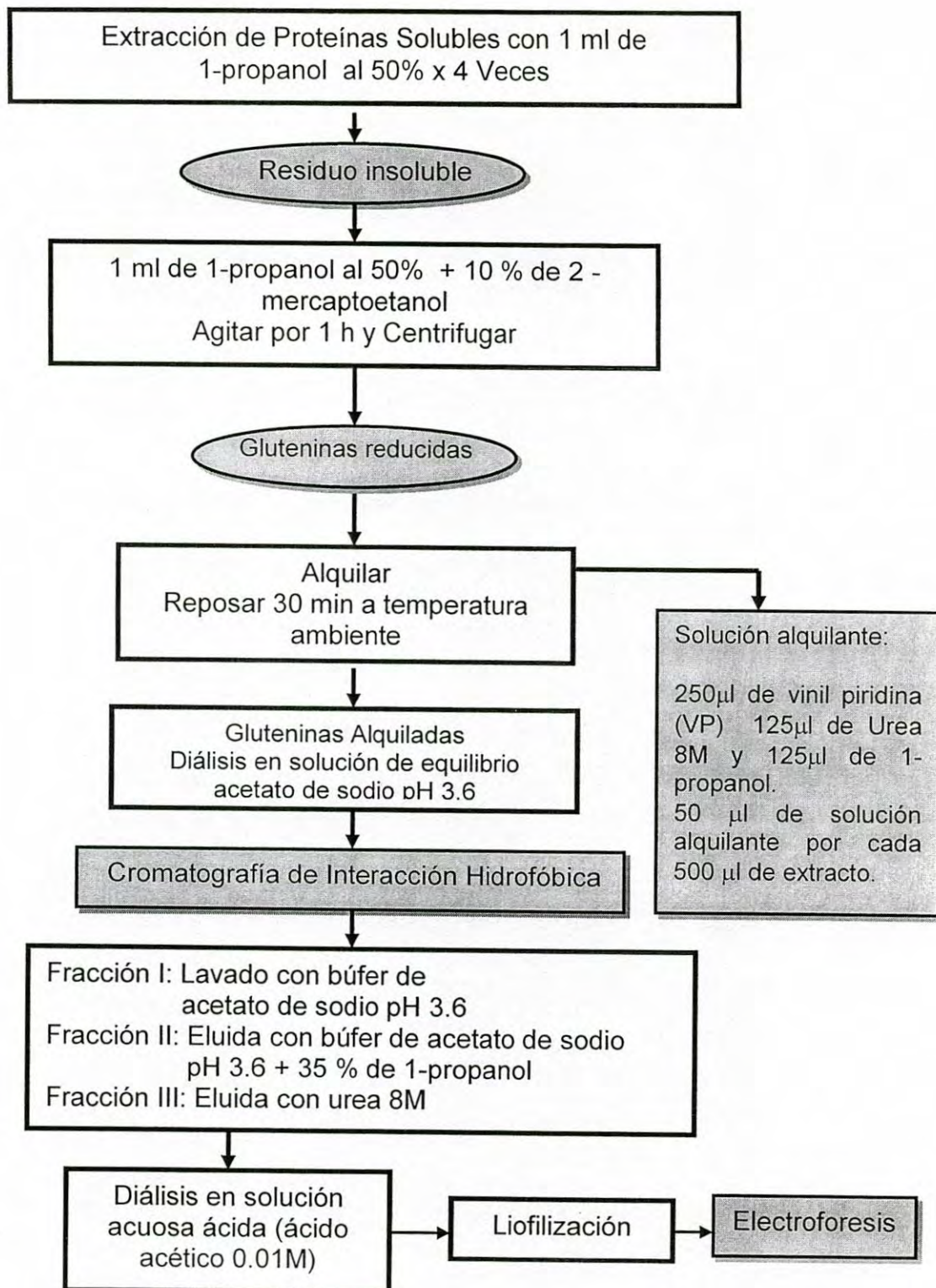


Figura 8. Diagrama de extracción, estabilización y preparación de las fracciones de gluteninas para la electroforesis.

Diálisis y Liofilización de las fracciones proteicas

Para preparar a las proteínas del gluten para la electroforesis, se dializaron las fracciones proteicas obtenidas por HIC exhaustivamente contra una solución acuosa ácida (ácido acético 0.01M). Estas soluciones que contenían a las gluteninas se congelaron (temperatura de - 40° C) para su liofilización. Posteriormente las gluteninas fueron resuspendidas en búfer de muestra 1X (SDS-PAGE), según su peso para obtener una solución de concentración 0.05mg/100µl.

Electroforesis Desnaturalizante y Reductora de Estándares y Muestras

Para determinar las subunidades presentes en las fracciones de diferente hidrofobicidad, se utilizó electroforesis denaturalizante y reductora (SDS-PAGE), obteniéndose la separación de las gluteninas de masa molecular alta extraídas de las muestras de harina. La electroforesis tanto de los estándares como de las muestras fue corrida en una cámara MiniProtean II (Bio Rad) por un procedimiento basado en el método de Laemmli (Laemmli, 1970) pero modificado de acuerdo a Lookhart (1982). Las dimensiones del gel fueron de 7cm (L) x 8 cm (W) y 0.75 mm de grosor.

Todos los geles que se utilizaron fueron homogéneos, el gel de separación se preparó a una concentración final de acrilamida del 12%, pH 8.5 y se utilizó un gel superior (stacking gel) pH 6.8 de concentración final de acrilamida 4 %. Las muestras y los estándares fueron aplicadas en cantidades de 3 µl por pozo (concentración de 0.0015 mg/3 µl).

Las proteínas fueron separadas empleando un voltage inicial de 60 volts por 30 minutos para reunir la proteína y posteriormente se aumentó a 100 volts, 20 mA durante 2.5 - 3.0 h. El búfer de cámara, solución de concentración 10X

(Lookhart, 1982), fue diluído a concentración 1X y se utilizaron aproximadamente 600 ml en la corrida. La tinción de los geles se llevó a cabo con solución de azul de Coomassie R-250 al 0.1% (100mg en 100ml de solución conteniendo 50% de metanol, 40 % de agua y 10% de ácido acético).

Para la caracterización de las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) de las harinas, se compararon las bandas presentes en éstas, con las bandas conocidas de subunidades de glutenina de masa molecular alta de los patrones electroforéticos de las harinas estándar (Lookhart y Jones, 1982). A los patrones de las bandas de cada variedad de subunidades de glutenina de masa molecular alta se les asignó el correspondiente número de identificación según la nomenclatura de Payne (Payne y col., 1984), y su calificación de calidad teórica basada en esa asignación.

Los estándares utilizados fueron: TAM 101, Cheyene 86, Cajeme 71, y Karl 93 con subunidades 5+10, relacionadas con buena calidad panadera; y Moro, TAM 105, TAM 107, Atlas 66, Nugaines, y Wings, con subunidades 2+12, de baja calidad panadera. Los estándares TAM 101, Moro, Nugaines y Wings provienen de harina de grano entero (harina integral). En la Fig. 9 se observa el patrón electroforético de estos estándares.

Calificación de Calidad de las Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta (Glu-1 score)

La calificación de calidad (Glu-1 score, por sus siglas en inglés), se obtuvo de acuerdo a Payne y colaboradores (1987). En este método se asigna una calificación a cada subunidad o par de subunidades expresada en el patrón de bandas de cada variedad y entonces los valores o calificaciones se suman

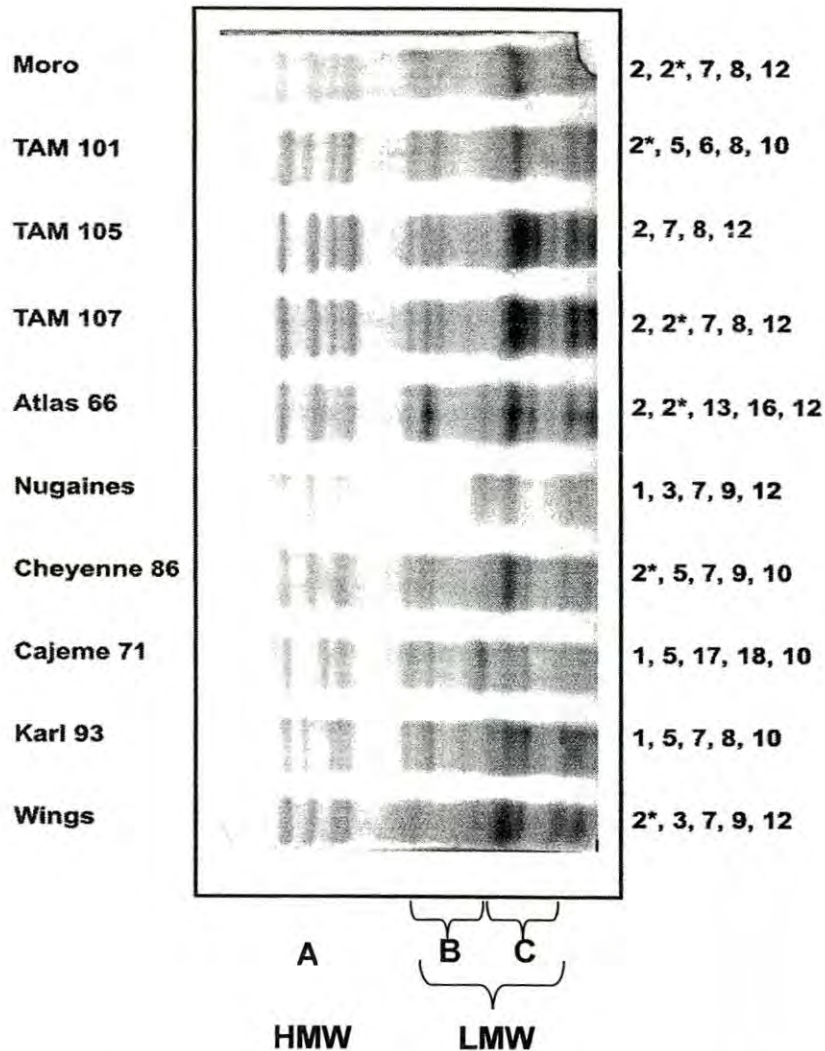


Fig. 9. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de extractos de gluteninas obtenidas de variedades empleadas como referencia: Moro, TAM 101, TAM 105, TAM 107, Atlas 66, Nugaines, Cheyenne 86 y Cajeme 71, Karl 93 y Wings. Los nombres de las variedades estándar se encuentran indicados a la izquierda y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS), a la derecha. Los rangos de movilidades en electroforesis (SDS-PAGE) para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) y subunidades de glutenina de masa molecular baja (LMW-GS) están indicadas en la parte inferior de los patrones. Las subunidades de glutenina de masa molecular baja (LMW-GS), están divididas en dos grupos de movilidad (B y C), según Payne y Corfield (1979).

(Tabla III). La calificación más alta es 4, asignada para el par de subunidades 5+10. La calificación de 3, es proporcionada para la subunidad 1 y 2* y las subunidades pares 7+8, 17+18, y 13+16. Se da una calificación de 2, a los pares 7+9, 2+12, y 3+12. Finalmente se asigna una calificación de 1, a las subunidades codificadas por un alelo nulo del cromosoma 1 A, así como al par de subunidades 6+8, y a la subunidad 20, codificada por el cromosoma 1 B. Así, por ejemplo, la variedad de trigo Lew con subunidades 1, 5+10, y 7+8, recibe una calificación de calidad de 10, el valor más alto.

Calidad de las harinas

El análisis de las características de calidad de las harinas de las variedades de trigo rojo fuerte de invierno, fue llevada a cabo en el Centro de Investigación de Producción y Mercadeo de Granos, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A.), en Manhattan, Kansas, y los resultados fueron proporcionados para este estudio. El análisis incluyó: contenido de proteína, mixograma, volumen de pan y calidad de la miga, así como proteína polimérica insoluble.

Contenido de Proteína de la Harina

Se determinó por combustión usando el método de Dumas (Determinador de nitrógeno LECO FP-428. St. Joseph, MI). Los valores de nitrógeno fueron convertidos a proteína multiplicando por el factor de conversión 5.7 (Bean y Lookhart, 1998).

Mixograma

Se usaron muestras de harina de 10 g se midió el tiempo de desarrollo de la masa y la absorción de agua. Método 54-40 (AACC 2000).

Tabla III. Variantes alélicas para el locus Glu -1 y calificación de calidad para subunidades de glutenina de masa molecular alta individuales o por pares

Calificación	Locus		
	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1
4	--	--	5+10
3	1; 2*	7+ 8,17+18, 13+16	--
3		13+19, 14+15	--
2	--	7+ 9	2+12
2	--	--	3+12
1	nulo	7, 20, 21, 22	4+12, 22+12
1	--	6 + 8	
2(?)			2 + 10

Fuente: Payne, (1987).

Volumen del Pan

Se obtuvo por desplazamiento de semilla de nabo en un medidor de volumen de pan (marca National MFG Company, modelo PUP) con volumen de calibración de 400 cc (Lookhart, comunicación personal).

Calidad de la miga

Se siguió un método visual para proporcionar información sobre la uniformidad de la miga y el tamaño del gránulo (Lookhart, comunicación personal).

Proteína Polimérica Insoluble

Se llevó a cabo por combustión. Los residuos insolubles de la extracción con 50% propanol (pellets) se secaron a 130°C/1 h y se analizaron en un equipo para determinar nitrógeno (LECO FP-428 St. Joseph, MI). Los valores de nitrógeno fueron multiplicados por el factor de conversión 5.7 (Bean y Lookhart, 1998).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las características de calidad y se estimó la hidrofobicidad en función de la proporción de proteína en las fracciones cromatográficas. Se realizó un análisis de correlación entre la calificación de calidad (Glu-1 Score) y cada una de las características de calidad de las 25 variedades de trigo panadero rojo fuerte de invierno con el fin de determinar la relación existente entre ellas. Se analizó la distribución de frecuencia de las subunidades de masa molecular alta en las diferentes fracciones hidrofóbicas. Se obtuvieron las gráficas correspondientes de cada genoma para las subunidades presentes en el patrón electroforético de las fracciones proteicas, por asignación de valores arbitrarios, según la intensidad de las bandas correspondientes a cada subunidad. El análisis se realizó con el paquete estadístico "STATISTICA" para Windows versión 6.08 (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta

Los patrones electroforéticos de las 25 muestras de trigo rojo fuerte de invierno incluidas en el estudio se muestran en las figuras 10, 11 y 12. En el Anexo A, se muestran los electroforegramas en los que se identificaron las subunidades de glutenina de masa molecular alta. Al lado derecho de los patrones electroforéticos de cada una de las muestras, se indican los números de identificación para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS), según la nomenclatura de Payne y col., (1984). En las figuras del Anexo A, puede observarse que las parejas de estándares más frecuentemente utilizadas fueron: Cheyenne 86 y atlas 66; Cajeme 71 y Karl 93; y en algunos casos los estándares TAM 101, 105 y 107. Los resultados de la comparación para la identificación de subunidades con los restantes estándares, Wings, Moro y Nugaines no se muestran en estas figuras.

La base de la selección de estándares, para identificar a las subunidades de glutenina de masa molecular alta de las distintas muestras de harina de trigo fue la presencia del par de subunidades 5 + 10 y 2 + 12. No se tuvo dificultad para identificar la mayoría de las bandas presentes en las distintas variedades ya que se compararon con los patrones electroforéticos presentados por las harinas estándar, que fueron colocados en cada extremo del gel. Se compararon las distancias de migración de las subunidades individuales con las subunidades o bandas que aparecían en el patrón electroforético de cada grupo de muestras, asignándose los números correspondientes a cada subunidad identificada en el gel, que coincidía exactamente o estaba colocada a la misma distancia de migración que las subunidades del estándar; posteriormente se asignaron los números correspondientes a las subunidades

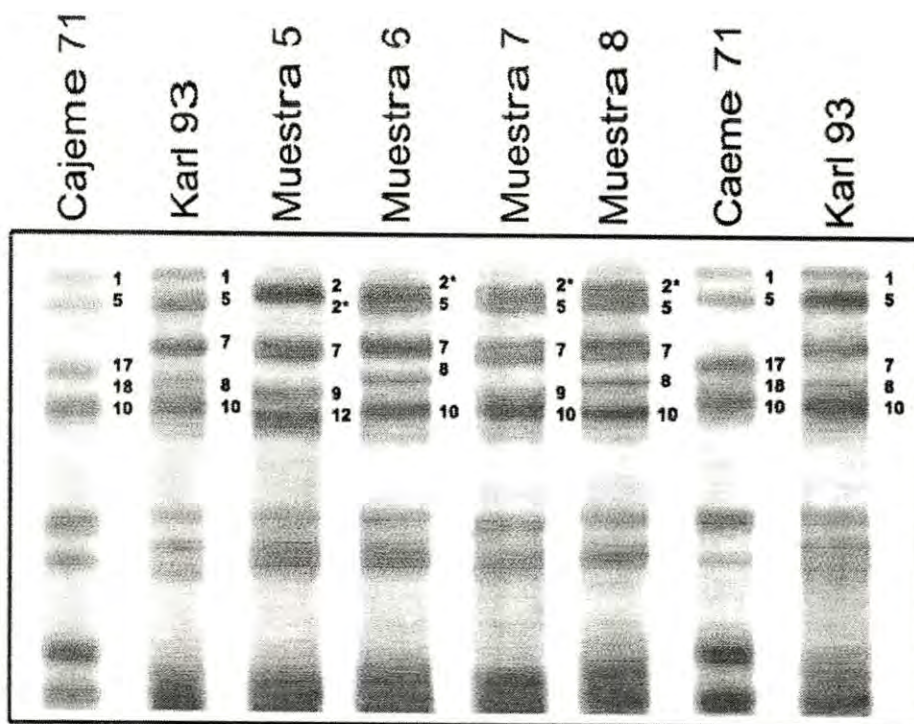


Figura 15. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestras 5, variedad Larned (Kansas), muestra 6, línea experimental KS95H1167-3 (Kansas); muestra 7, línea experimental KS95HW62-6 (Kansas); muestra 8, línea experimental KS96HW94 (kansas) y variedades de referencia: Cajeme 71(1,5,17,18,10) y karl 93 (1,5,7,8,10). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

para la muestra 7, como se muestra en la Figura 16. Es posible que algunos trigos panaderos en teoría puedan presentar más de 5 bandas en lugar de 4 o 5 que es lo común por el silenciamiento o la no expresión de algunos genes (Shewry y col., 1992).

La variación de alelos para el locus Glu-1 de donde fueron tomados los alelos encontrados en las variedades analizadas y los valores asignados a cada alelo individual o por pares se tomaron de la Tabla III (página 54, Materiales y Métodos). Los números de Payne para los alelos de las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) asignados a cada variedad y la correspondiente calificación de calidad según el sistema de Payne y col., (1987) se muestra en la Tabla IV.

La suma individual de los valores y la suma del valor por par de subunidades, según este sistema, da como resultado la calificación de calidad total (Calificación Glu-1). En la Tabla IV, se indica también el resultado de la calificación promedio de las 25 muestras de trigo rojo fuerte de invierno.

Los resultados también indican que de las variedades de trigo rojo fuerte de invierno que comprendió el estudio, 21 tienen el par de subunidades Dx5 + Dy10 (86 %, genoma D) y 4 de las variedades presentan el par de subunidades Dx2 + Dy12 (16 %, genoma D); sin embargo, los resultados obtenidos para estas 4 últimas variedades indican que a pesar de tener este par de subunidades asociadas con menor calidad en la elaboración de pan, presentan también subunidades asociadas con mayor calidad como lo indica la contribución a la calificación de calidad de sus demás subunidades componentes, como es el caso de la subunidad Ax2* (genoma A), con un valor de calidad de 3 y el par de alelos Bx7+ By8 (genoma B), con un valor de 3 que contribuye para una calificación de calidad alta como puede observarse en las Tablas IV y V.

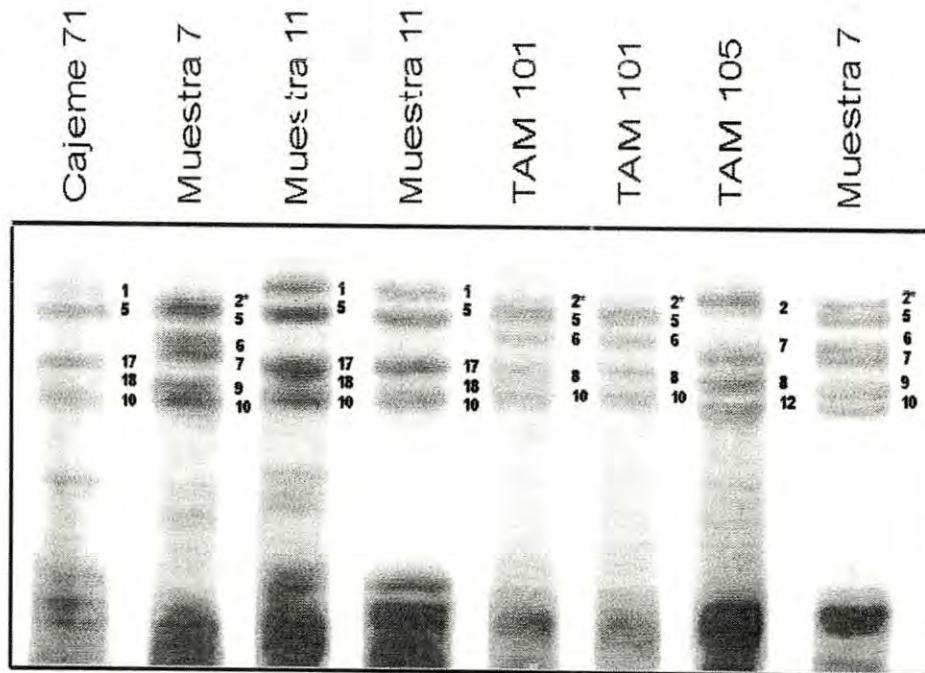
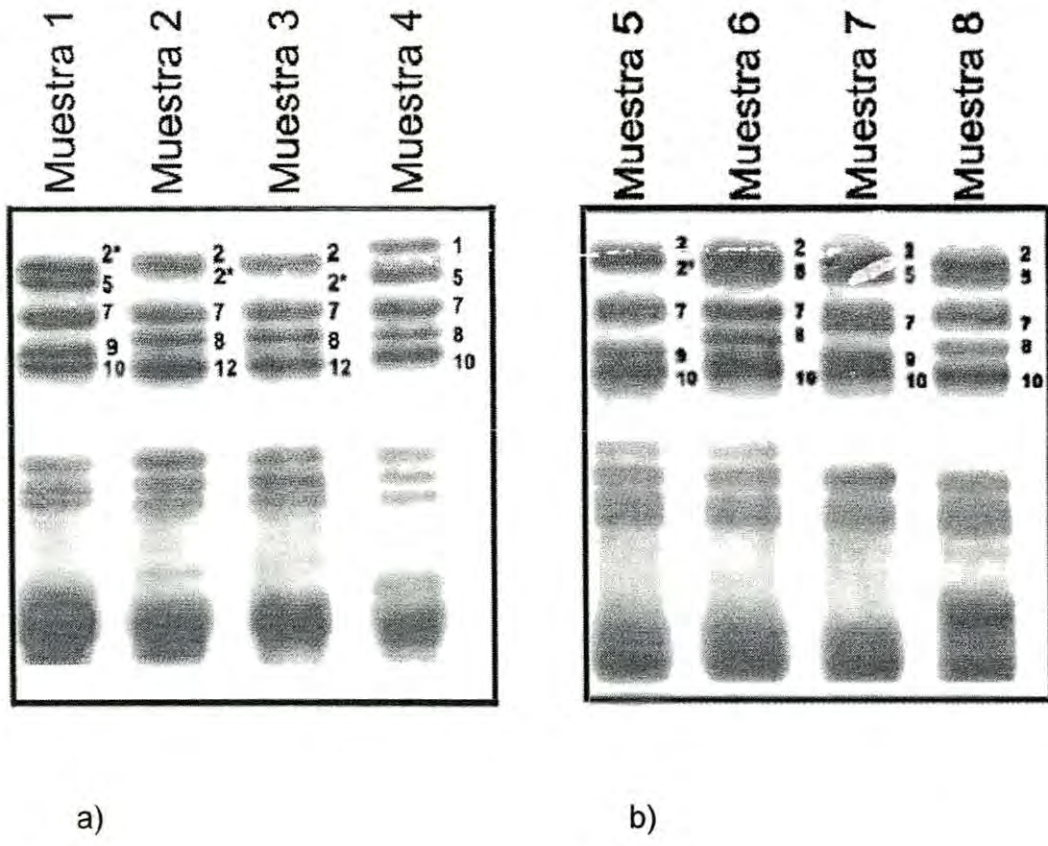


Figura 16. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestra 7, línea experimental KS95HW62-6 (Kansas); Muestra 11, variedad Heyne (Kansas) y variedades de referencia: Cajeme 71(1, 5, 17,18, 10); TAM 101 (2*, 5, 6, 8, 10) y TAM 105 (2, 7, 8, 12). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad. El estándar TAM 101 se utilizó para asignar la subunidad 6 a la muestra número 7 y para descartar que la asignación fuera 17+18 como en la muestra 11.

