



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Identificación de hordeínas para evaluar su potencial como marcadores moleculares en variedades mexicanas de cebada

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Marco André Navarrete Tabla



Ciudad de México

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Sobeida Sánchez Nieto
Vocal: Tzvetanka Dimitrova Dinkova
Secretario: Armando Conca Torres
1er. Suplente: Jorge Arturo Aburto Anell
2do. Suplente: Arturo Enríquez Peña

LUGARES DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 103, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular, Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SUPERVISOR TÉCNICO:

Biol. Jorge Herrera Díaz

SUSTENTANTE:

Marco André Navarrete Tabla



Contenido

1	Agradecimientos	6
2	Resumen.....	7
3	Introducción	8
3.1	Generalidades de la cebada	8
3.2	Importancia de la cebada en México y el mundo.....	10
3.3	La cebada mexicana.....	12
3.4	Producción de malta y cerveza	15
3.5	La composición del grano de cebada y su importancia para la elaboración de cerveza	20
3.6	Prolaminas de cebada: las Hordeínas.....	22
3.7	Presencia e importancia de las hordeínas en grano, malta y cerveza.....	27
3.8	Marcadores moleculares en alimentos y bebidas: nuevas herramientas para calidad, desarrollo y seguridad	30
4	Antecedentes	33
5	Hipótesis	37
6	Objetivos	37
6.1	Objetivo general	37
6.2	Objetivos particulares	37
7	Materiales y métodos.....	38
7.1	Material vegetal	38
7.2	Extracción de hordeínas	38
7.3	Preparación de las muestras para la electroforesis 2D	40
7.4	Electroforesis en gel 2D	42
7.5	Digestión de proteínas en gel para espectrometría de masas	44
7.6	Inmunodetección con un anticuerpo comercial	44
8	Resultados.....	47
8.1	Extracción y cuantificación de proteínas.....	47
8.2	Patrones electroforéticos 2D de hordeínas en diferentes variedades mexicanas de cebada.....	51

8.3	Identificación de hordeínas diferenciales entre variedades por espectrometría de masas	55
8.4	Inmunodetección de hordeínas diferenciales entre variedades	58
8.4.1	Patrones 1D de hordeínas identificadas con Ac anti-gliadina.....	58
8.4.2	Patrones 2D de hordeínas identificadas con Ac anti-gliadina.....	60
9	Discusión de resultados	63
9.1	Distribución de las hordeínas identificadas por EM en tres variedades contrastantes	63
9.2	Sobre los patrones encontrados con el Ac anti-gliadina.....	67
10	Conclusiones	71
11	Perspectivas	72
12	Anexos.....	74
12.1	Réplicas de las electroforesis en gel 2D	74
12.2	Densitometría de las inmuno-réplicas tipo Western de la separación electroforética en geles 1D.....	77
12.3	Secuencias de los péptidos identificados por espectrometría de masas ..	79
13	Referencias.....	85

1 Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del convenio de colaboración entre la Universidad Nacional Autónoma de México e Impulsora Agrícola S.A. de C.V. denominado “Análisis de marcadores bioquímicos en variedades contrastantes de cebada que impactan la productividad” con No. de registro 41611-1321-2-VI-15 (FQ 10-105).

Se agradece al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado PAIP 5000-9118 por el financiamiento complementario de este trabajo.

Asimismo se agradece al proyecto de infraestructura CONACYT 252001 por el financiamiento de los equipos de uso común en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.

Se agradece también la beca otorgada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN211215 durante la realización de esta tesis.

Finalmente extendiendo un agradecimiento especial a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Q.F.B. Margarita Guzmán Villanueva por el apoyo en la identificación de proteínas por espectrometría de masas.

2 Resumen

En México la mayor parte de la producción de cebada se utiliza para malteo y elaboración de cerveza (Fernández-Vera, 2013). Las variedades mexicanas se cultivan en distintos ciclos de cultivo-cosecha: HV2005-04 y HV2008-11 corresponden a la Región del Altiplano y su ciclo es de primavera verano; HV2005-19, HV2007-23 y HV2007-18 corresponden a la región del Bajío y su ciclo es de otoño-invierno. Las proteínas del grano son determinantes para la calidad de la malta (Howard, 1996; Holopainen, 2012), y de ellas, alrededor del 50 % son proteínas de reserva ricas en prolina (prolaminas) llamadas hordeínas, clasificadas en cuatro familias (B, C, D, gamma) de acuerdo a su composición y movilidad electroforética (Qi, 2006).