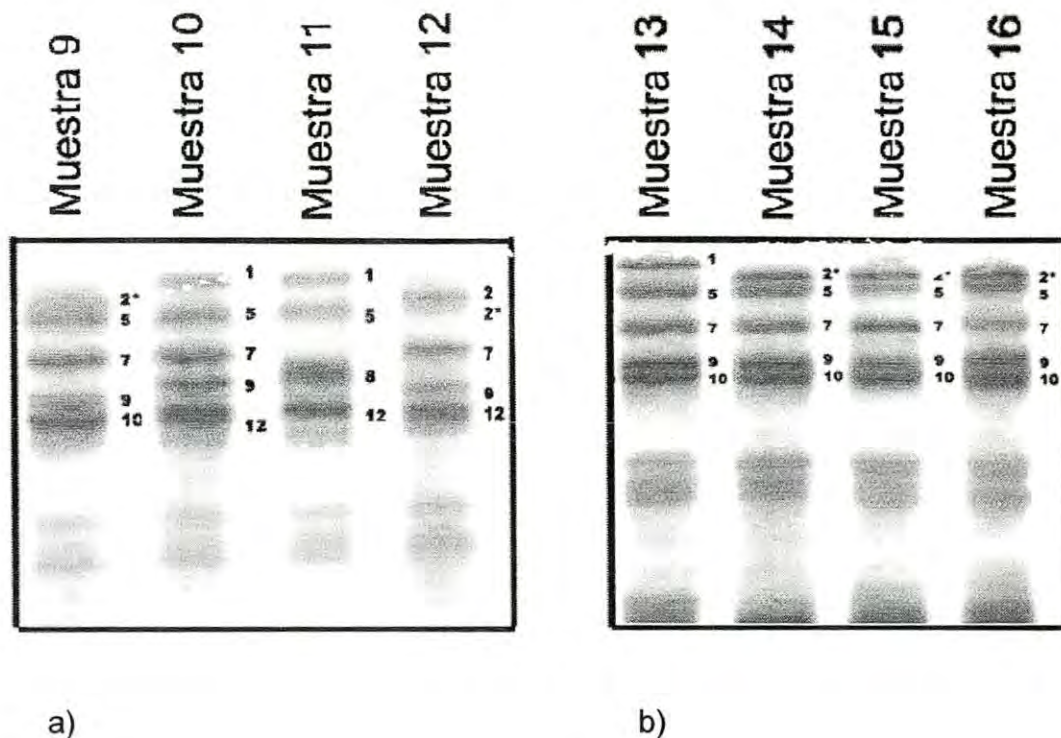
Tabla IV. Composición de las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) y calificación de calidad de Payne, para variedades de trigo rojo fuerte de invierno cosechado en Estados Unidos en 1998.

NM ¹	V/LE ²	HMW-GS ³	CC ⁴
4	Karl 92	1, 5, 7, 8, 10	10
10	Betty	1, 5, 7, 8, 10	10
23	Karl 92	1, 5, 7, 8, 10	10
6	KS95H1167-3	2*, 5, 7, 8, 10	10
8	KS96HW94	2*, 5, 7, 8, 10	10
18	N95L158	2*, 5, 7, 8, 10	10
11	Heyne	1, 5, 17, 18, 10	10
1	Powers	2*, 5, 7, 9, 10	9
9	KS96HW115	2*, 5, 7, 9, 10	9
14	NE93613	2*, 5, 7, 9, 10	9
15	N94L205	2*, 5, 7, 9, 10	9
16	NE94479	2*, 5, 7, 9, 10	9
17	NE94482	2*, 5, 7, 9, 10	9
19	Tandem	2*, 5, 7, 9, 10	9
20	SD93267	2*, 5, 7, 9, 10	9
21	SD94149	2*, 5, 7, 9, 10	9
22	SD94241	2*, 5, 7, 9, 10	9
25	OK95571(ST)	2*, 5, 7, 9, 10	9
7	KS95HW62-6	2*, 5, 6, 7, 9, 10	9
13	NE93496	1, 5, 7, 9, 10	9
2	CO950043	2, 2*, 7, 8, 12	8
3	CO950379	2, 2*, 7, 8, 12	8
24	OK95571(LA)	2*, 5, 6, 8, 10	8
5	Larned	2, 2*, 7, 9, 12	7
12	Scout 66	2, 2*, 7, 9, 12	7
Calificación promedio			9

¹NM = Número de muestra; ²V/LE = Variedad o línea experimental; ³HMW-GS = Subunidades de glutenina de masa molecular alta; ⁴CC = Calificación de calidad.



Figuras 10. a y b. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta, a) muestra 1, variedad Powers (Colorado); muestra 2, línea experimental CO950043 (Colorado); muestra 3, línea experimental CO950379 (Colorado) y muestra 4, variedad Karl 92 (Kansas); y b) muestra 5, variedad Larned (Kansas), muestra 6, línea experimental KS95H1167-3 (Kansas); muestra 7, línea experimental KS95HW62-6 (Kansas); muestra 8, línea experimental KS96HW94 (Kansas). El número de muestra se encuentra indicado en la parte superior de cada carril y la asignación completa para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha.



Figuras 11. a y b. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta, a) muestra 9, línea experimental KS96HW115 (Kansas); muestra 10, variedad Betty (Kansas); muestra 11, variedad Heyne (Kansas) y muestra 12, variedad Scout 66 (Nebraska) y b) muestra 13, línea experimental, NE93496 (Nebraska); muestra 14, línea experimental, NE93613 (Nebraska); muestra 15, línea experimental, N94L205 (Nebraska); muestra 16, línea experimental, NE94479 (Nebraska). El número de muestra se encuentra indicado en la parte superior de cada carril y la asignación completa para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha.

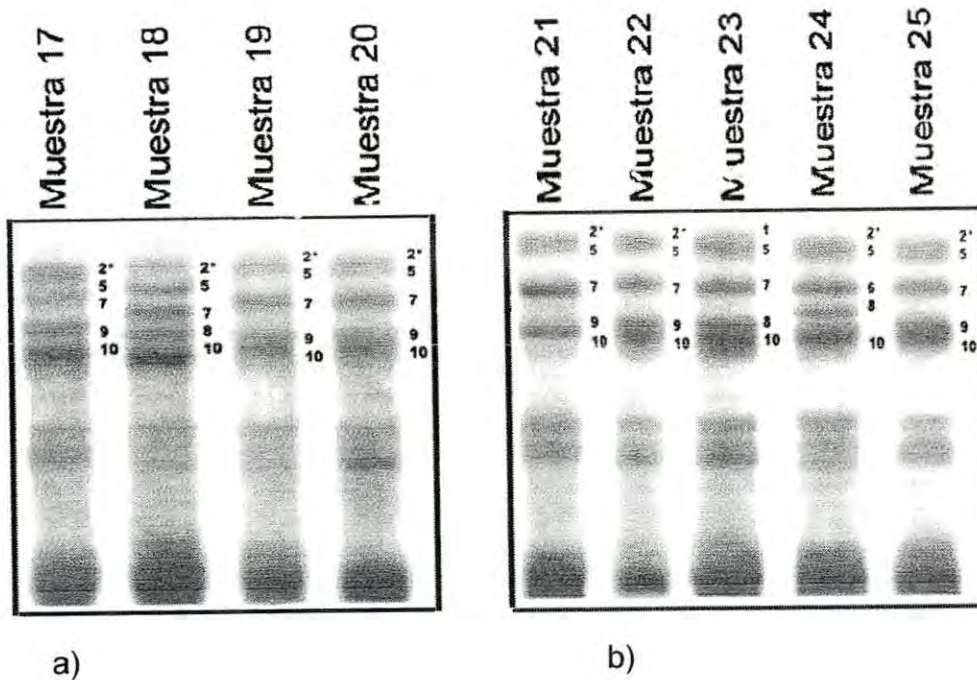


Figura 12 a y b. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta, a) muestra 17, línea exp. NE94482 (Nebraska); muestra 18, línea exp. N95L158; muestra 19, variedad Tandem (S. Dakota) y muestra 20, SD93267 (S. Dakota) y b) muestra 21, línea experimental SD94149 (S. Dakota); muestra 22, línea exp. SD94241 (S. Dakota); muestra 23, Kart 92 (Oklahoma); muestra 24, línea exp. OK95571 (LA), (Oklahoma); muestra 25, línea experimental OK95571(ST), (Oklahoma). El número de muestra se encuentra indicado en la parte superior de cada carril y la asignación completa para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha.

del estándar; posteriormente se asignaron los números correspondientes a las subunidades que no pudieron asignarse con la primera pareja de estándares, escogiendo una nueva pareja por análisis de las bandas presentes en el gel, para completar la asignación. En algunos casos fue necesario comparar los patrones electroforéticos con más de dos parejas de estándares para completar la asignación de subunidades correctamente.

Sin embargo, es necesario mencionar que algunas combinaciones resultaron difíciles de resolver, como por ejemplo la combinación de bandas 2 y 2*, Fig. 13, muestra No. 2, por lo que la asignación de estas combinaciones se basó en la comparación con las bandas de los estándares que presentan estas subunidades, por ejemplo Atlas 66 y TAM 107 presentan las subunidades 2 y 2*, TAM 101 presenta la subunidad 2* y TAM 105, que presenta la subunidad 2. Además, debido a que las subunidades 2 + 12 son codificadas por genes ligados, localizados en el brazo largo del cromosoma 1D, estas dos proteínas casi siempre aparecen juntas. La subunidad 12 se considera evidencia de la presencia de la subunidad 2, cuando una banda gruesa se encuentra en la región 2/2* (Lookhart y col. 1993); por lo tanto, la resolución en algunas variedades para las subunidades 2/2* también se basó en el ancho de la banda localizada en esta región.

La muestra número 7, como se observa en las Figuras número 14 y 15, presentó una banda muy gruesa en la región correspondiente a la subunidad 7, lo que hizo pensar que se trataba de dos bandas, esto se comprobó corriendo de nuevo la muestra en un gel más delgado (0.5 mm de grosor), para lograr mayor resolución; se logró así, separar la banda gruesa, obteniéndose una banda de intensidad ligeramente menor que la banda correspondiente a la subunidad 7. Los estándares que se utilizaron para la asignación de las subunidades correspondientes a esta muestra fueron: TAM 101, TAM 105 y Cajeme 71. En el estándar TAM 101 está presente la subunidad 6, que fue la banda localizada en esta región, completando la asignación de subunidades

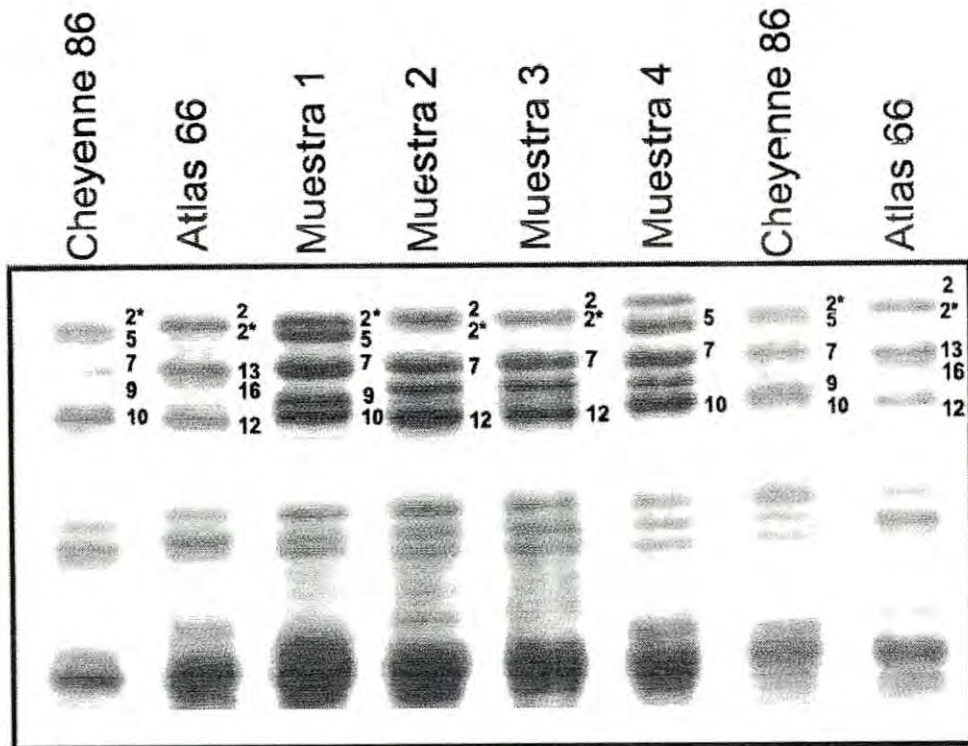


Figura 13. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta, muestras 1, variedad Prowers (Colorado); muestra 2, línea experimental CO950043 (Colorado); muestra 3, línea experimental CO950379 (Colorado) y muestra 4, variedad Karl 92 (Kansas); y variedades de referencia: Cheyenne 86 (2, 5, 7, 9, 10), Atlas 66 (2, 2*, 13, 16, 12). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

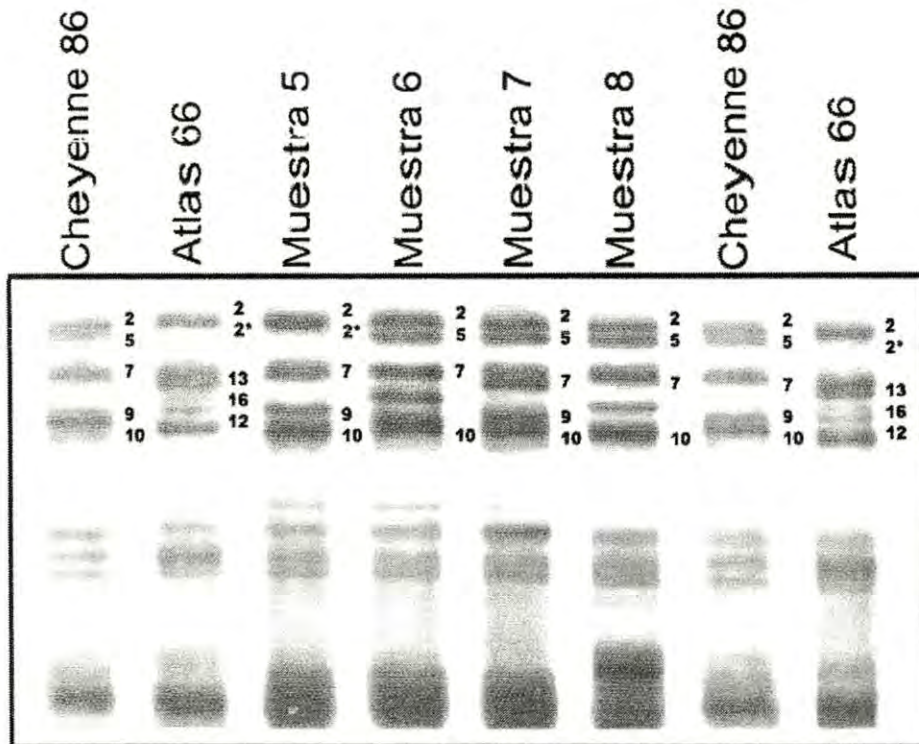


Figura 14. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta de la muestra 5, variedad Larned (Kansas), muestra 6, línea experimental KS95H1167-3 (Kansas); muestra 7, línea experimental KS95HW62-6 (Kansas); muestra 8, línea experimental KS96HW94 (Kansas) y variedades de referencia: Cheyenne 86 (2*, 5, 7, 9, 10), Atlas 66 (2, 2*, 13, 16, 12). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

Tabla V. Composición de las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) y calificación de calidad de Payne, por genomas, para variedades de trigo rojo fuerte de invierno cosechado en Estados Unidos en 1998.

Numero de Muestra	Variedad o línea experimental	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Calificación de calidad
1	Prowers	2*	7+9	5+10	9
2	CO950043		7+8	2+12	8
3	CO950379		7+8	2+12	8
4	Karl 92	1	7+8	5+10	10
5	Larned		7+9	2+12	7
6	KS95H1167-3	2*	7+8	5+10	10
7	KS95HW62-6	2*	(6) 7+9	5+10	9
8	KS96HW94	2*	7+8	5+10	10
9	KS96HW115	2*	7+9	5+10	9
10	Betty	1	7+8	5+10	10
11	Heyne	1	17+18	5+10	10
12	Scout 66		7+9	2+12	7
13	NE93496	1	7+9	5+10	9
14	NE93613	2*	7+9	5+10	9
15	N94L205	2*	7+9	5+10	9
16	NE94479	2*	7+9	5+10	9
17	NE94482	2*	7+9	5+10	9
18	N95L158	2*	7+8	5+10	10
19	Tandem	2*	7+9	5+10	9
20	SD93267	2*	7+9	5+10	9
21	SD94149	2*	7+9	5+10	9
22	SD94241	2*	7+9	5+10	9
23	Karl 92	1	7+8	5+10	10
24	OK95571(LA)	2*	6+8	5+10	8
25	OK95571(ST)	2*	7+9	5+10	9
Calificación promedio					9

El mecanismo por el cual las subunidades de masa molecular alta contribuyen a la calidad en el mezclado y horneado no está bien entendido, pero una contribución cuantitativa resultado del número de subunidades parece razonablemente segura (Lawrence y col., 1988), por lo tanto, en las variedades de trigo en las que se expresan 5 subunidades de masa molecular alta, tendrán mejor calidad en la elaboración de pan, que las variedades en las que son expresadas 4, al menos cuando los alelos expresados sean comunes para ambos trigos o hagan igual contribución para calidad (Payne y col. 1981). Los factores estructurales probablemente jueguen un papel importante (Kasarda, 1989).

Las 25 variedades de trigo rojo fuerte de invierno analizadas son esencialmente uniformes en sus biotipos de subunidades de glutenina de masa molecular alta según sus patrones en SDS-PAGE, excepto la variedad 7 que muestra 6 bandas, una de las cuales fue identificada como subunidad 6, la que como subunidad individual no tiene un valor numérico, por lo que la contribución cuantitativa a la calificación de calidad total de esta muestra no se ve afectada.

Los resultados para las asignaciones de las subunidades de masa molecular alta y los valores de calidad correspondientes a cada una de las variedades analizadas, se muestran en la Tabla V. Los valores de calidad del Glu-1 que pueden asignarse varían de 5 a 10. El 84% de las variedades de trigo HRW (21 variedades), presentó el par de alelos 5 + 10, entre ellas 7 variedades tuvieron el valor máximo de calidad que es 10, y 13 tuvieron un valor de calidad de 9. De las variedades que mostraron las subunidades 5 + 10, solamente una variedad (Muestra 24), tuvo calidad pobre debido a que presentó el par de subunidades 6 + 8 del Glu-B1; aún así, puede ser considerado un trigo de buena calidad.

El 16% de las variedades presentó las subunidades 2 + 12 (4 variedades), de las cuales dos variedades tuvieron una calificación de calidad de

8 y las otras dos un valor de calidad de 7, las primeras dos presentaron el par de subunidades del Glu-B1, 7 + 8, con un valor mas alto de calidad que el par 7 + 9 presente en las otras dos variedades.

Puede concluirse que los valores más bajos de calidad se deben principalmente a la presencia de los alelos de pobre calidad 2+12, como se observa en las muestras 2, 3, 5 y 12, y a la forma nula de Glu-A1 (lo cual ocurrió en las muestras 2 y 3) con el mismo complemento de subunidades de masa molecular alta (Nulo, 2+12, 7+8), que se caracterizan por pobre calidad para mezclado y horneado (Carrillo y Col., 1990). Sin embargo, los trigos HRW son de mejor calidad que algunos trigos HRS, por lo que probablemente estas dos muestras (HRW, 2 y 3) tengan de mediana a pobre calidad para mezclado y horneado.

Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta y Correlación con Calidad

Las primeras correlaciones claras de las combinaciones particulares de las subunidades de glutenina de masa molecular alta (definidas por sus patrones electroforéticos) con calidad fueron establecidas por Payne y col., (1981).

Los trigos panaderos contienen en teoría 6 diferentes subunidades de glutenina de masa molecular alta, pero debido al "silenciamiento" de algunos de estos genes, es más común que las variedades presenten 3 a 5 subunidades (HMW-GS), (1 a 3 subunidades en trigo cristalino, genoma tetraploide). Por lo tanto todos los trigos hexaploides contienen al menos la subunidad 1Bx, 1Dx y 1Dy, mientras que algunas variedades también contienen una subunidad 1By y una 1Ax. Parece ser que el gen que codifica la subunidad 1Ay está siempre reprimido (Payne y col., 1981).

En este estudio se observó que la mayoría de las variedades presentan 5 bandas, lo que comprueba su calidad, excepto la muestra número 7 que presenta 6, pero en este último caso la sexta subunidad es nula, es decir no tiene valor numérico y por lo tanto no contribuye a la calificación de calidad.

Características de Calidad de las Harinas de las variedades de Trigo Rojo Fuerte de Invierno

Todas las muestras incluidas en el estudio presentan variabilidad en cuanto a las características de calidad presentadas en la Tabla VI.

El contenido de proteína (N x 5.7) de las muestras de harina, se encuentra en el rango de 10.46 - 14.36 %. La muestra 1, variedad Prowers de Colorado presenta el valor máximo (14.36 %) y el valor mínimo (10.46 %) corresponde a la muestra 17, que es una línea experimental del Estado de Nebraska, siendo este último valor muy bajo considerando la calidad en cuanto a contenido proteico de los trigos panaderos estadounidenses, que es en promedio de 14-16%.

Los valores en cuanto a absorción de agua y tiempo de mezclado, dos características importantes que correlacionan directamente con calidad en la elaboración de pan, se encuentran en el rango de 59.7 - 69.2 % y 2.13 - 13 % respectivamente; La muestra 8, línea experimental de Kansas presenta la máxima absorción de agua (69.2%) de todas las muestras y un tiempo de mezclado de 13 min, que es mayor tiempo presentado por las muestras; la muestra 3, línea experimental de Colorado presenta el mínimo valor de absorción de agua (59.7%) y también el mínimo tiempo de mezclado presentado por estas variedades y que corresponde a un valor de 2.13 min así como el menor porcentaje de proteína polimérica.

Tabla VI. Características de Calidad de las Muestras de Trigo Panadero, Rojo Fuerte de Invierno (HRW).

NM	P ¹ (%)	AA ² (%)	TM ³ (Min)	PPI ⁴ (%)	CM ⁵	VP ⁶ (cc)
1	14.36	68.02	4.5	0.4328	3.5	970
2	12.67	60.7	2.5	0.4122	2	830
3	12.18	59.7	2.13	0.3971	1	795
4	12.46	66.7	9.5	0.5296	3.8	970
5	12.41	65.7	3.75	0.4 595	4.2	900
6	11.83	64.7	6	0.4 89	4	975
7	12.03	66.7	5.5	0.5072	4.1	970
8	12.31	69.2	13	0.5467	4.2	950
9	12.02	65.7	5.13	0.4 913	4.8	925
10	14.23	68.7	5.5	0.5059	5	1005
11	13.47	65.7	6	0.5112	5.2	975
12	11.42	64.2	4.13	0.4 823	4.2	875
13	11.78	65.2	6	0.4 953	4.1	865
14	10.62	66.7	6	0.4 849	3.5	805
15	11.12	65.7	4	0.4 728	3.8	835
16	10.67	64.2	4.5	0.4 545	4	815
17	10.46	64.7	4.38	0.4 933	4	815
18	10.68	64.7	6.75	0.5 073	4	870
19	13.15	66.7	5.13	0.4 519	4.2	880
20	12.97	68.7	6.13	0.4 978	4.8	890
21	11.83	66.7	4.25	0.4282	4	930
22	11.32	65.2	5.5	0.4538	4.4	890
23	12.78	67.7	8.5	0.5294	4.5	935
24	11.38	61.7	5	0.4815	4	865
25	11.74	61.7	4.75	0.4888	4	825

¹P = Contenido de proteína; ²AA = Absorción de agua; ³TM = Tiempo de mezclado; ⁴PPI = Proteína polimérica insoluble; ⁵CM = Calidad de la miga; ⁶VP = Volumen de pan.

Fuente: Datos proporcionados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (1998).

La muestra 3, una línea experimental; presenta, el valor más bajo en calidad de la miga del pan (valor de 1) y el más bajo volumen de pan (795 cc) entre las 25 muestras estudiadas. Esta muestra como se mencionó antes presenta el mínimo valor en absorción de agua y el mínimo tiempo de mezclado de todas las muestras. Tiene un patrón electroforético con una combinación de subunidades 2+12 que se relacionan con mala calidad; pero completa su patrón electroforético con las subunidades: 2*, 7 y 8, obteniendo una calificación de calidad de 8. El mayor volumen de pan lo presenta la muestra 10, variedad Betty también de Kansas. La muestra número 1, variedad Prowers muestra un buen volumen de pan, que corresponde a un valor de 970cc. El valor más alto de proteína polimérica insoluble lo presentó la muestra 8, correspondiente a una línea experimental de Kansas, como se mencionó anteriormente. La muestra 11, variedad Heyne de Kansas presenta la mejor calidad de miga; en tanto que el mayor volumen de pan lo presenta la muestra 10, variedad Betty también de Kansas. La muestra número 1, variedad Prowers tiene el mayor contenido de proteína y muestra un buen volumen de pan (970cc), con una calificación de calidad de 9, es un trigo considerado de buena calidad ya que en su composición están incluidas las subunidades 5 + 10. La muestra 3, una línea experimental de Colorado también presenta el menor porcentaje de proteína polimérica.

Correlación entre las Características de Calidad y Calificación de Calidad

La Tabla VII muestra los coeficientes de correlación para las características de calidad. De acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos para las características de calidad en la elaboración de pan, en este estudio se demostró que el contenido de proteína correlacionó significativamente con absorción de agua ($p < 0.05$) y con el tiempo de mezclado de la masa ($p < 0.01$); estos dos últimos parámetros también correlacionan significativamente con el porcentaje de proteína polimérica insoluble ($p < 0.01$).

Tabla VII. Correlación entre Características de Calidad y Calificación de Calidad de Payne

	P ¹	AA ²	TM ³	PPI ⁴	CM ⁵	VP ⁶	CC ⁷
Proteína (P)	1.000						
Absorción de Agua (AA)	.3852*	1.000					
Tiempo de mezclado (TM)	.0894 ^{NS}	.5994**	1.000				
Proteína Polimérica Insoluble (PPI)	.0158 ^{NS}	.5290**	.8030**	1.000			
Calidad de la Miga (CM)	.1336 ^{NS}	.6473**	.4155*	.6643**	1.000		
Volumen de Pan (VP)	.6434**	.6367**	.4697**	.4427**	.5270**	1.000	
Calificación de Calidad	.1770 ^{NS}	.5016**	.6488**	.5814**	.3847*	.4887**	1.000

¹P = Contenido de proteína; ²AA = Absorción de agua; ³TM = Tiempo de mezclado; ⁴PPI = Proteína polimérica insoluble; ⁵CM = Calidad de la miga; ⁶VP = Volumen de pan; ⁷CC = Calificación de calidad. Las correlaciones marcadas (*) son significativas a $p < 0.05$; las correlaciones marcadas (**) son significativas a $p < 0.01$; y las marcadas con (^{NS}) no significativas (NS) a $p > 0.05$.

La calidad de la miga correlacionó significativamente con el tiempo de desarrollo de la masa ($p < 0.05$) y con las variables absorción de agua y proteína polimérica insoluble ($p < 0.01$). El volumen de pan correlacionó significativamente con calidad de la miga, con contenido de proteína, con absorción de agua y con tiempo de mezclado de la masa, a su vez éste último correlaciona significativamente con calidad de la miga. La calidad de la miga correlaciona muy significativamente con proteína polimérica insoluble ($p < 0.01$) y, finalmente, la calificación de calidad correlaciona muy significativamente con absorción de agua y tiempo de mezclado, así como con volumen de pan, proteína polimérica insoluble ($p < 0.01$) y con la calidad de la miga ($p < 0.05$). Los resultados de las correlaciones entre calificación de calidad y características de calidad en la elaboración de pan demostraron que el conocimiento de la calificación de calidad total (Calificación Glu-1) para las diferentes variedades de trigo es conveniente para escoger variedades de buena calidad en la elaboración de pan, ya que asegura que la composición de subunidades presentes en determinada variedad darán las características deseadas de calidad en la elaboración de pan. En contraparte, el contenido de proteína no solo no es determinante de calidad en la elaboración de pan, tampoco correlaciona con calificación de calidad.

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Patrones Cromatográficos de las Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta

Las Figuras 17 y 18 muestran los cromatogramas obtenidos por cromatografía de interacción hidrofóbica, de las gluteninas estabilizadas de masa molecular alta de harina de trigo panadero rojo fuerte de invierno, de las muestras 5 y 6; 7 y 8.

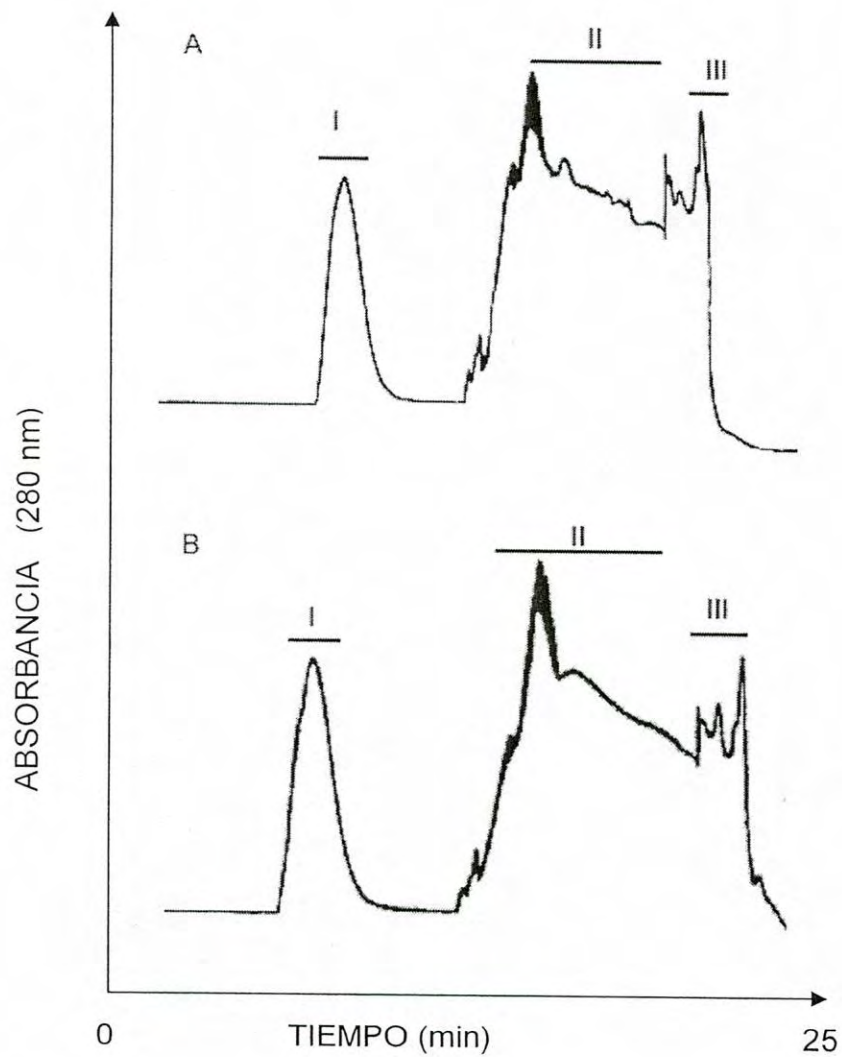


Figura 17. Patrones de elución en cromatografía de interacción hidrofóbica: (A) gluteninas de la muestra 5, variedad Larned (Kansas); (B), gluteninas de la muestra 6, línea experimental: KS95H1167-3 (Kansas); (I), fracción no retenida (II), fracción eluída con búfer de acetato de sodio conteniendo 1-propanol al 35%; (III), fracción eluída con urea 8M.

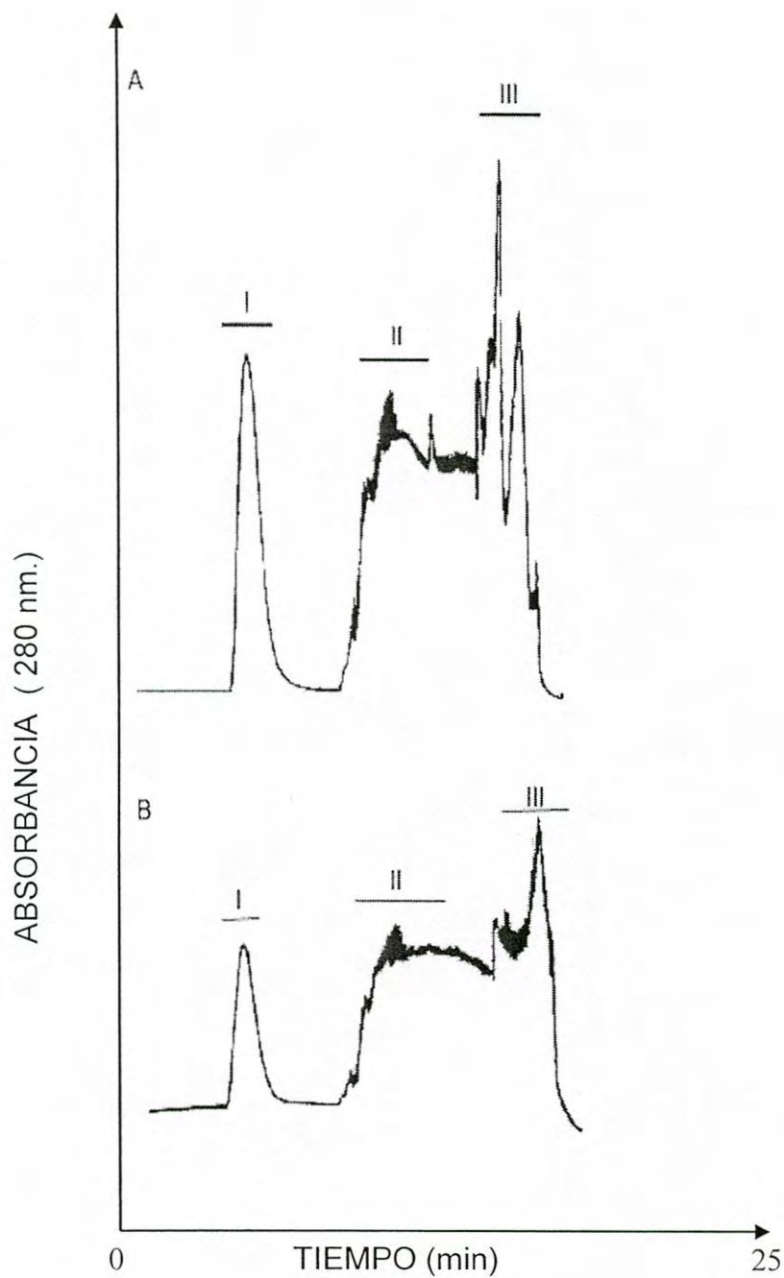


Figura 18. Patrones de elución en cromatografía de interacción hidrofóbica: (A), gluteninas de la muestra 7, línea experimental: KS95HW62-6 (Kansas); (B), gluteninas de la muestra 8, línea experimental: KS96HW94 (Kansas); (I), fracción no retenida; (II), fracción eluída con búfer de acetato de sodio conteniendo 1-propanol al 35%; (III), fracción eluída con urea 8M.

Los perfiles de elución muestran que la proteína eluyó mostrando picos diferentes en cada fracción cromatográfica. El primer pico corresponde a la fracción I, que es la proteína que no fue adsorbida por la matriz y a la que se llamó fracción no retenida. Esta fracción se lavó con búfer de acetato de sodio 7mM a pH 3.6 formando un pico distintivo, muy bien definido en todas las muestras.

El pico número II, corresponde a la fracción de proteína eluída con buffer de acetato de sodio conteniendo 1-propanol al 35%. Se puede observar variación en cuanto al número de picos pequeños que presenta esta fracción en las diferentes muestras, indicando probablemente las diferentes subunidades presentes.

El pico número III, corresponde a la proteína eluída con urea 8M, se compone al igual que el anterior, de varios picos correspondientes a las diferentes subunidades presentes en esta fracción y que fueron eluidas por ese poderoso agente desnaturizante que elimina cualquier proteína remanente en la matriz débilmente hidrofóbica; representa por lo tanto a las proteínas que son más hidrofóbicas en las variedades de trigo estudiadas.

Proteína Eluída en las Fracciones Cromatograficas y Recuperación

La Tabla VIII muestra los resultados de la cromatografía de interacción hidrofóbica indicando el contenido de proteína en cada una de las fracciones y el porcentaje de recuperación para las 25 muestras de trigo panadero rojo fuerte de invierno. La recuperación de proteína de la columna fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), y se encuentra en el rango de 50.06 % a 89.47%. Este rango tan amplio indica el gran polimorfismo presentado por estas proteínas y en consecuencia la variación en hidrofobicidad superficial relativa.

Tabla VIII. Proteína eluida en las fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica.

Número de Muestra	Contenido de Proteína (%)			Recuperación de Proteína (%)
	FI ¹	FII ²	FIII ³	
1	23,10	43.03	33.86	63.14
2	25.80	44.89	29.30	53.13
3	58.01	18.41	21.07	55.00
4	65.35	25.90	8.74	60.81
5	33.36	25.22	41.41	68.46
6	23.26	19.05	57.73	69.22
7	33.43	43.67	22.90	83.03
8	34.79	31.89	33.31	58.93
9	24.90	47.08	27.98	89.47
10	39.16	36.15	24.69	87.31
11	45.36	25.87	28.76	73.39
12	39.17	33.37	27.45	76.79
13	21.11	42.94	35.94	79.12
14	25.01	36.14	38.84	57.34
15	16.80	60.11	22.59	58.60
16	25.48	44.92	29.59	51.80
17	27.38	35.04	37.57	67.54
18	14.83	39.80	45.34	50.06
19	35.00	32.10	32.89	82.27
20	48.94	16.59	34.46	76.43
21	48.09	12.48	39.43	60.60
22	30.24	34.64	35.12	85.18
23	32.41	37.83	29.75	66.48
24	23.45	42.74	33.80	74.28
25	37.79	37.76	24.44	85.42

¹FI = Fracción I; ²FII = Fracción II; ³FIII = Fracción III.

Los resultados indicaron que las gluteninas estabilizadas (reducidas y alquiladas), se separaban con éxito, al igual que en otros estudios como el de Magnus y Khan (1992), usando fenil-Sefarosa como matriz, y Torres y col. (2000), usando agarosa altamente acetilada.

El fraccionamiento de las gluteninas por cromatografía de interacción hidrofóbica es importante para el estudio de la hidrofobicidad superficial de las gluteninas y en general para las proteínas del gluten; también es importante para detectar cambios en la conformación, tal como se ha mostrado en otros estudios (Popineau, 1985; Torres y col., 2000). Los resultados del presente estudio muestran que una parte de la proteína eluyó con búfer de acetato de sodio 7mM a pH 3.6 conteniendo 35 % de n-propanol y otra parte con urea 8 M.

Por otro lado, no se encontró correlación significativa entre calificación de calidad y las fracciones cromatográficas I, II, y III de las muestras de trigo panadero rojo fuerte de invierno, debido quizá a la variación alélica; el que una misma subunidad se eluya en fracciones de diferente hidrofobicidad, indica muy probablemente, polimorfismo conformacional. Sin embargo, hay dos nuevos resultados de correlación que no habían sido reportados previamente y son: La correlación muy significativa entre la calidad de la miga y la recuperación de proteína con un valor de 0.4870 ($p < 0.01$) y la correlación significativa entre el volumen de pan y la recuperación de proteína 0.2833 ($p < 0.05$); a su vez, la calificación de calidad correlaciona significativamente con la calidad de la miga (0.3847, $p < 0.05$) y el volumen de pan (0.4887, $p < 0.01$). El fraccionamiento cromatográfico muestra que las diferentes clases de proteínas presentan variabilidad en sus hidrofobicidades de superficie, ya que sólo los aminoácidos hidrofóbicos expuestos o accesibles, característicos de cada proteína, interaccionan con la matriz (Popineau, 1994), por lo que cada variedad presenta un patrón de elución característico que depende de su composición de subunidades y de las hidrofobicidades de las mismas.

Las proteínas se reconocen como los componentes más importantes que gobiernan la calidad del pan, un alto contenido de proteína generalmente se relaciona con buena calidad en la elaboración de pan. Sin embargo, esta cantidad sola no puede explicar toda la variación que existe en la elaboración de pan, otros factores como la calidad de proteína son también importantes (Weegels y col. 1996); aunque entre mayor es el contenido proteico, mayor es el volumen de pan, existen grandes diferencias en el volumen de pan que no puede ser explicada solo con el contenido de proteína.

El porcentaje de recuperación de proteína en la muestra 18 fue de 50.06%, el valor más bajo de todas las muestras. En las fracciones II y I de esta muestra se eluyó o lavó casi la misma cantidad de proteína: 40 y 45 % respectivamente. Puede observarse que aunque esta muestra presenta un porcentaje de proteína muy bajo (10.68%), su calificación de calidad fue 10, el valor más alto. Esto indica que su calidad depende de su composición de subunidades (par de alelos 5 + 10); así mismo, su volumen de pan fue de 870 cc y con un valor de 4 en calidad de la miga. En contraparte, la muestra 9, con el valor más alto en la recuperación de proteína, 89.47 %, con un contenido de proteína de 12.02 %, un volumen de pan de 925cc y con un valor de 4.8 en calidad de la miga, presenta una calificación de calidad de 9 en base a composición de subunidades. Estos resultados indican que el porcentaje de recuperación cromatográfico no se relaciona con la calificación de calidad. Además, la relación no es lineal en cuanto al contenido de proteína, el volumen de pan y la calidad de la miga, existiendo grandes diferencias entre variedades en base a composición de subunidades e hidrofobicidad de las mismas.