Previamente en el grupo de trabajo se analizaron los patrones electroforéticos en una dimensión de hordeínas de semilla y malta secas de variedades mexicanas (Salgado-Albarrán, 2015), encontrando una acumulación y procesamiento diferencial entre variedades. Sin embargo era necesaria una mejor separación e identificación de las hordeínas para encontrar aquellas que fueran marcadores moleculares que pudieran distinguir variedades contrastantes de cebada, por lo que en este trabajo se propuso aplicar la separación electroforética 2D a las hordeínas extraídas de semillas de cebada mexicana junto con la identificación por espectrometría de masas (EM) y la inmunodetección con un anticuerpo comercial para encontrar diferencias en los patrones de acumulación de hordeínas de variedades contrastantes.

Se encontraron diferencias importantes en la acumulación de las hordeínas B y C en cuatro variedades mediante electroforesis 2D, lo que fue confirmado mediante la inmunodetección y por identificación por EM, la cual además permitió observar la asociación entre diferentes familias de hordeínas como un fenómeno que puede ser variedad-dependiente. Con estos resultados se propone a futuro estudiar la expresión de las hordeínas encontradas durante el desarrollo del grano y su modificación en el malteo para entender mejor la dinámica de cada familia en dicho proceso, tan crucial para la elaboración de cerveza.

3 Introducción

3.1 Generalidades de la cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es el cuarto cultivo de cereales en términos de producción, con un total mundial de 136 millones de toneladas en 2007, detrás del maíz, el trigo y el arroz (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2007). Taxonómicamente, pertenece a la tribu *Triticeae* dentro de la familia *Poaceae* (gramíneas). En la misma tribu están también el centeno y el trigo, mientras que el arroz y la avena se encuentran en la misma familia (Salgado-Albarrán, 2015).

El cultivo de cebada se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, ya que se da desde el norte de África y toda la zona del Mediterráneo hasta las proximidades del Círculo Polar Ártico. Se produce principalmente en condiciones climáticas y suelos desfavorables. Sus amplias adaptaciones a estas condiciones, la versatilidad de sus usos, principalmente como alimento, tanto para ganado como humano, y su superioridad como materia prima para las industrias maltera y cervecera, son las principales razones que permitieron la domesticación de este cultivo a través de la historia (Ferrán-Lamich, 1959; Taner-Akar, 2004). A este respecto, a la cebada se le considera un cultivo fundador por la evidencia arqueológica de su presencia en sitios pre-agriculturales al sureste de Asia en el periodo Neolítico (Zohary et al., 2012), siendo de los más antiguos de los que se tiene conocimiento. Dicha evidencia también sugiere que la domesticación de este cereal ocurrió en la parte sur del Creciente fértil, en la zona de Jordania e Israel, alrededor del 8,000 ANE (Badr, 2000). La domesticación de la cebada consistió en la selección de poblaciones silvestres de *Hordeum spontaneum* con el raquis resistente, lo cual evita la dispersión de las semillas al llegar a la madurez y facilita la recolección de las mismas (Molina-Cano, 1989).

En cuanto al aspecto botánico, la cebada es una planta herbácea (Figura 1A), monocotiledónea (de la semilla emerge una sola hoja primordial), anual (principalmente cultivada en primavera), hermafrodita de fecundación autógama, y diploide ($2n = 14$ cromosomas) (Molina-Cano, 1989).

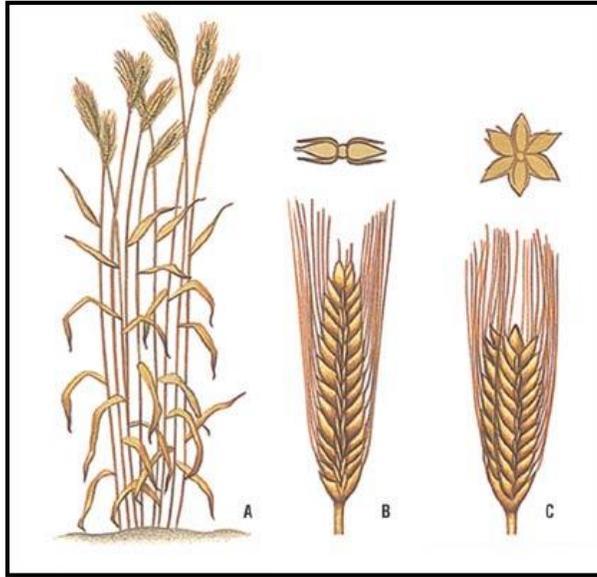


Figura 1. Esquema de la planta de cebada. A: Morfología general. B: espiga de dos carreras. C: espiga de seis carreras.