El análisis estadístico de las fracciones cromatográficas no muestra variación significativa en la hidrofobicidad de superficie para las gluteninas de masa molecular alta de las variedades de trigo panadero incluidas en el estudio, como puede observarse en la Figura 19; pero si hay diferencias en la

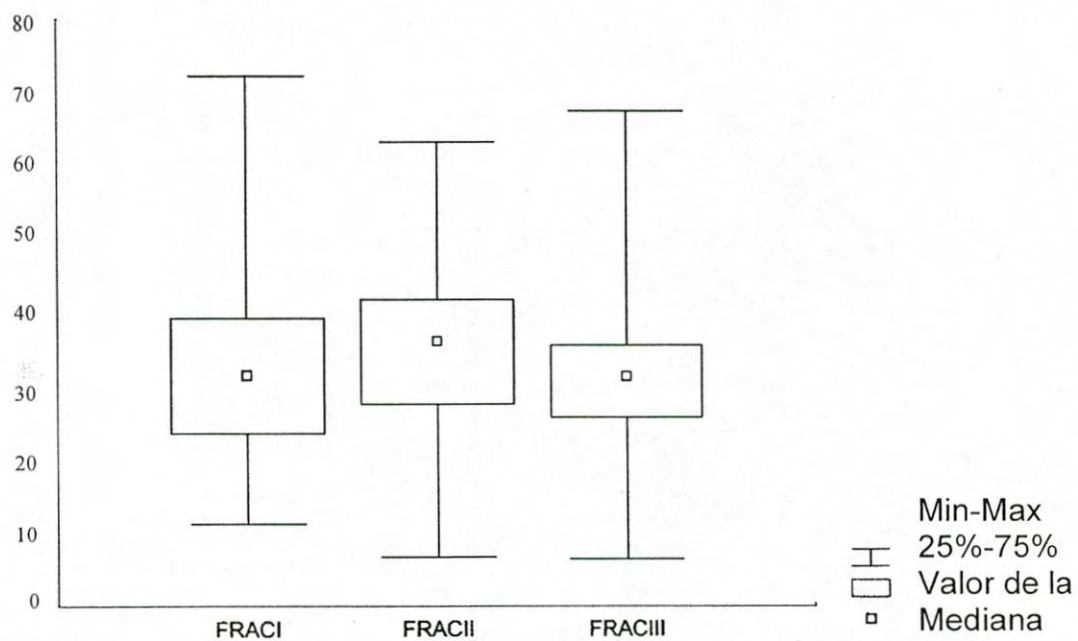


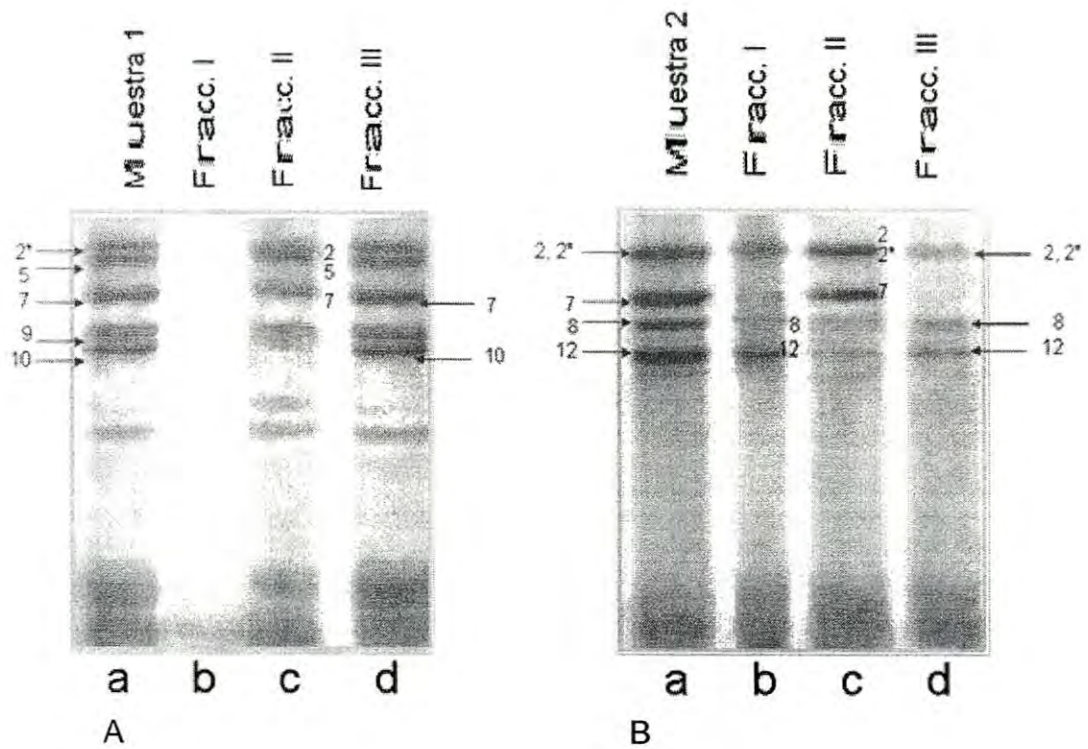
Figura 19. Variación en los porcentajes de proteína eluída en las fracciones cromatográficas de diferente hidrofobicidad.

hidrofobicidad de las proteínas individuales eluidas en cada fracción, lo que puede comprobarse por el análisis de los patrones electroforéticos de las fracciones en las diferentes variedades.

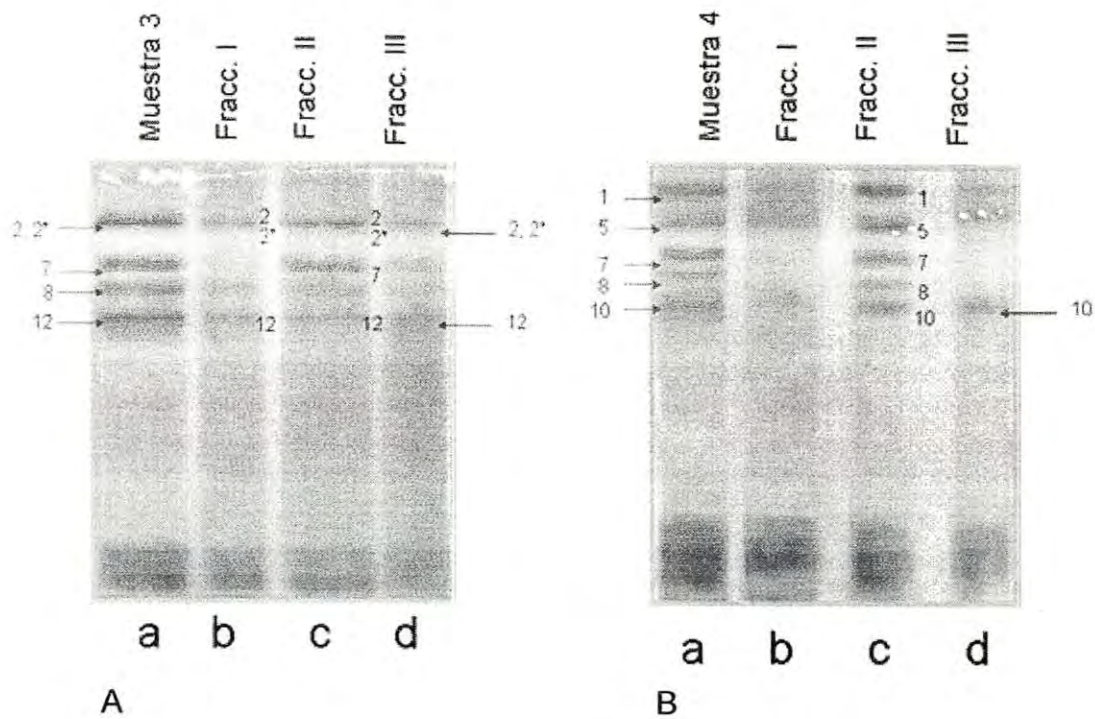
Los valores de la mediana en cada fracción y la distribución de los valores muestran que estas proteínas, en promedio, contienen una alta cantidad de proteínas hidrofóbicas. La variación en los porcentajes de proteína eluida en las fracciones cromatográficas de diferente hidrofobicidad se muestra en la Figura 29. El valor máximo para la fracción I es 72.64% y el mínimo, 11.58%; el valor para el 75% de los valores es 39.17 y el 25% es 22.96. El valor de la mediana es 31.95; y para la fracción II se tiene un máximo de 63.62% y un mínimo de 7.01%. El 75% es 42.04 y el 25% de los valores es 27.04. El valor de la mediana es 36.57. El límite máximo para la fracción III es 67.86% y el mínimo es 6.72%. El valor de 35.72 corresponde al 75% y 26.07 representa el 25%. El valor de la mediana es 31.695. Los valores de la mediana son semejantes ($p = 0.05$), teniendo casi el mismo valor para las fracciones I y II.

Electroforesis de Fracciones Cromatográficas de Subunidades de Glutenina de Masa molecular alta

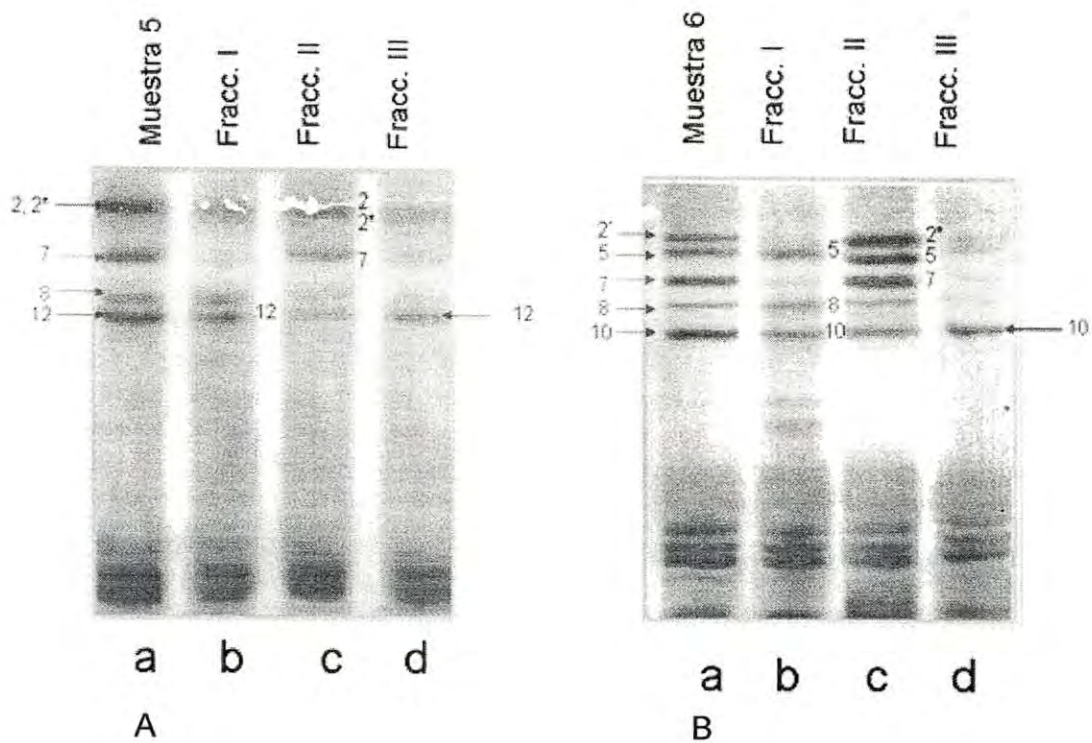
De las Figuras 20 a la 32 se muestran los electroferogramas de las fracciones proteicas obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) de las subunidades de glutenina de masa molecular alta de los trigos panaderos. En las Figuras se observa que cada una de las variedades presenta un patrón electroforético característico según su composición de subunidades; además cada variedad tiene un comportamiento diferente según la fracción que corresponde al patrón de elución proveniente de la HIC, observándose diferentes intensidades en las bandas correspondientes a las subunidades en cada fracción y dentro de una misma fracción. Por ejemplo, analizando la Figura



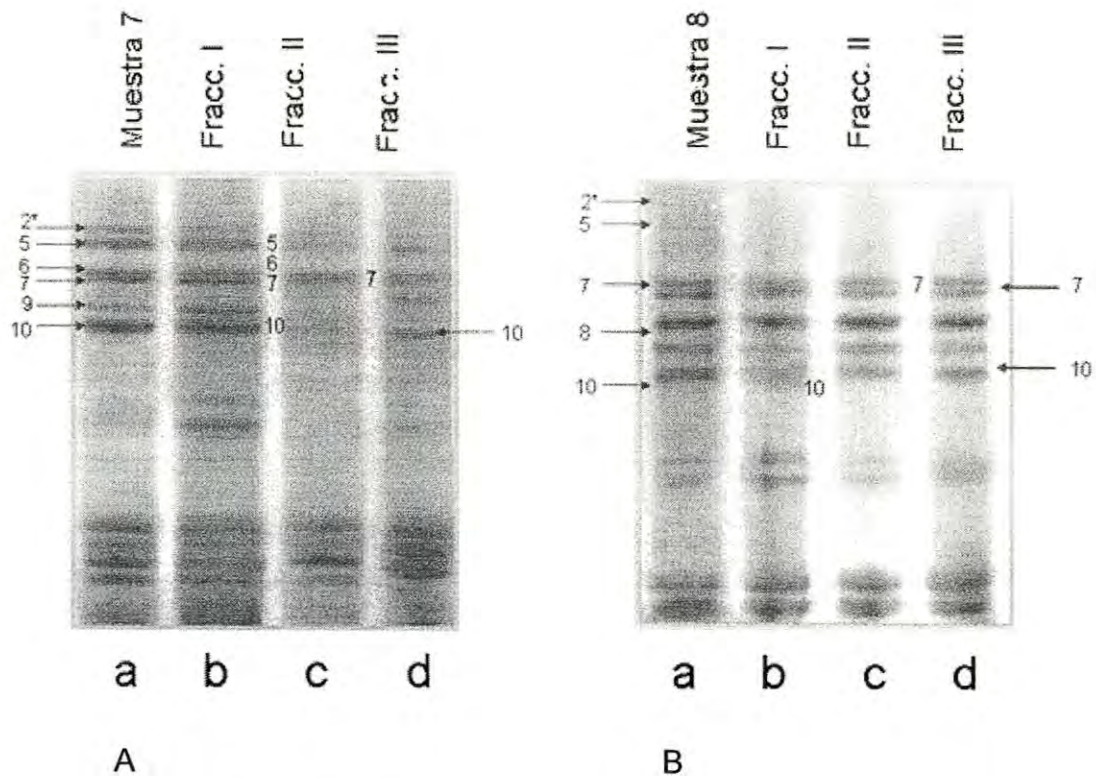
Figuras 20, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 1 y B) 2. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b),c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



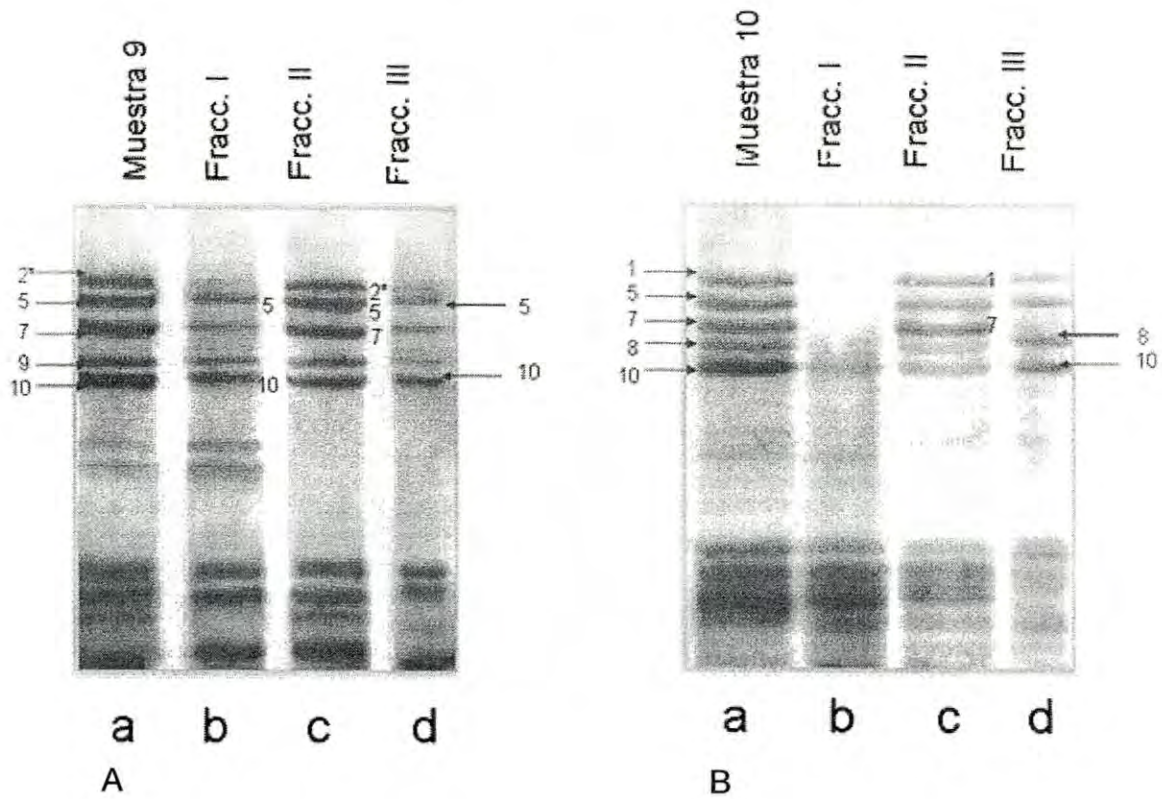
Figuras 21, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de gluteninas estabilizadas obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 3 y B) 4. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



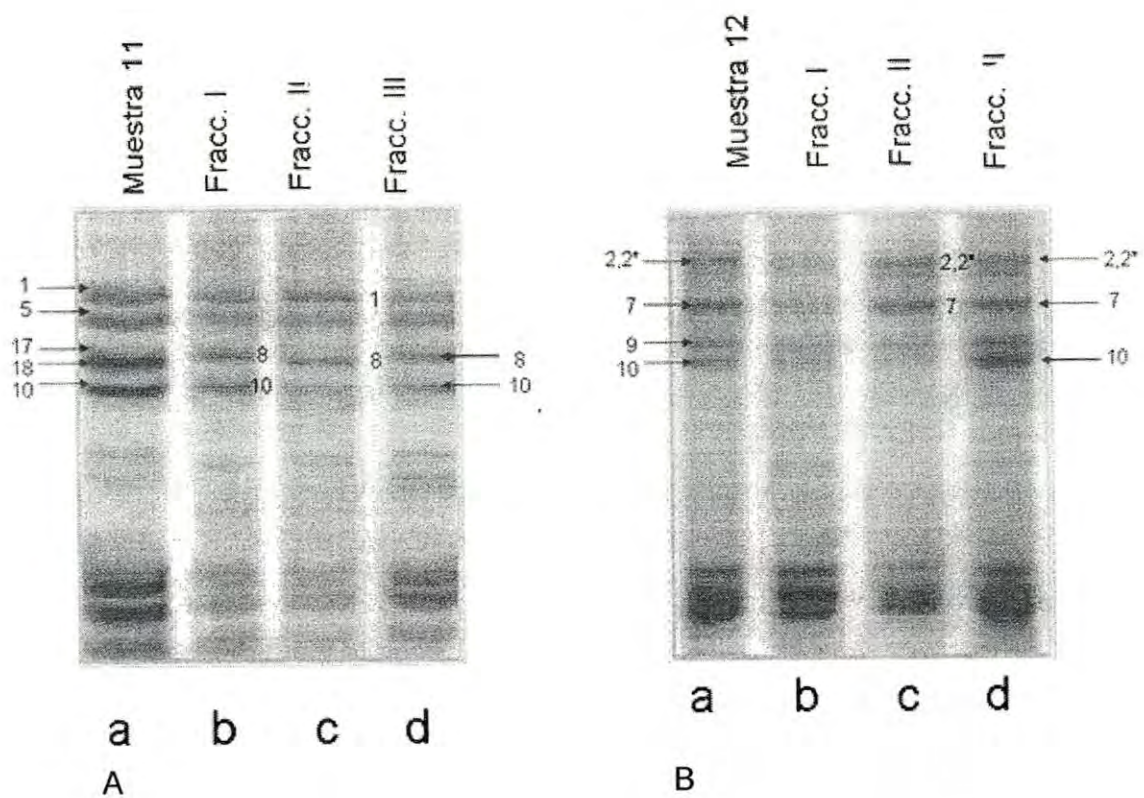
Figuras 22, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 5 y B) 6. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b),c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



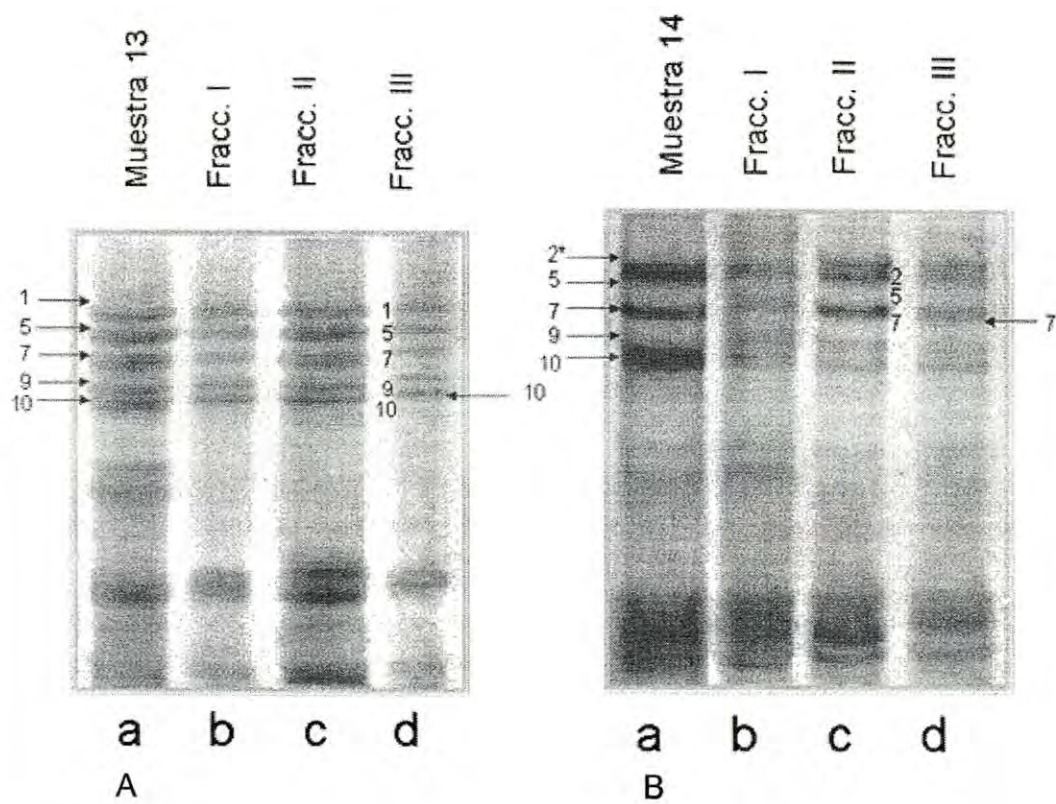
Figuras 23 A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 7 y B) 8. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b),c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



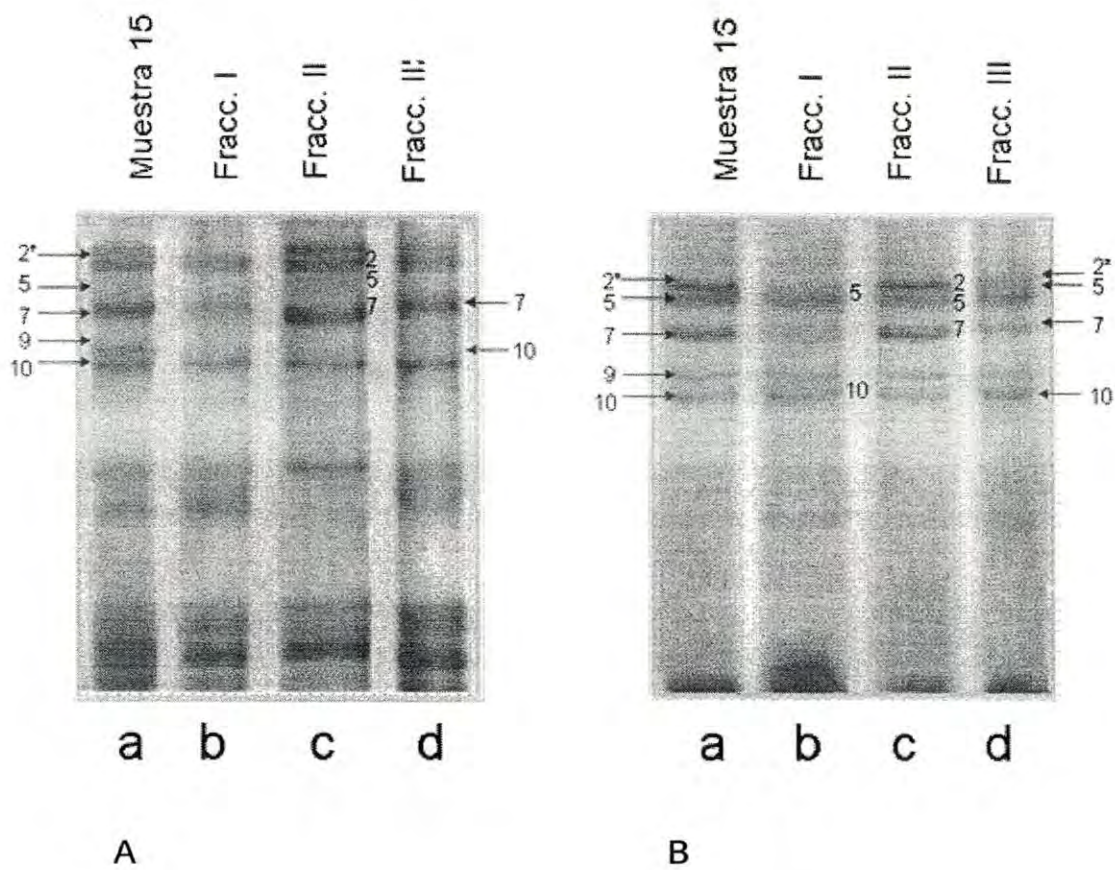
Figuras 24, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 9 y B) 10. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b),c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



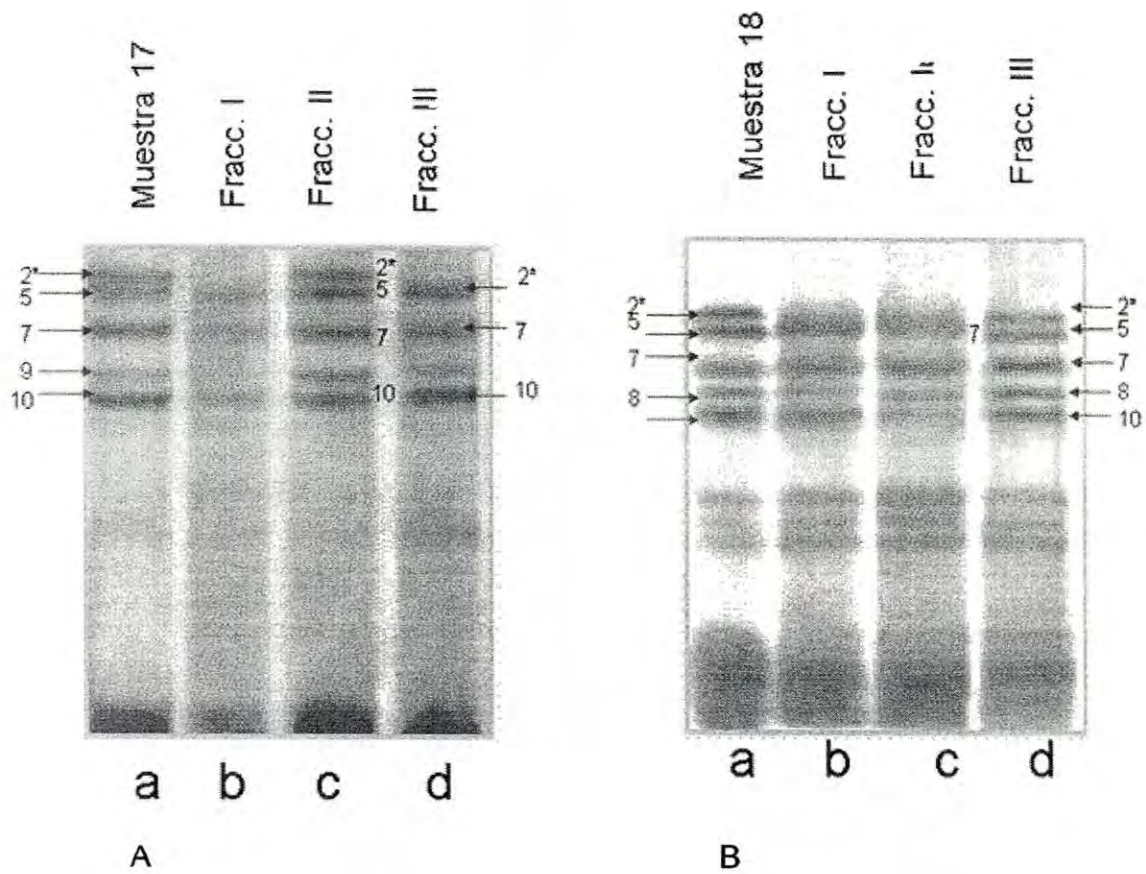
Figuras 25, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica de las muestras A) 11 y B) 12. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b),c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



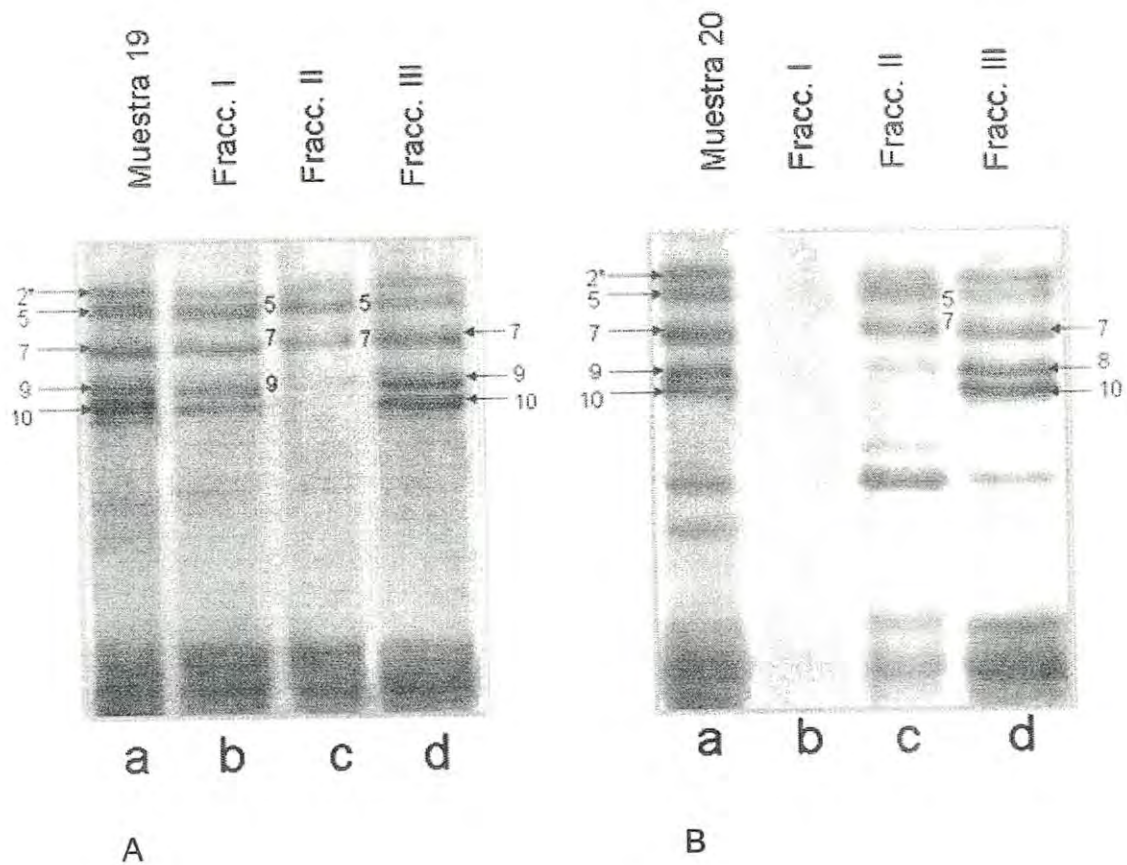
Figuras 26, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por Cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 13 y B) 14. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



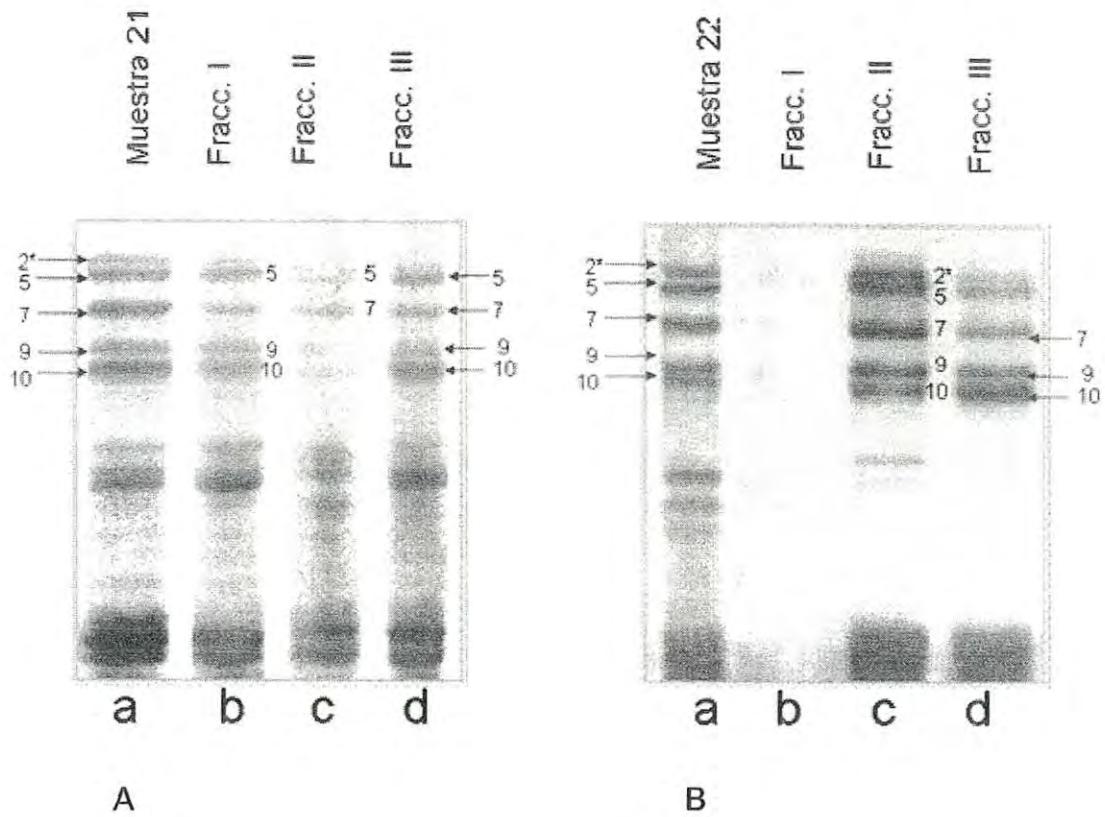
Figuras 27, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 15 y B) 16. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



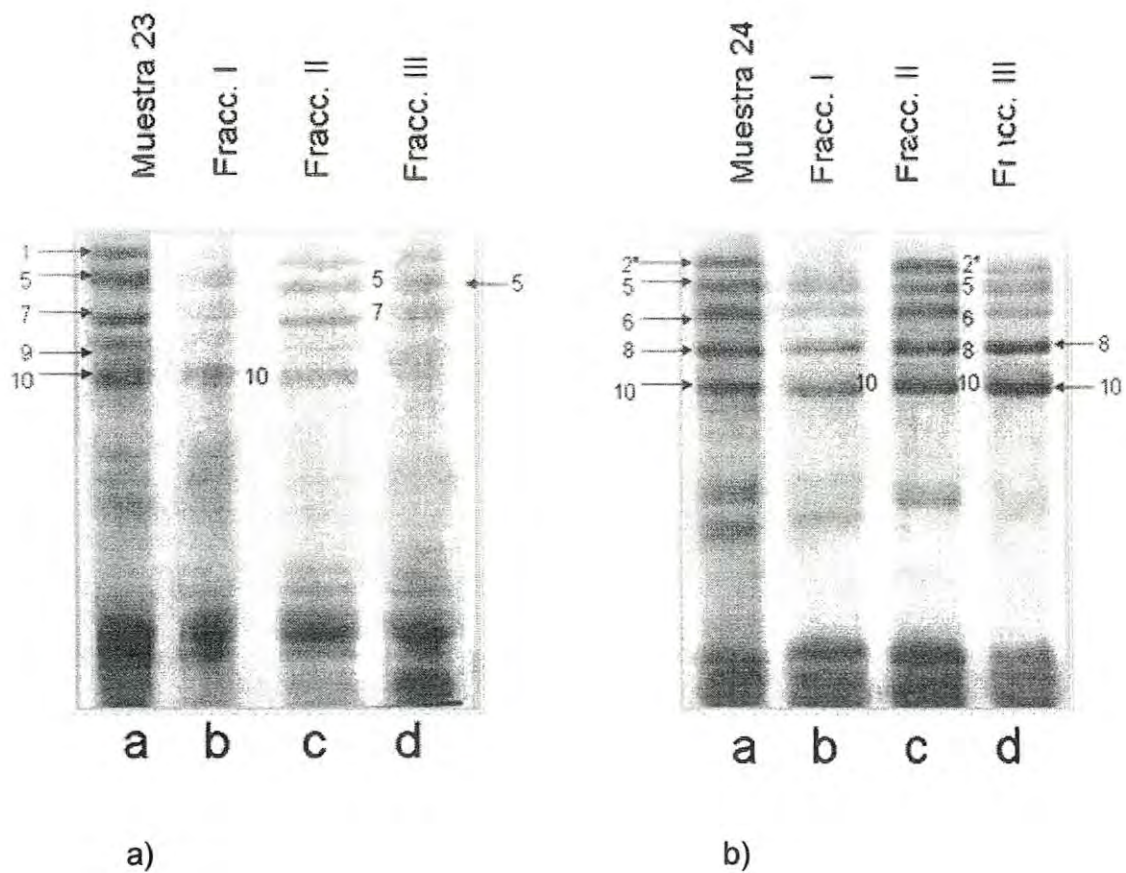
Figuras 28, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 17 y B) 18. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



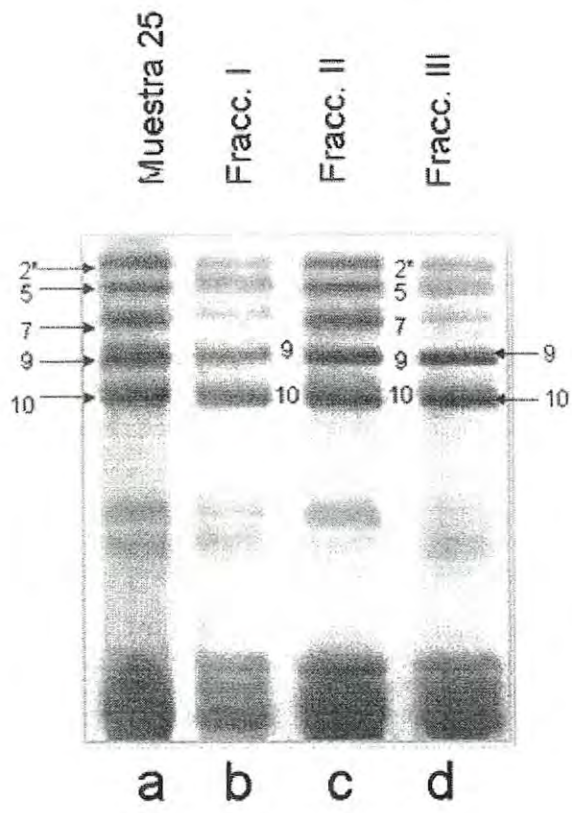
Figuras 29, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 19 y B) 20. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



Figuras 30, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 21 y B) 22. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



Figuras 31, A y B. Patrones electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de las muestras A) 23 y B) 24. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida correspondiente a cada fracción cromatográfica.



A

Figura 32, A. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones de proteína obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de la muestra A) 25. El carril a) muestra la fracción completa y los demás b), c) y d); muestran el patrón electroforético de la proteína eluida en cada fracción cromatográfica.

20 A, que corresponde a la muestra 1, se observa que la fracción I, no muestra bandas en el electroferograma debido probablemente a que la proteína se agregó antes de su análisis electroforético. Sin embargo puede observarse que la segunda fracción correspondiente a la elución de la proteína en búfer de acetato de sodio pH 3.6 conteniendo 1-propanol al 35%, muestra bandas intensas en la región correspondiente a la migración de las subunidades 2*, 5 y 7; y en la tercera fracción se observan todas las subunidades presentes en esta muestra pero con mayor intensidad las bandas correspondientes a las subunidades 7 y 10, lo que indica mayor hidrofobicidad de estas subunidades, ya que fueron eluidas de la matriz con urea 8M. En la figura 20 B, se observa el patrón electroforético de la muestra 2, la cual presenta bandas de proteína en la región 2,2* y 12 con mayor intensidad que la banda correspondiente a la subunidad 8 en la fracción I, y con un patrón de bandas intensas en la región 2,2* y 7 en la fracción II; la tercera fracción muestra poca intensidad de bandas correspondientes a las subunidades 2,2* y 12 lo que indica menor hidrofobicidad de estas proteínas que la presentada por las subunidades 7 y 10 de la muestra 1 en esta fracción. Todos las demás variedades presentan variabilidad semejante en la intensidad de las bandas según su composición de subunidades e hidrofobicidades.

Distribución de las Subunidades en Fracciones de Diferente Hidrofobicidad

En estudios llevados a cabo previamente (Torres y col., 2000), la cromatografía de interacción hidrofóbica se utilizó para estudiar la hidrofobicidad de superficie de las proteínas gluteninas y para determinar cambios en la conformación. Los aminoácidos expuestos de las proteínas gluteninas interactúan con la matriz débilmente hidrofóbica y de estos aminoácidos depende su adsorción en la columna. Según el comportamiento cromatográfico observado, estas proteínas presentan polimorfismo conformacional, como se

observa en el análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones cromatográficas de las 25 variedades.

Se observaron diferencias en la afinidad por la matriz, entre subunidades tipo x y tipo y, indicando diferencias en la hidrofobicidad entre las subunidades. Por ejemplo, las subunidades 10 (Dy10) y 12 (Dy12), mostraron mayor afinidad por la matriz. A su vez la subunidad 2 (Dx2) fue menos hidrofóbica que la subunidad 5 (Dx5), las dos de tipo x, y con mayor peso molecular que las subunidades 10 y 12.

Los patrones electroforéticos (SDS-PAGE), de las fracciones de HIC mostraron que las propiedades de hidrofobicidad superficial difieren ampliamente entre las subunidades de gluteninas de masa molecular alta, ya que estaban presentes en diferente proporción en las tres fracciones cromatográficas que fueron cuantificadas por el método de Bradford.

Las Figuras 20 A) y B) muestran el patrón electroforético típico de las fracciones cromatográficas de subunidades de gluteninas reducidas y estabilizadas por alquilación con 4 vinil piridina, de dos muestras con subunidades 5 + 10 y 2 + 12, respectivamente. Se observa un comportamiento diferente para las subunidades tipo x y tipo y. Las subunidades tipo x, fueron eluidas preferentemente en la fracción II, como ejemplo están las muestras No. 14 y No.16 (Figs. 26B y 27B, respectivamente). Sin embargo, se observa su presencia en las otras dos fracciones cromatográficas.

Las subunidades 5 y 10, par de alelos codificados por el genoma D, reciben el más alto puntaje, cuando se trata de obtener la calificación Glu 1 (Tabla III, página 54, Materiales y Métodos). Se dan dos situaciones con relación al comportamiento cromatográfico de la subunidad 5:

- 1) Se encuentra predominantemente en la fracción II y en forma de trazas en las fracciones I y III (Figs. 27A y 27B, muestras No. 15 y No.16), y 2) La situación más frecuente es que se encuentre distribuida en forma proporcional en las tres

fracciones. Esta subunidad se encuentra en la fracción II, como la mayoría de las subunidades tipo x, lo que puede interpretarse como una hidrofobicidad relativamente baja de las subunidades tipo x con respecto a las subunidades tipo y. Su presencia en las fracciones I y III puede explicarse con la existencia de otras formas de mayor hidrofobicidad. La subunidad 10 se eluyó más frecuentemente en la fracción III de mayor hidrofobicidad y en menor proporción en la fracción I (Figs. 24B y 29A, muestras No.10 y No.19), aunque se observó que esta subunidad se distribuyó también en las tres fracciones. El comportamiento de la subunidad 10 sugiere una hidrofobicidad relativa alta, lo que hace que se eluya en la fracción más hidrofóbica. De la misma forma, la hidrofobicidad superficial de esta subunidad se reduce al interaccionar con ella misma o con otras subunidades (Popineau, 1985), lo cual explica su presencia en la fracción no retenida.

Las subunidades 2 y 12, par de alelos codificados también por el genoma D, reciben una calificación baja, cuando se trata de obtener la calificación Glu1. La subunidad 2, aunque se encuentra preponderantemente en la fracción II, como las subunidades tipo x, se le puede observar también en la fracción I. Podemos afirmar por las evidencias y el comportamiento cromatográfico que la subunidad 2 es relativamente menos hidrofóbica que la subunidad 5. Por otro lado, se encontró a la subunidad 12 distribuida homogéneamente en las tres fracciones; comparando con el comportamiento de la subunidad 10, podemos suponer que la subunidad 12 es conformacionalmente menos estable que la subunidad 10. Ésta última se había reportado estable al tratamiento químico (Lafiandra, 1993). El hecho de que una proporción importante de la subunidad 12 se eluya en la fracción II es evidencia de una hidrofobicidad menor de esta subunidad con relación a la subunidad 10.

Las HMW-GS 8 y 9 fueron eluidas en las tres fracciones, sin embargo se observa que la subunidad 9 es más hidrofóbica que la 8, ya que se eluye en la fracción II más frecuentemente. Las subunidades 1,2, 2*, y 7 fueron eluidas en la

fracción II; el par 7+9 es más hidrofóbico ya que se eluye más en las fracciones II y III en comparación con el par 7+8 que aparece más en la fracción II, a su vez, el par 17 +18 presenta más variabilidad y se distribuye en las tres fracciones, apareciendo la subunidad 17 más en las fracciones I y III, por lo que resulta ser más hidrofóbica que la subunidad 18.