De acuerdo a la morfología de las espigas y el número de hileras o carreras que presenten, la cebada puede ser clasificada en dos tipos (Molina-Cano, 1989; Zohary et al., 2012):

- De dos carreras (Figura 1B): *H. vulgare* ssp. *distichum*, tradicionalmente llamada *Hordeum distichum* L. en la que sólo la espiguilla media de cada triada del raquis es fértil. Cada espiga por tanto contiene dos hileras de espiguillas capaces de producir granos, una en cada lado.
- De seis carreras (Figura 1C): *H. vulgare* ssp. *Vulgare*, tradicionalmente llamada *H. hexastichum* L. en la que las tres espiguillas de cada triada del raquis son hermafroditas y fértiles. Las espigas en estas variedades tienen, por tanto, seis hileras de espiguillas fértiles, tres en cada lado.

Es interesante notar que al parecer la aparición de la subespecie de cebada de seis carreras fue producto del proceso de domesticación (Zohary, 1969).

En Europa predomina el cultivo de la cebada de dos carreras, mientras que en Estados Unidos se cultivan ambas subespecies. Para la industria cervecera se utilizan ambos tipos (Galarza-Mercado, 2006).

3.2 Importancia de la cebada en México y el mundo

La cebada es un cereal de gran importancia a nivel mundial en términos de 160 millones de toneladas de producción y 70 millones de hectáreas de cultivo (registrados en 2004). El grano es utilizado principalmente como alimento para animales y como materia prima para producción tanto de malta como de alimentos de consumo humano, siendo el malteo el segundo uso más común (Taner-Akar, 2004).

Los principales países productores de cebada se muestran en la Tabla 1. En conjunto estos aportaron en promedio el 78.8 % de la producción mundial en el periodo entre 1995/96 y 2004/05 (Galarza-Mercado, 2006).

Tabla 1. Producción mundial de cebada, principales países.

País/región	Promedio 1995/96-2004/05 (miles de toneladas)	Porcentaje
Unión Europea	54,629	38.6
Rusia	16,040	11.3
Canadá	12,505	8.3
Ucrania	8,043	5.7
Estados Unidos	6,719	4.7
Turquía	7,130	5.0
Australia	6,620	4.7
China	3,323	2.3
Kazakstán	2,057	1.4
Irán	2,095	1.5
Marruecos	1,787	1.3
India	1,510	1.1
México	638	0.45
Subtotal	123,095	86.91
Resto del mundo	18,538	13.09
Total mundial	141,633	100

Modificado de Galarza Mercado, 2006.

Es evidente que en el ámbito mundial la participación de México como productor de cebada es escasa, con apenas un 0.45 % del promedio de la producción mundial entre 1995/96 y 2004/05. Sin embargo, México figura dentro de los principales países productores de cerveza en el mundo, siendo el quinto productor más grande en 2014 (Tabla 2) (Kirin, 2015), lo cual hace que su producción de cebada sea significativa para la economía nacional. Se estima que el 69 % de la producción total de cebada mexicana se destina a la industria maltera y cervecera, y el 31 % restante se destina a la alimentación de ganado, patrón inverso al observado a nivel mundial. En términos de la superficie sembrada, en México se siembran alrededor de 310,000 ha de cebada anualmente, de las cuales 230,000 son de cebada maltera (Fernández-Vera, 2013).

Tabla 2. Producción mundial de cerveza por país en 2014.

Lugar	País	Volumen de producción (kL)	Participación en el mercado mundial (%)
1	China	44,933,300	23.5
2	Estados Unidos	22,547,400	11.8
3	Brasil	14,147,000	7.4
4	Alemania	9,560,000	5.0
5	México	8,200,000	4.3
6	Rusia	7,636,100	4.0
7	Japón	5,468,600	2.9
8	Reino Unido	4,120,400	2.2
9	Polonia	3,987,000	2.1
10	Vietnam	3,890,000	2.0
	Resto del mundo	66,508,300	
	Total	190,998,100	

Modificado de Kirin Beer University, 2015.