Algunas de las subunidades de glutenina tienen hidrofobicidades semejantes, pero otras resultan ser significativamente más hidrofóbicas, según los resultados obtenidos, que concuerdan con los resultados de estudios previos (Popineau, 1985; Torres y col., 2000). La distribución de los valores indica que estas proteínas en promedio tienen alta hidrofobicidad, pero esta propiedad varía por los cambios conformacionales de la proteína. Por lo tanto, no fue posible establecer una escala precisa de hidrofobicidades para estas proteínas, pero la composición de subunidades sí puede ser utilizada como un indicador de la calidad en la elaboración de pan en las diferentes variedades.

Existe mucha variabilidad para cada uno de los patrones electroforéticos de las fracciones de gluteninas, tomando en cuenta que se tienen 25 variedades de trigos panaderos y que estos presentan variabilidad en sus características de calidad, no obstante, que algunas variedades tengan la misma composición de subunidades o la misma calificación de calidad, lo que implica que todas las características de calidad están relacionadas con composición de subunidades y con las hidrofobicidades de las mismas. Por lo tanto, la calidad del pan no sólo depende del contenido proteico, sino también de factores tales como la relación entre proteína monomérica y polimérica (distribución del tamaño de las proteínas del gluten) y más específicamente de la distribución del tamaño de la proteína polimérica, que determina el tiempo de mezclado de la masa. Desde luego, la interacción de estas proteínas con otros componentes de la harina también debe tomarse en cuenta.

CONCLUSIONES

1. La hidrofobicidad superficial de las subunidades de glutenina de masa molecular alta de las diferentes variedades de trigos panaderos que comprende el estudio presenta una gran variabilidad. Se encontró una correlación significativa entre el volumen de pan y la calidad de la miga con la calificación de calidad y una relación con hidrofobicidad relativa estimada por cromatografía de interacción hidrofóbica.
2. Se obtuvo la calificación de calidad total (Score Glu-1) de las muestras de trigo panadero. Las variedades que más correlacionan con buena calidad presentan mayor hidrofobicidad y esto se observa en las muestras en las que están presentes las subunidades 5+10. Por lo tanto, el análisis electroforético de las gluteninas de masa molecular alta, es una herramienta importante para seleccionar por calidad, por lo que su uso resultaría apropiado por los fitomejoradores de trigos mexicanos.
3. De las 25 variedades de trigos panaderos incluidas en el estudio, el 84 % tiene subunidades relacionadas con buena calidad (par 5+10), y sólo el 16 % corresponden a subunidades 2+12 asociadas con menor calidad en la elaboración de pan. Sin embargo, en estas últimas variedades están presentes subunidades del genoma B, tales como la subunidad individual 2* y el par de subunidades 7 + 8, que contribuyen con un valor numérico alto para calidad.
4. La calificación de calidad promedio de las 25 variedades de trigo rojo fuerte de invierno fue 9, muy alta, debido al alto porcentaje de variedades que tienen el par de alelos 5 + 10, que se asocia con buena calidad, indicando la buena calidad panadera de estos trigos.

5. El fraccionamiento de las proteínas por cromatografía de interacción hidrofóbica mostró que en las fracciones de diferente hidrofobicidad, las subunidades presentaron cambios de conformación entre subunidades iguales de una misma variedad y entre subunidades de diferentes variedades con la misma composición de subunidades de masa molecular alta. Por lo tanto, el fraccionamiento de las gluteninas por HIC es importante para el estudio de la hidrofobicidad superficial de las gluteninas estabilizadas y en general para las proteínas del gluten; ya que permite detectar cambios en la conformación.
6. El uso de una matriz de baja hidrofobicidad, ha encontrado ventajas en la aplicación de la cromatografía de interacción hidrofóbica, permitiendo una separación específica de acuerdo a diferencias de hidrofobicidad de las proteínas del gluten, como ha sido demostrado en trabajos previos y como se comprobó en el presente estudio.
7. La correlación de las subunidades de glutenina con calidad, encontrada en este estudio, mostró la importancia de las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos hidrofóbicos, presentes en la superficie de estas proteínas y por lo tanto, la importancia de estas interacciones no covalentes para estabilizar la estructura secundaria de las proteínas del gluten, le permiten exhibir propiedades elásticas y de viscosidad, que hacen un buen pan.
8. En cuanto a la correlación de la hidrofobicidad con características de calidad y con calificación de calidad en la elaboración de pan, se encontró correlación entre volumen de pan y calidad de la miga y se comprobó una vez más la correlación con la absorción de agua y el contenido de proteína en las harinas de trigos panaderos.

RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio a nivel específico de subunidades y cambios de conformación. Cuantificar las subunidades presentes en cada fracción cromatográfica obtenida para establecer con certeza las diferencias en calidad en la elaboración de pan.

La implementación de metodologías y técnicas apropiadas y estandarizadas, permitirá conocer los verdaderos cambios o la funcionalidad de proteínas en base a estructura, llegando en un futuro a convertirse en pruebas de utilidad para la caracterización de las distintas variedades de trigos.

Se sugiere comparar el análisis electroforético (SDS-PAGE) con electroforesis capilar, a fin de confirmar la composición de subunidades por este método que ha demostrado ser rápido, reproducible y de alta resolución. Además, se recomienda utilizar HIC en conjunto con marcadores isotópicos para las proteínas, lo que permitirá una identificación específica de subunidades en las distintas fracciones cromatográficas.

RELEVANCIA DEL ESTUDIO

Este trabajo es un estudio previo a la caracterización de trigos a nivel básico, dentro del Proyecto "Estudio Integral de los Trigos Mexicanos y su Uso Potencial" el cual tiene como objetivo caracterizar en forma integral a los trigos producidos en el país aprovechando los avances tecnológicos por aplicación de los diferentes métodos utilizados actualmente por los químicos de cereales reuniendo los resultados obtenidos de cada uno de ellos, ordenándolos, automatizándolos y correlacionándolos con características de calidad, de manera que estos trigos se conozcan con todas sus ventajas, lo cual apoyará la producción Nacional de trigo, haciendo posible la producción de variedades mejoradas para su utilización adecuada; por ejemplo trigos cristalinos para pasta y trigos panaderos.

Haber contribuido al menos con una pequeña aportación para que los trigos mexicanos sean caracterizados tomando en cuenta las propiedades estructurales únicas de las proteínas del gluten que las distinguen claramente de otras proteínas. Los resultados experimentales del presente estudio, en parte contribuirán a la elección de variedades con base en calidad funcional.

REFERENCIAS

American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC, 10th ed. Official Method 54-40. The Association: St. Paul MN.

Anderson, O. D. and Greene, F. C. 1989. The characterization and comparative analysis of high molecular weight glutenin genes from genomes A y B of hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 77:689-700.

Alizadeh – Pasdar, N. and Li-Chan, C. Y. 2000. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *J. Agric. Food Chem.* 48: 328-334.

Bean, S. R., and Lookhart, G. L. 2000. Electrophoresis of cereal storage proteins. *J. Chromatogr. A.* 881:23-36.

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

Bean, S. R., and Lookhart, G.L. 1999. Sodium dodecil sulfate capillary electrophoresis of wheat proteins. 1. Uncoated capillaries. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4246-4255.

Beckwith, A. C., Wall., J. S., and Dimler, R. J. 1963. Amide groups as interaction sites in wheat gluten proteins: effects of amide-ester conversion. *Arch. Biochem Biophys.* 103:319-330.

Bietz, J. A. and Cobb, L. A. 1985. Improved procedures for rapid wheat varietal identification by reversed-phase high-performance liquid

chromatography: optimization of extraction conditions. *Cereal Chemistry*. 61: 124 - 129.

Bietz, J. A., Shepered, K. W., and Wall, J. S. 1975. Single-kernel analysis of glutenin. Use in wheat genetics and breeding. *Cereal Chem.* 52: 513-532.

Bietz, J. A. and Kruger, J. E. 1994. The evolution of cereal protein analysis by HPLC. In: *High-performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins*. Kruger, J. E. and Bietz, J. A. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. MN, USA. 1-13

Bietz, J. A. 1983. Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.* 255:219-238.

Bietz, J. A. and Wall, J. S. 1972. Wheat gluten subunits: Molecular weights determined by sodim dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 49:416-430.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Branlard, G. And Dardevet, M. 1985. Diversity of grain protein and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular subunits and flour quality characteristics. *Journal of Cereal Science* 3: 345-354.

Branlard, G., Nutran, J. C., and Monneveux, P. 1989 High molecular weight glutenin subunits in durum wheat (*Triticum durum*). *Theor. Appl. Genet.* 78: 353-358.

Builder, Stuart E. 1993. Hydrophobic Interaction Chromatography. Principles and Methods. Pharmacia Bioprocess Technology. San Francisco, USA. Pp. 9-18, 29-32, 77-92.

Bunce, N. A. C., White, R. P., and Shewry, P. R. 1985. Variation in estimation of molecular weights of cereal prolamins by SDS-PAGE. *J. Cereal Sci.* 3: 131-142.

Burnouf, T. and Bietz, J. A. 1984. Reversed -phase high-performance liquid chromatography of reduced glutenin, a disulphide bonded protein of wheat endosperm. *Journal of Chromatography* 299:185-199.

Bushuk, W. 1986. *Wheat: Chemistry and uses*. Am. Assoc. Cereal Chem., Inc. 31:3.

Bushuk, W. and Kawka, A. 1990. Chemical reactions and interactions in dough. In: *Interactions of Cereal Components*. Proc. ICC-AACC. Symposium Vienna. Page 8.

Caldwell, A.K. 1979. The fractionation and purification of gliadins by hydrophobic interaction chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 30:185-196.

Capocchi, A., Galleschi, L., and Saviozzi, F. 2000. Isolation of wheat high molecular weight glutenin subunits from durum wheat. *Cereal Chem.* 77 (2): 105-106.

Charbonnier, L., and Moose, J. 1980. Large-scale isolation of gliadin fractions. *J. Sci. Food Agric.* 31:54-61.

Chung, K. H. and Pomeranz, Y. 1979. Acid soluble proteins of wheat flours. II binding to hydrophobic gels. *Cereal Chem.* 56:196 - 201.

Eisenberg, D., Wilcox, W., and McLachlan, A. D. 1986. Hydrophobicity and amphiphilicity in protein structure. *J. Cell. Biochem.* 31:155-161.

El Rassi, Z. and Horvath, C. 1986. Hydrophobic interaction chromatography of t-RNA's and proteins. *J. Liq. Chromatogr.* 9:3245-3268.

Field, J. M., Tatham, A. S., Shewry, P. R. 1987. The structure of a high-Mr subunit of durum wheat (*Triticum durum*) gluten *Biochem. J.* 247:215-221.

Fausnaugh, J. L. and Regnier, F. E. 1986. Solute and mobile phase contribution to the retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Chromatogr.* 359:131-146.

Gianibelli, M. C; Larroque, O. R; MacRitchie, F. and Wrigley, C. W. 2001 *Cereal Chem.* 78:635-646

Garfin, David E. 1990. One-dimensional gel electrophoresis. In "Guide to Protein purification" Edited by Murray P. Deutscher. Academic Press Inc. *Methods in Enzymology.* 182:425-441.

Green, F. C. and Kasarda, D. D. 1971. Apolar interactions of alpha-gliadin: Binding of 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate. *Cereal Chem.* 48:601-609.

Gupta, R. B., Batey, I. L., and MacRitchie, F. 1992. Relationship between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal Chem.* 69:125.

Gupta, R. B., MacRitchie, F., Shepherd, K. W., and Ellison, F. 1991. Relative contributions of LMW and HMW glutenin subunits to dough strength and

dough stickiness of bread wheat. In: Gluten Proteins 1991. W. Bushuk and R. Tkachuk, eds. Am. Assoc. Cereal Chem. : St. Paul, MN. 71-80.

Gupta, R. B., and MacRitchie, F. 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3, and Gli-1 of common wheats. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. J. Cereal Sci. 19:19-29

Friedman, M., Krull, L. H., and Cavins, J. 1970. The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as S- β -(4-pyridylethyl cysteine. J. Biol. Chem. 245:3868.

Freedman, R. B. 1979. How many distinct enzymes are responsible for several cellular processes involving thiol: protein disulphide interchange? FEBS Lett. 97:201-210.

Halford, N. G., Field, J. M., Blair, H., Urwin, P., Moore, K., Robert, L., Thompson, P., Flavell, R. B., Tatham, A. S., and Shewry, P. R. 1992. Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L) indicates quantitative effects on grain quality. Theor. Appl. Genet. 83:373-378.

Holme, J., and Briggs, D. R. 1959. Studies on the physical nature of gliadin. Cereal Chem. 36:321-340.

Hofstee, B. H. J. 1976. Hydrophobic adsorption chromatography of proteins. In: Methods of Protein Separation, Vol. 2. Eds. Dunlap, R.B. Plenum Press, NY, USA: 245-278.

Hoseney, R. C., Dreese, P. C., Doescher, L. C., and Faubion, J. M. 1987. Thermal properties of gluten. In Proc. Int. Workshop Gluten Proteins, 3rd. World Scientific Publishing Co. Teaneck, N.J. Pp. 518.

Hoseney, R. C. Finney, K. F., and Y. Pomeranz. 1970. Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. gliadin-lipid-glutenin interaction in wheat gluten. *Cereal Chem.* 47:135-140.

Hoseney, R. C. 1990. *Principles of Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA.

Hoseney, R. C. 1991. *Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales*. Ed. Acibia, S.A. Zaragoza, España.

Hoseney, R. C. 1994. *Principles of Cereal Science and Technology*. 2a. edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA.

Hubert, P. and Dellacherie, E. 1993. Molecular interactions in hydrophobic chromatography. In *Molecular Interaction in Bioseparations*. Edited by Ngo. *Thet. T.* 333-357.

Huebner, F. R. And Bietz, J. A. 1994. (a). RP-HPLC for varietal identification in cereal and legumes: Wheat. In: *High-performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins*. Kruger, J.E. and Bietz, J.A. eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. MN, USA. 97-120.

Huebner, F. R. and Bietz, J. A. 1994 (b) RP-HPLC for assessment of quality in cereals and legumes: Bread making quality. In: *High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins*. Kruger, J.E. and Bietz, J.A. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. MN, USA. 206-234

Huebner, F. R., Nelsen, T. C., Chung, O.K, and Bietz, J. A. 1997. Protein Distributions Among Hard Red Winter Wheat Varieties as Related to Environment and Baking Quality. *Cereal Chem.* 74:123 - 128.

Huebner, F. R., and Wall, J. S. 1976. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. *Cereal Chem.* 53:258-269.

Huebner, F. R. and Bietz, J.A. 1999. Quantitation and Reproducibility Problems in Reversed Phase and Size Exclusion HPLC Analyses of Wheat Proteins. *Cereal Chem.* 76(2):299-302.

Humphris, A. D. L., McMaster, T. J., Miles, M. J., Gilbert, S. M., Shewry, P. R., and Tatham A. S. 2000. Atomic Force Microscopy (afm) Study of Interactions of HMW Subunits of wheat glutenin. *Cereal Chem.* 77 (2):107-110.

Ingraham, R. H., Lau, S. Y. M., Taneja, A. K. and Hodges, R. S. 1985. Denaturation and the effects of temperatures on hydrophobic interaction and reversed-phase high performance liquid chromatography of proteins. Biogel TSK- Phenyl-5PW column. *J. Chromatogr.* 327:77-92.

Jackson, E. A., Holt, L. M. and Payne, P. I. 1983. Characterisation of high molecular weight gliadin and low molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localization of their controlling genes. *Theor. Appl. Genet.* 66:29-37.

Jennissen, H. P., Heilmeyer, I. M. G. 1975. General aspects of hydrophobic chromatography. adsorption and elution characteristic of some skeletal muscle enzymes. *Biochemistry* 14:754-760.

Kasarda, D. D., Autran, J. C., Lew, E. J. L., Nimmo, C. C., and Shewry, P. R. 1983. N-terminal amino acid sequences of omega-gliadins and omega-secalins: Implications for the evolution of prolamin genes. *BBiochim. Biophys. Acta* 747:138-150.

Kasarda, D. D 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. In : *Wheat is Unique*. Y. Pomeranz, ed. AACC, St. Paul, MN. 277-302.

Kasarda, D. D. 1999. Glutein polymers: The in vitro to in vivo transition. *Cereal Foods World*. Vol. 44(8):566-571.

Kolster, P., K. 1993. Krechting, K.F.; Van Gelder, W. M. J. variation in type and relative amounts of the high molecular weight glutenin subunits in Dutch wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 61:167-174.

Kinsella, J. E. and Hale, M. L. 1984. Hydrophobic association and gluten consistency: Effects of specific anions. *J. Agric. Food Chem.* 32:1054 - 1056.

Khan, K. G., Tamminga, G. and Lukow, O. 1989. The effect of wheat flour proteins on mixing and baking correlations with proteins fractions and high molecular weight glutenin subunit composition by gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 66:391-396.

Kruger, J. E. and Marchylo. B. A. 1990. Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography of changes in high molecular weight subunit composition of wheat storage proteins during germination. *Cereal Chem.* 67:141 - 14.

Kennedy R.M., 1990. Hidrophobic Chromatography. In: *Methods in Deutscher, M. P. (Ed.), Guide to Protein Purification. Methods Enzymology, Academic Press, Inc, London. Vol.182:339-343.*

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lafiandra, D., D'Ovidio, R., Porceddu, E., Margiotta, B., Colaprico, G. 1993. New data supporting high Mr glutenin subunits 5 as the determinant of qualitative differences in the pairs 5 + 10 vs 2 + 12. *J. Cereal Sci.* 18:197.

Lawrence, G. J., MacRitchie, F., and Wrigley, C. W. 1988. Dough and baking quality of wheat lines deficient in glutenin subunits controlled by the Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 loci. *J. Cereal Sci.* 7:109-112-

Lawrence, G. J. 1986. The high molecular weight glutenin subunit composition of Australian wheat cultivars. *Aust. J. Agric.Res.* 37:125-133.

Lasztity, R. 1984. The chemistry of cereal proteins. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. In: *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol X. 1990. Y. Pomeranz. Cap.2. AACC.

Lookhart, G. L., Jones B. L., Hall, S. B. and Finney, K. F. 1982. An improved method for standardizing polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadin proteins. *Cereal Chem.* 59:178-181.

Lookhart, G. L., Hagman-Kayla and Kasarda, D. D. 1993. High-molecular-weight glutenin subunits of the most commonly grown wheat cultivars in the U.S. in 1984. *Plant Breeding* 110:48-62.

Lookhart, G. L., and Bean, S. R. 1996. High-performance capillary electrophoresis (HPCE): An overview of a new method to characterize gluten proteins. In: *Gluten 96*. C. Wrigley, ed. RACI: Melbourne, Australia. 399-402.

Lookhart, G. L. 1997. New methods helping to solve the gluten puzzle. *Cereal Foods World*. 42:16-19.

MacRitchie, F., DuCross, D. L. and Wrigley, C. W. 1990. Fluor polypeptides related to wheat quality. In: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol X. Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN. 79-145.

MacRitchie, F. 1996. Wheat proteins physicochemistry and functionality. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 36. Kinsella, J.E. Editor. Academic Press, Inc. New York.

MacRitchie, F. 1999. Wheat proteins: Characterization and role in flour functionality. *Cereal Food World*. 44:188-193.

Magnus, E. M., and Khan, K. 1992. Hydrophobic properties of reduced and alkylated acetic acid-soluble glutenin-fraction by hydrophobic interaction chromatography, *Cereal Chem*. 69:607-612.

Marchylo, B. A., Kruger, J. and Hatcher, D. W. 1990. Quantitative analysis of hmw glutenin subunits by RP-HPLC. In: *Glutens Protein 1990*. Bushuk, W and Tkachuk, R., editors. 334-347.

Marchylo, B. A., Lukow. O. M., and Kruger, J. E. 1992. Quantittiv varation in hih molecular weight glutenin subunit 7 in som Canadian wheats. *J. Cereal Sci*. 15:29-37.

Margiotta, B., Colaprico, G., D'Ovidio, R. and Lafiandra, D. 1993. Characterization of high Mr subunits of glutenin by combined chromatographic (RP-HPLC) and electrophoretic separation and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of their encoding genes. *Journal of Cereal Science* 17:221 – 236.

Masci, S., Lafiandra, D., Porceddu, E., Lew, J. L., Tao, H. P., and Kasarda, D. D. 1993. D-glutenin subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. *Cereal Chem.* 70:581-585.

Mills, E. N. C., Field, J. M., Kauffman, J. A., Tatham, A. S., Shewry, P. R. and Morgan, M. R. A. 2000. Characterization of a monoclonal antibody specific for HMW subunits of glutenin and its use to investigate glutenin polymers. *J. Agric. Food. Chem.* 48 (3):611-617.

Melander, W., and Horvath, C. 1977. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series, *Arch. Biochem. Biophys.* 183:200-215.

Ng, P. K. W. and Bushuk, W. 1989. Concerning nomenclature of high-molecular-weight glutenin subunits. *J. Cereal Sci.* 9: 53-60.

Nozaki, Y., and Tanford, C. 1971. Solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale. *J. Biol. Chem.* 246:2211-2217.

Ott, L. 1984. *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis.* Second Edition. PWG Publishers, U.S.A.

Osborne, T. B. 1907. *The Proteins in the Wheat Kernel.* Publications of the Carnegie Institution Washington, No. 84. Judd and Detweiler. Washington, USA.

Payne, P. I., Corfield, K. G. and Blackman, J. A. 1979. Identification of high molecular weight subunits of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theoretical and Applied Genetics* 55:153 – 159.

Payne, P. I., Law, C. N., and Mudd, E. E. 1980. Control by homoeologous group 1 chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 58:113-120.

Payne, P. I., Corfield, K. G., Holt, L. M. and Blackman, J. A. 1981. Correlations between the inheritance of certain high molecular-weight subunits of glutenin and breadmaking quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.* 32: 51.

Payne, P. I., Nightingale, M. A. Krattiger, A. F., and Holt, L. M. 1987. The relationship between HMW-glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40: 51.

Payne, P. I. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:68-71.

Payne, P. I., Holt, L. M., Jackson, E. A. and Law, C. N. 1984. Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 304:359-371.

Payne, P. I., Holt, L. M., Jarvis, M. G. and Jackson, E. A. 1985. Two-dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (*Triticum aestivum*): Biochemical and genetics studies. *Cereal Chem.* 62:319-326.

Payne, P. I., Holt, L. M., and Lawrence, G. J. 1983. Detection of a novel high molecular weight subunits of glutenin in some Japanese hexaploid wheats. *J. Cereal Sci.* 1:3-8.

Pedersen, B., Bach, K. E. and Eggum, B. O. 1991. Nutritive value of cereal products with emphasis on effect of milling. In: *Nutritional Value of Cereal Products, Beans and Starches*. Bourne, G. H. Editor. Vol. 60. Karger, Grenada, West Indies.

Preston, K. R. 1984. Gel filtration and characterization of neutral salt extracted wheat gluten proteins varying in hydrophobic properties. *Cereal Chem.* 61:76-83.

Primard, S., Graybosh, R., Peterson, C. J., and Leon, J. H. 1991. Relationships between gluten protein composition and quality characteristics in flour populations of high-protein, hard red winter wheat. *Cereal Chem.* 68: 302 – 312.

Pomeranz, Y. 1988. Chemical composition of kernel structures. In: *Wheat: Chemistry and Technology*. Pomeranz, Y. Editor. 2a. Edition. American Association of cereal Chemists. Inc. St. Paul, Minnesota, USA.

Pomeranz, Y. 1990. *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. X. Edited by Y. Pomeranz. AACC. St. Paul, Minnesota, USA. 16-20.

Pomeranz, Y. 1994. *Wheat is Unique*. AACC. Second printing. St. Paul MN, USA.

Popineau and Godon, B. 1982. Surface hydrophobicity of gliadin components. *Cereal Chem.* 59: 55-62.

Popineau, Y. 1985. Fractionation of acid soluble proteins from wheat gluten by hydrophobic interaction chromatography: Evidence for Different Behavior of Gliadin and Glutenin Proteins. *J. Cereal Sc.* 3:29-34.

Popineau, Y. and Pineau, F. 1987. Investigation of surface hydrophobicities of purified gliadins by hydrophobic interaction chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and apolar ligand binding. *Journal of Cereal Science* 5:215–231.

Popineau, Y. and Pineau, F. 1988. Changes of conformation and surface hydrophobicity of gliadins. *Lebenssm – Wiss. U -Technol.* 2:113-117.

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*. Eds. Kruger, J.E. and Bietz, J.A. American Association of Cereal Chemists, Inc. MN, USA. 393 – 426.

Popineau, Y. and Feillet, P. 1990. Protein-protein interactions. In: *Interactions of Cereal Components*. Proc. ICC-AACC Symposium, Vienna. Page 29.

Porath, J. 1987. Salting-Out adsorption techniques for protein purification. *Biopolymers*. 26:S1933-S204.

Porath, J. 1986. Salt-promoted adsorption: recent developments. *J. Chromatogr.* 131:99-108.

Pfluger, L. A., Ovidio, R. D., Margiotta B., Peña, R., Mujeeb-Kasi A., and Lafiandra, D. 2001. Characterization of high and low molecular weight glutenin subunits associated to the genome of *Aegilops tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats. *Theor. Appl genet.* 103:1293-1301.

Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., and Cabral, J. M. S. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology* 87:143-159.

Rouset, M., Carrillo, J. M., Qualset, C. O., and Kasarda, D. D. 1992. Use of inbred recombinant lines of wheat for study of associations of high molecular-weight glutenin subunit alleles to quantitative traits. 2. milling and breadbaking quality. *Theor. Appl. Genet.* 83:403-412.

Serna, S. S. 1996. *Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales*. A.G.T. Editor, S.A. México 11800, D.F. Primera edición.

Shewry, P. R., Halford, N. G. and Tatham, A. S. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science.* 15:105 – 120.

Shewry, P. R. and Mifflin, B. J. 1985. Seed storage proteins of economically important cereals. In: *Advances in Cereal Science and Technology*. Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN. 7:1-83

Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J. Kreiss, M. and Mifflin, B. J. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *J. Cereal Sci.* 4:97-106.

Shewry, P. R., Halford, N. G., and Tatham, A. S. 1989. The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: Genetics and molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular Biology & Cell Biology*. B.J. Millin, ed. Oxford University Press: Oxford. 6:163-219.

Shewry, P. R. and Tatham, A. S. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: Structure and evolution. *Biochem. J.* 267:1-12.

Shewry, P. R., and Tatham, A. S. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.* 25:207-227.

Shewry, P. R., Halford, N. G., Faulks, A. J., Parmar, S., Mifflin, B. J., Dietler, M. D., Lew, E., and Kasarda, D. D. 1984. Purification and N-terminal amino acid sequence analysis of high molecular weight (HMW) gluten polypeptides of wheat. *Biochim. Biophys. Acta* 788:23-34.

Stryer Lubert. 1995. "Bioquímica" Cuarta Edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 44-50.

Shewry, P. R., Tatham, A. S., and Halford, N. G. 1999. The prolamins of the Triticeae. In: *Seed Proteins*, P. R. Shewry and R. Casey, eds. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands. 35-78.

Sutton, K. H. 1991. Qualitative and quantitative variation among HMW subunits of glutenin detected by RP-HPLC. *J. Cereal Sci.* 14:25-34.

StatSoft, Inc. 1995. STATISTICA for windows (Computer program manual). Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104-4442, (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, e-mail: info @ atassoft.com, Web: <http://www.statsoft.com>.

SAS Institute Inc. 1999. SAS/STAT version 6.08, software for windows. SAS Institute Inc. Cary, N. C., U.S.A. WEB. <http://www.Sas.com>.

Tao, H. P., and Kasarda, D. D. 1989. Two dimensional gel mapping and n-terminal sequencing of LMW-GS. *J. Exp. Botany* 40:1015-1020.

Tao, H. P., Adalsteins, A. E., Kasarda, D. D. 1992. Intermolecular disulfide bonds link specific high-molecular-weight glutenin subunits in wheat endosperm. *Biochim. Biophys. Acta* 1159:13-21.

Tatham, A. S., Shewry, P. R. and Belton, P. S. 1990. Structural studies of cereal prolamins, including wheat gluten. In: *Advances in Cereal Science and Technology*. Y. Pomeranz. Ed. AACC, St. Paul, MN. 10:1-78.

Torres, P. I., Vazquez-Moreno, L. 1988. Fractionation of gluten proteins by hydrophobic interaction chromatography with highly acetylated agarose. *Cereal Foods World*. 43:529.

Torres, P. I., Vazquez-Moreno, L., Ledesma-Osuna A.I., and Medina-Rodriguez. 2000. Contribution of hydrophobic soluble gluten proteins, fractionated by hydrophobic interaction chromatography in highly acetylated agarose, to dough rheological properties. *Cereal Chem.* 77:702 – 707.

Torres, P.I. and Vazquez-Moreno L. 2000. Surface Hydrophobicity and conformational polymorphism of glutenin subunits shown by HIC. AACC American Association of Cereal Chemists. Annual Meeting. Kansas City MO.

Tanford. C. 1961. Light scattering. In: Tanford, C.,ed. *Physical Chemical Properties of Macromolecules*. John Wiley and Sons. Inc. New York. Page 275.

Tracey, M. V. 1967. Gluten: new light on an old protein. *Cereal Science Today*. 12:193-197, 214.

Vazquez-Moreno L., Portath, J., Schluter, S. F., Marchalonis, J. J. 1992. Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*)

serum by gel-immobilized metal chromatography. *Comp Biochem. Physiol.* 103B (3):563-568.

Van Lonkhuijsen, H. J., Hamer, R. J. and Schereuder, C. 1992. Influence of specific gliadins on the breadmaking quality of wheat. *Cereal Chem.* 69:174 – 177.

Vailaya, A., Horváth, C., 1996. Enthalpy-entropy compensation in hydrophobic interaction chromatography. *J. Phys. Chem.* 100:24476-2455.

Veraverbeke, W. S. and Delcour, J. A. 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Food Science and Nutrition.* 42(3):179-208.

Weegels, P. L., Hamer, R. J. and Schofield, J. D. 1996. Critical review: functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science.* 23:1–18.

Wertz, D. H. Scheraga, H. A., 1978. Influence of water in protein structure. An analysis of the preferences of amino acid residues for the inside or outside and for specific conformations in a protein molecule. *Macromolecules* II:9-15.

Wilce, M. C. J., Aguilar, M. I., Hearn, M. T. W. 1991. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CVII. Analysis of group retention contributions for peptides separated with range of mobile and stationary phases by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.* 536:165-183.

Wilce, M. C. J., Aguilar, M. I., Hearn, M. T. W. 1995. Physicochemical basis of amino acid hydrophobicity scales: evaluation of four new scales of amino acid

hydrophobicity coefficients derived from RP-HPLC of peptides. *Ansl. Chem.* 67:1210-1219.

Wrigley, C.W. and Bietz, J.A. 1988. Proteins and aminoacids in: *Wheat: Chemistry and Technology*. Y. Pomeranz, ed. AACC, St. Paul, MN. 1:159.

Wrigley C. W. and Lookhart G. I. 1990. Wheat protein as a quality determinant. *International Wheat Quality Conference*. AACC American Association of Cereal Chemists. Manhattan, Kansas. 51-59.

Wrigley, C. W. 1996. Giant proteins with flour power. *Nature* 381:738-739.

Wrigley, C. W., Nutran, J. C. and Bushuk, W. 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In: *Advances in Cereal Science and Technology*, vol. 5. Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN. 211-259.

Wieser, H. , Selmeier, W. and Belitz H. D. 1994. Use of RP-HPLC for a better understanding of the structure and the functionality of wheat gluten proteins. In: *HPLC of cereal and legume proteins*. (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds.) American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, U.S.A. 235-272.

Werner, W. E., Adalsteins, A. E., Kasarda, D. D. 1992. Composition of High-molecular-weight glutenin subunit dimmers formed by partial reduction of residue glutenin. *Cereal Chem.* 69:535-541.

Wu, S. L., Karger, B. L., 1996. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. In: Karger, B. L., Hancock, W. S. (Eds.), *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules, Fundamentals*. *Methods Enzymology*. Academic Press Inc, London. 270:27-47

Zawistowska, U. Bebes, F., and Bushuk, W. 1985. Involvement of carbohydrates and lipids in aggregation of glutenin proteins. *Cereal Chem.* 62:340.

ANEXO A

Identificación de Subunidades de Glutenina de Masa Molecular Alta de las 25 Variedades de Trigo Panadero

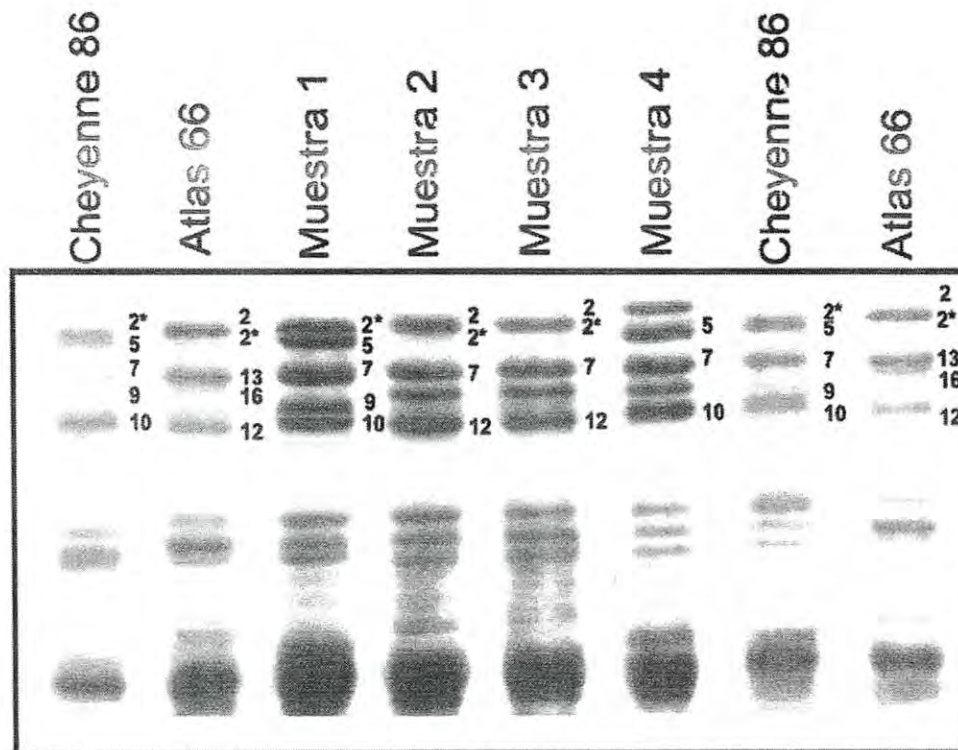


Figura A-1. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta, muestras 1, variedad Prowers (Colorado); muestra 2, línea experimental CO950043 (Colorado); muestra 3, línea experimental CO950379 (Colorado) y muestra 4, variedad Karl 92 (Kansas); y variedades de referencia: Cheyenne 86 (2, 5, 7, 9, 10), Atlas 66 (2, 2* 13, 16, 12). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

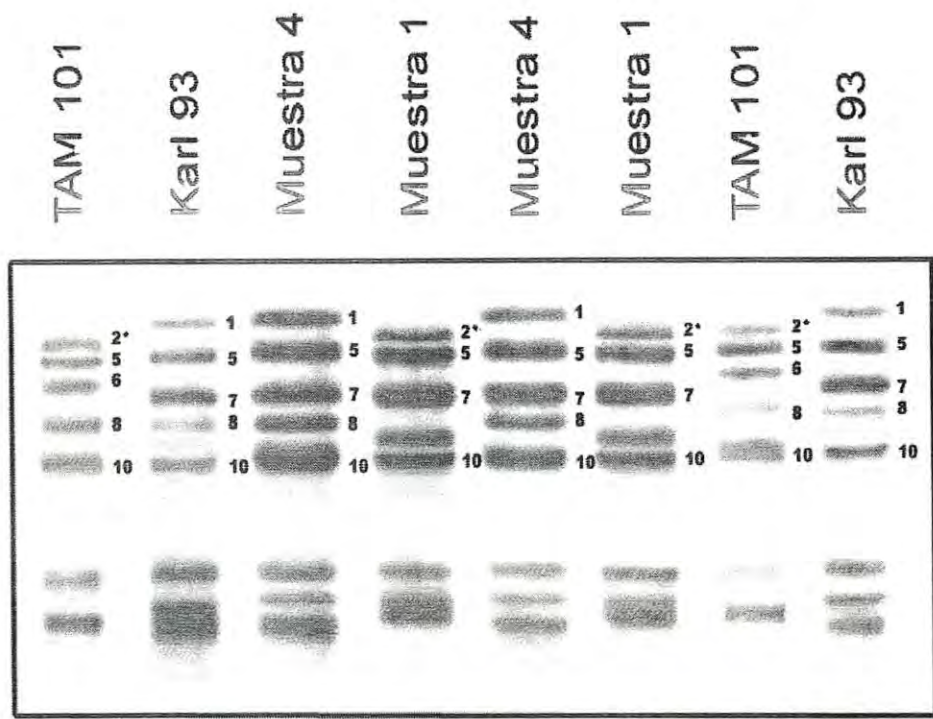


Figura A-2. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta de muestra 1, variedad Prowers (Colorado) y la muestra 4, variedad Karl 92 (Kansas). Variedades de referencia: TAM 101 (2*, 5, 6, 8, 10) y Karl 93 (1, 5, 7, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad. Este patrón electroforético se utilizó para comprobar la asignación de subunidades 1 y 8 de la muestra 4 y las subunidades asignadas a la muestra 1 en la figura 1.

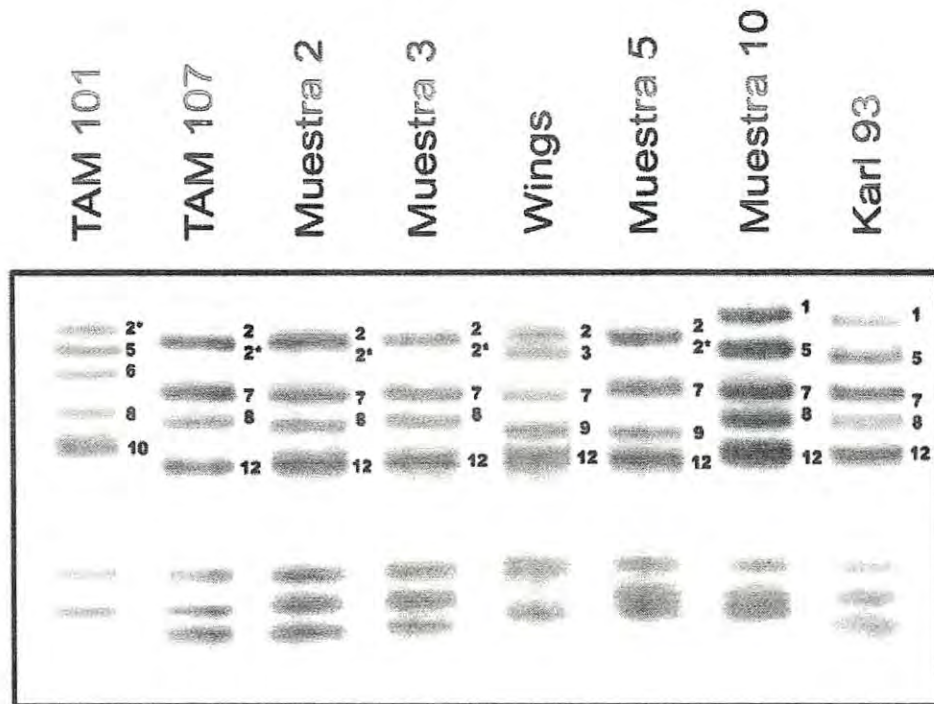


Figura A-3. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de las muestras 2, 3, 5, y 10, y variedades de referencia: TAM 101(2*, 5, 6, 8, 10); TAM 107 (2, 2*, 7 8, 12); Wings (2*, 3, 7, 9, 12) y Karl 93 (1, 5, 7, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad. El patrón electroforético de los estándares TAM 101 y TAM 107 se utilizó para asignar la subunidad 8 a las muestras 2 y 3.

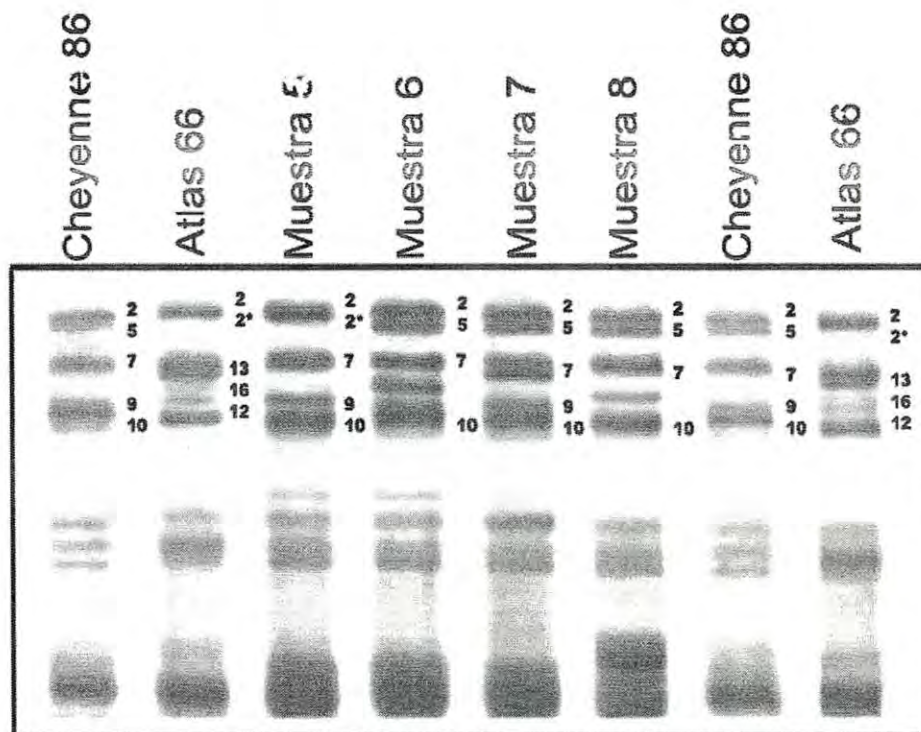


Figura A-4. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de subunidades de glutenina de masa molecular alta de la muestra 5, variedad Larned (Kansas), muestra 6, línea experimental KS95H1167-3 (Kansas); muestra 7, línea experimental KS95HW62-6 (Kansas); muestra 8, línea experimental KS96HW94 (Kansas) y variedades de referencia: Cheyenne 86 (2*, 5, 7, 9, 10), Atlas 66 (2, 2* 13, 16, 12). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

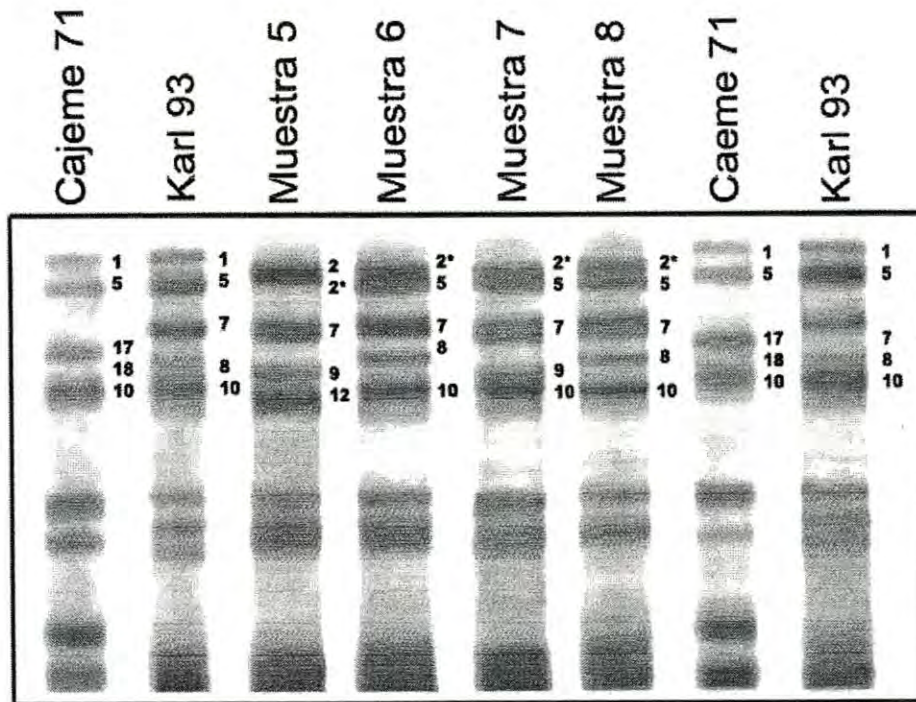


Figura A-5. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestras 5, variedad Larned (Kansas), muestra 6, línea experimental KS95H1167-3 (Kansas); muestra 7, línea experimental KS95HW62-6 (Kansas); muestra 8, línea experimental KS96HW94 (kansas) y variedades de referencia: Cajeme 71(1, 5, 17, 18, 10) y karl 93 (1, 5, 7, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

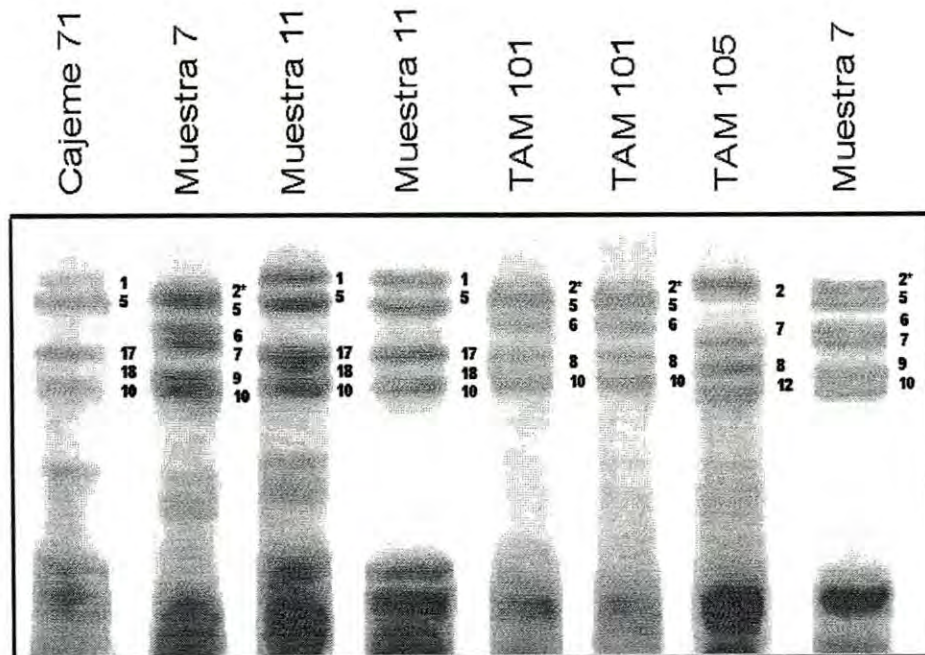


Figura A-6. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestra 7, línea experimental KS95HW62-6 (Kansas); Muestra 11, variedad Heyne (Kansas) y variedades de referencia: Cajeme 71(1, 5, 17, 18, 10); TAM 101 (2*, 5, 6, 8, 10) y TAM 105 (2, 7, 8, 12). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad. El estándar TAM 101 se utilizó para asignar la subunidad 6 a la muestra número 7 y para descartar que la asignación fuera 17+18 como en el caso de la muestra 11.