3.3 La cebada mexicana

Las tres principales zonas productoras de cebada en México se encuentran en el centro del país y cada una tiene un régimen de cultivo-cosecha distinto (Figura 2) (Fernández-Vera, 2013):

- El Bajío: integrada por los estados de Guanajuato (principalmente), Querétaro, Jalisco y Michoacán. El riego de los cultivos se hace artificialmente en un ciclo de cultivo-cosecha de primavera-verano.
- El Altiplano: integrada por los estados de México, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla. En esta región el riego lo provee la lluvia estacional y el ciclo de cultivo-cosecha es de otoño-invierno.
- Región Centro-Norte: integrada por los estados de Zacatecas (principalmente), San Luis Potosí, Durango y Guanajuato. Al igual que la región del Altiplano, el riego lo provee la lluvia estacional y el ciclo es de otoño-invierno.

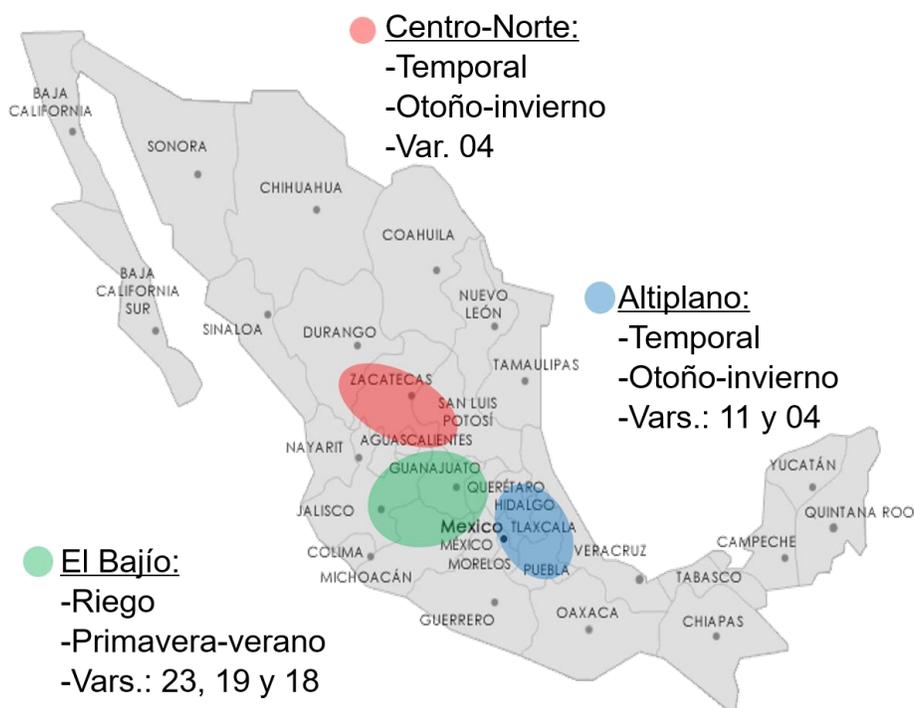


Figura 2. Regiones de producción de cebada en México. Se indican las variedades cultivadas en cada región.

Actualmente en estas regiones se encuentran distribuidas cinco variedades comerciales de cebada maltera (Figura 2), todas producidas por Impulsora Agrícola S.A. (IASA) en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), con el objetivo de mantener la mejora y el desarrollo continuo de nuevas variedades que se adapten a las condiciones del campo mexicano y a los requerimientos de la industria maltera y cervecera (Fernández-Vera, 2013). Las cinco son de seis carreras, pero cada una cuenta con diferentes características, enunciadas a continuación:

- **HV2005-04:** Fue liberada al mercado en 1991, entre sus características genéticas están la tolerancia a enfermedades como roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*), la mancha reticular (*Helminthosporium teres*) y a la escaldadura de la hoja (*Rynchosporium secalis*). Estas características permiten prescindir de las aplicaciones preventivas de fungicidas y, con ello, se permite un ahorro considerable en los costos de producción del cultivo, además de la consecuente reducción de contaminación del ambiente. Es la primera variedad de cebada desarrollada en México para condiciones de temporal con tolerancia a la roya lineal amarilla. También cuenta con un mayor potencial de rendimiento y calidad, de acuerdo con las demandas de la agroindustria (SAGARPA, 2014) y es la más utilizada para la elaboración de malta.
- **HV2005-19:** Fue liberada al mercado en 1989, tiene en su genealogía genes de enanismo de la variedad Dwarf Good de origen de la India. Es una variedad bien adaptada a las condiciones de clima y suelo del Bajío, donde es resistente al acame (es decir, tiene tallos fuertes) y al desgrane; es una variedad tolerante a la cenicilla (*Erysiphe graminis*) y a la roya de la hoja (*Puccinia hordei*); es la primera variedad mexicana con tolerancia a la roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*). Se recomienda para áreas de riego y regiones con condiciones semejantes al Bajío (Aguado-Santacruz, 2008).