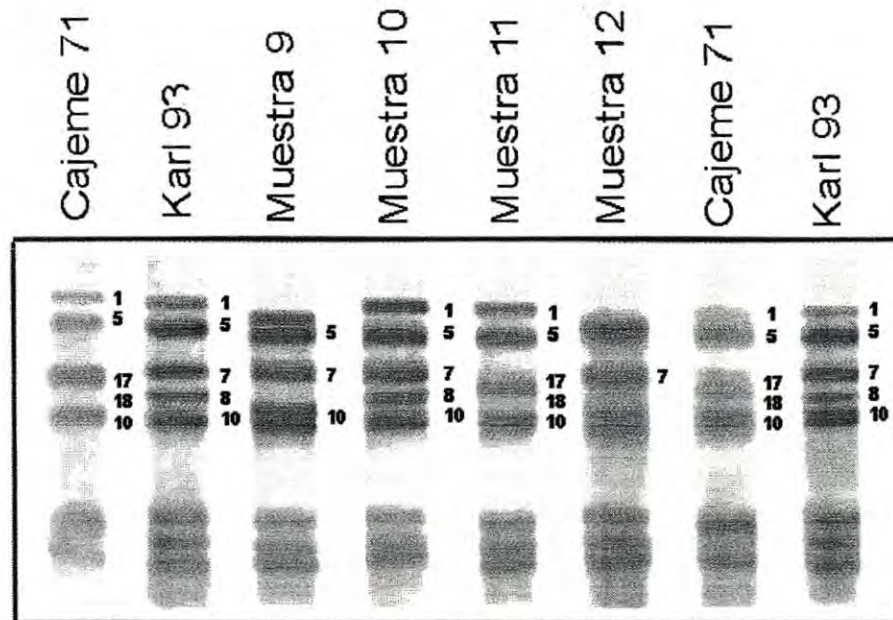


Figura A-7. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestra 9, línea experimental KS96HW115 (Kansas); muestra 10, variedad Betty (Kansas); muestra 11, variedad Heyne (Kansas) y muestra 12, variedad Scout 66 (Nebraska) y patrones de referencia: Cajeme 71(1, 5, 17,18, 10) y Karl 93 (1, 5, 7, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar así como el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

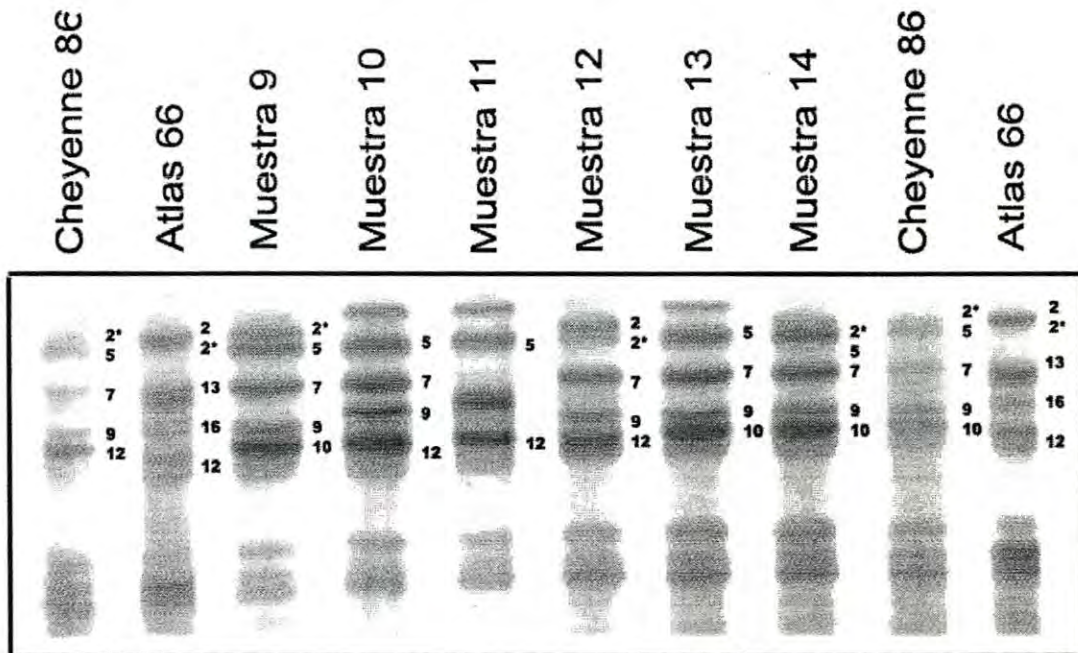


Figura A-8. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestra 9, línea experimental KS96HW115 (Kansas); muestra 10, variedad Betty (Kansas); muestra 11, variedad Heyne (Kansas) y muestra 12, variedad Scout 66 (Nebraska); muestra 13 y 14 y patrones de referencia: Cheyenne 86 (2*, 5, 7, 9, 10) y Atlas 66 (2, 2*, 13, 16, 12). Los nombres de las variedades estándar así como el número de muestra están indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

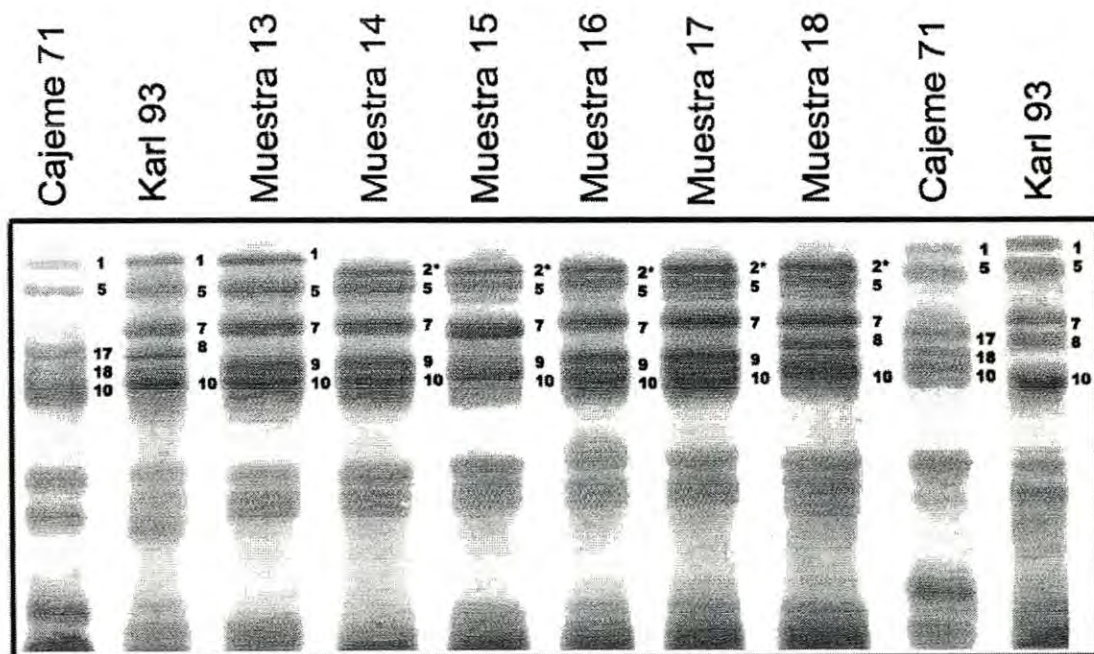


Figura A-9. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de las muestras 13, 14, 15, 16, 17 y 18 y variedades de referencia: Cajeme 71(1, 5, 17, 18, 10); Karl 93 (1, 5, 7, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

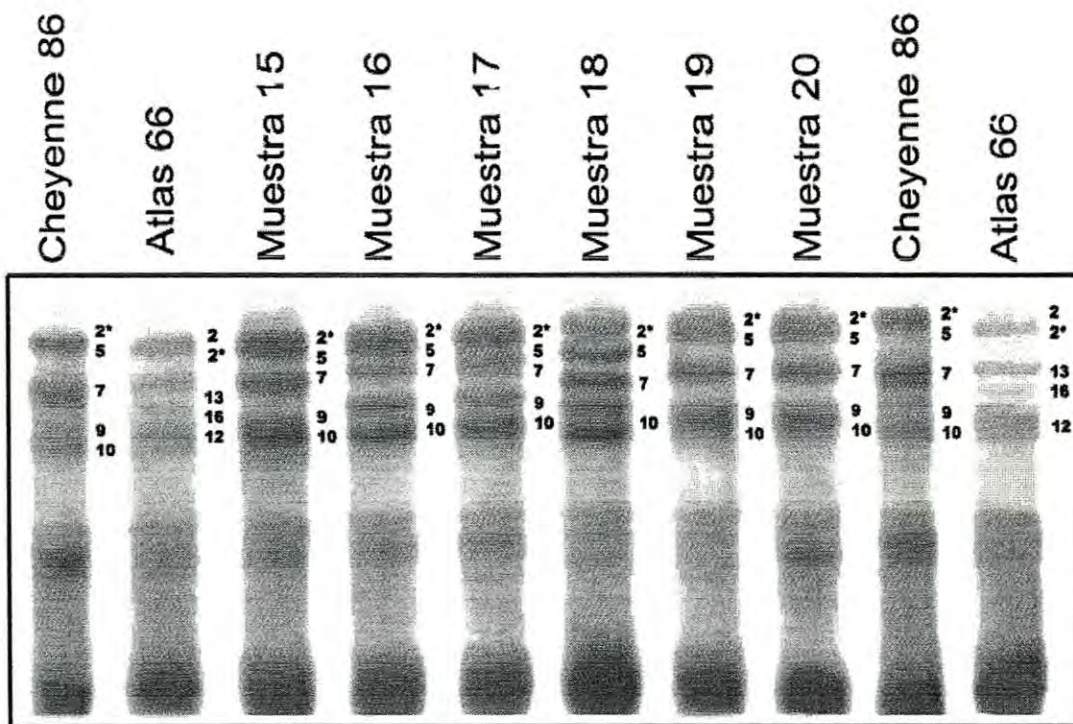


Figura A-10. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestra 15, línea experimental N94L205 (Nebraska); muestra 16, línea exp. NE94479 (Nebraska); muestra 17, línea exp. NE94482 (Nebraska); muestra 18, línea exp. N95L158; muestra 19, variedad Tandem (S. Dakota) y muestra 20 SD93267 (S. Dakota). Patrones de referencia: Cheyenne 86 (2*, 5, 7, 9, 10) y Atlas 66 (2, 2*, 13, 16, 12). Los nombres de las variedades estándar así como el número de muestra están indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

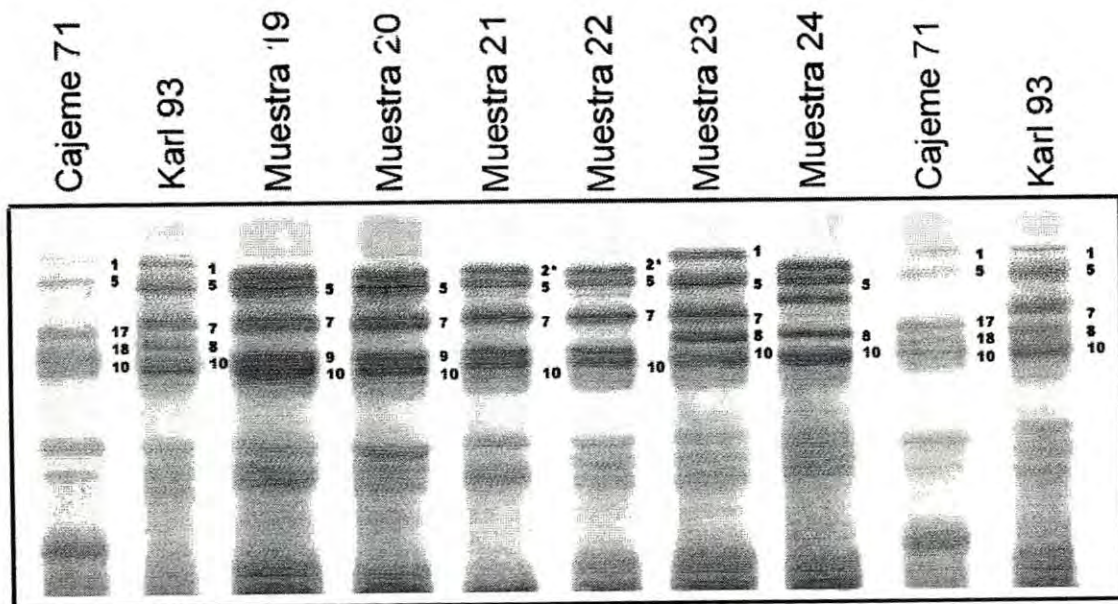


Figura A-11. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de las muestras 19 -24 y patrones de referencia: Cajeme 71(1, 5, 17, 18, 10), Karl 93 (1, 5, 7, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

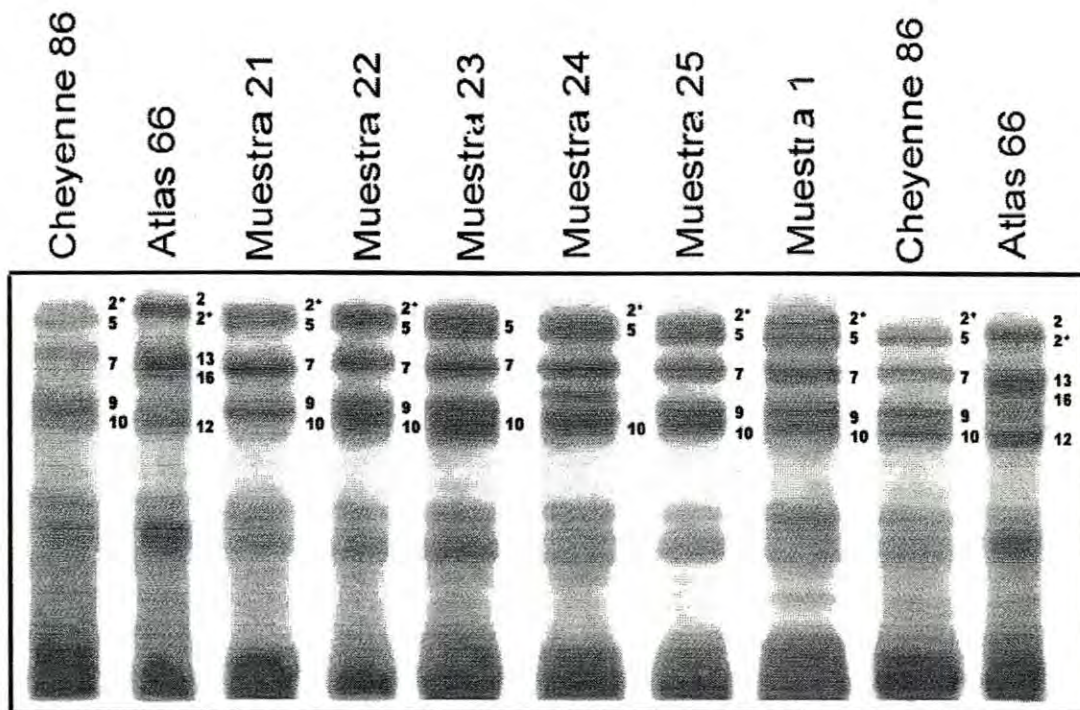


Figura A-12. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de muestra 21, línea experimental SD94149 (S. Dakota); muestra 22, línea exp. SD94241 (S. Dakota); muestra 23, Kart 92 (Oklahoma); muestra 24, línea exp. OK95571 (LA), (Oklahoma); muestra 25, línea experimental OK95571(ST), (Oklahoma) y muestra 1, variedad Prowers (Colorado). Patrones de referencia: Cheyenne 86 (2*, 5, 7, 9, 10) y Atlas 66 (2, 2*, 13, 16, 12). Los nombres de las variedades estándar así como el número de muestra están indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

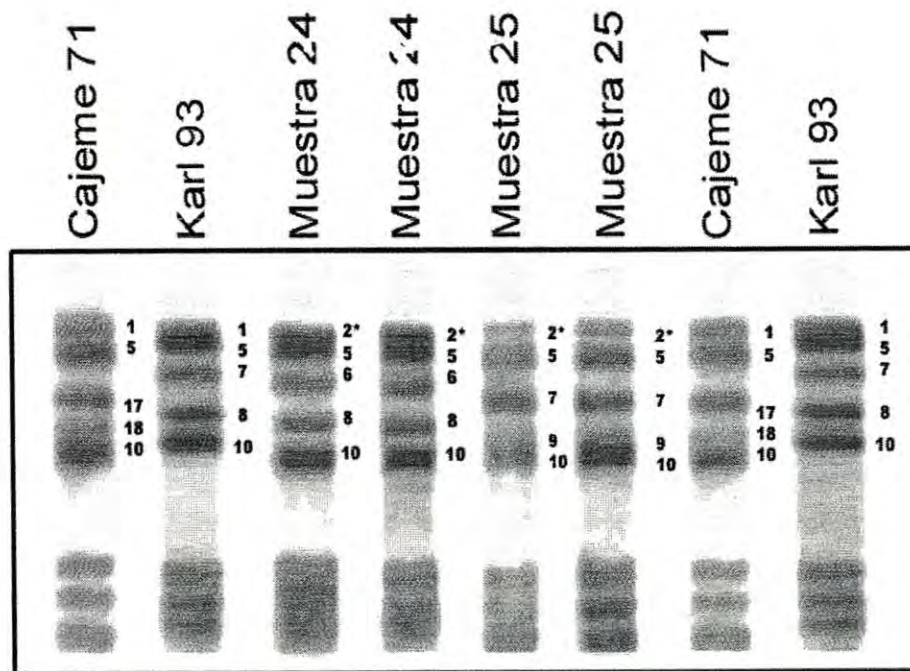


Figura A-13. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de las muestras 24 y 25 y patrones de referencia: Cajeme 71(1, 5, 17, 18, 10), Karl 93 (1, 5, 7, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar y el número de muestra se encuentran indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de glutenina de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.

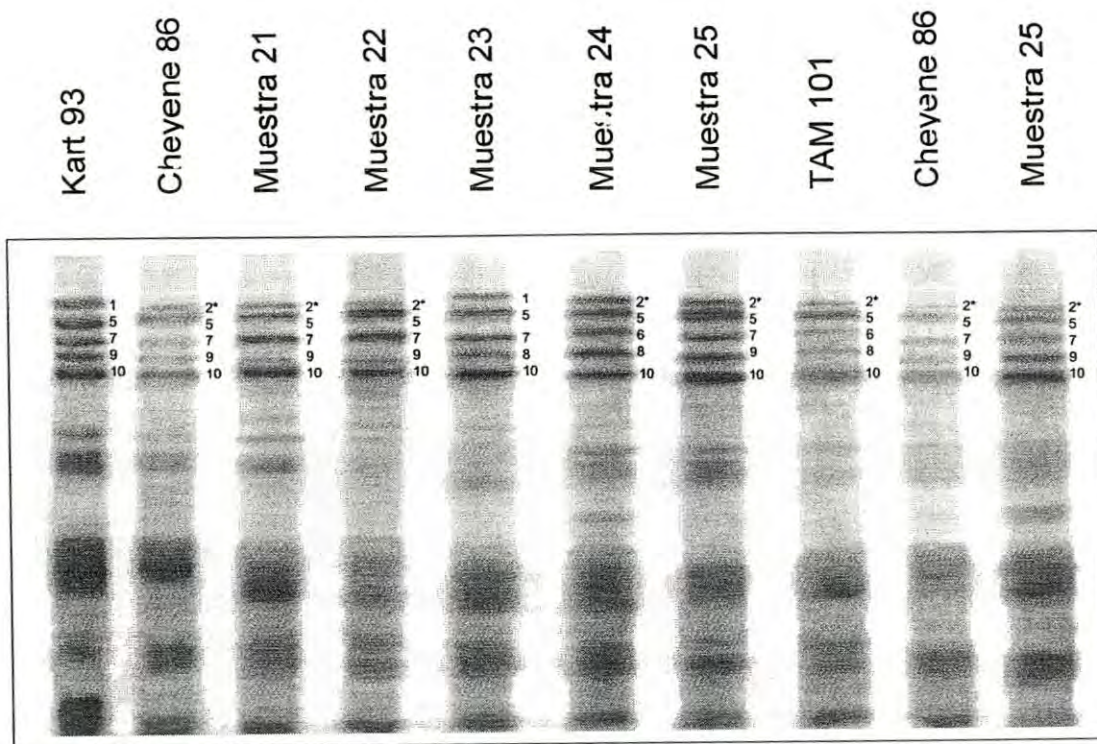


Figura A-14. Patrón electroforético (SDS-PAGE) de la muestra 21, línea experimental SD94149 (S. Dakota); muestra 22, línea exp. SD94241 (S. Dakota); muestra 23, Karl 92 (Oklahoma); muestra 24, línea exp. OK95571 (LA), (Oklahoma) y muestra 25, línea experimental OK95571 (ST), (Oklahoma). Patrones de referencia: Karl 93 (1, 5, 7, 8, 10); Cheyenne 86 (2*, 5, 7, 9, 10) y TAM 101 (2*, 5, 6, 8, 10). Los nombres de las variedades estándar así como el número de muestra están indicados en la parte superior de cada una de las variedades y las asignaciones para las subunidades de masa molecular alta (HMW-GS) en la parte lateral derecha de cada variedad.