- **HV2007-23:** Fue liberada al mercado en 2006, es tolerante a la roya lineal amarilla y a la cenicilla y es moderadamente tolerante a la roya de la hoja. Tiene un rendimiento potencial de grano 18 % superior al de la variedad 04. Fue desarrollada para cultivarse en condiciones de riego en el Bajío (Solano-Hernández y Zamora-Díaz, 2009).
- **HV2008-11:** Fue liberada en el año 2004, es una variedad desarrollada para condiciones de temporal. Presenta tolerancia a la roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*), a la roya de la hoja (*Puccinia hordei*), a la mancha reticular (*Helminthosporium teres*) y a la escaldadura de la hoja (*Rynchosporium secalis*). Posee alto rendimiento potencial con excelente calidad industrial (Zamora-Díaz et al., 2008; Fernández-Vera, 2013).
- **HV2007-18:** Fue liberada en el año 2006, tiene tolerancia a las principales enfermedades de la cebada maltera en condiciones de riego; así como, moderada tolerancia a la roya de la hoja (*Puccinia hordei*), alto potencial de rendimiento, calidad industrial y ciclo vegetativo más corto que la variedad HV2005-04, usada como testigo para su desarrollo (Zamora-Díaz et al., 2010).

De acuerdo con la Secretaría de Hacienda y Crédito Público (2015), en 2013 el 73 % de la producción de cebada provino de la región del Altiplano. En estas variedades, los criterios de calidad y selección de granos no son los suficientemente sensibles para distinguirlas, por lo que resulta importante la aplicación de nuevas técnicas que permitan identificar marcadores moleculares para diferenciarlas, establecer criterios de calidad y en última instancia para el desarrollo de nuevas variedades.

3.4 Producción de malta y cerveza

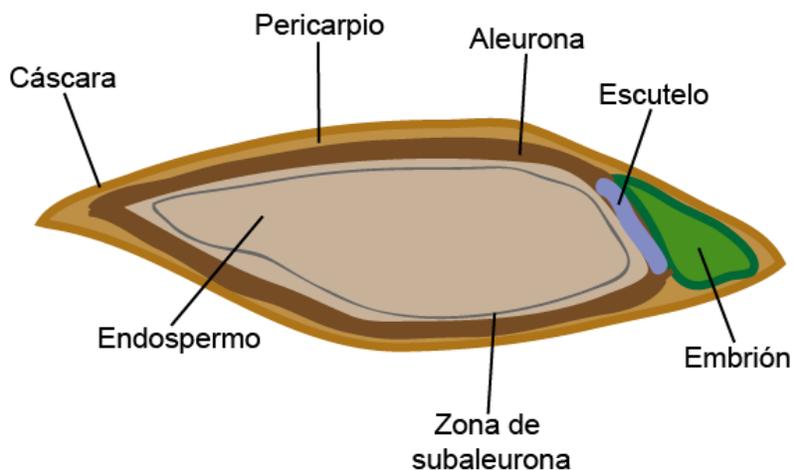


Figura 3. Esquema de la estructura de un grano de cebada.

Durante el proceso de malteo, el grano de cebada (Figura 3) sufre una germinación natural incompleta que involucra una serie de reacciones de hidrólisis enzimática en el endospermo. Este proceso se lleva a cabo en tres etapas principales (Gupta et al., 2010; Salgado-Albarrán, 2015; Hassan-Benasayag y Molina-Cano, 1989), previa selección y limpieza de los granos¹.

1. Remojo: los granos son sumergidos en una cantidad controlada de agua para llevar de un 12 a un 40% la humedad total, con el objetivo de iniciar la germinación. Sin embargo, debe encontrarse un equilibrio en las condiciones de esta parte del proceso, pues la temperatura del agua debe ser la adecuada para asegurar una buena solubilidad del oxígeno, evitar el desarrollo de microorganismos, y no retrasar la absorción de agua por el grano. El punto de equilibrio para estas condiciones está entre los 12 y 14°C, por un periodo de 36 a 48 horas.

2. Germinación: una vez que el grano ha absorbido la cantidad necesaria de agua, dispone de oxígeno y tiene una temperatura adecuada, el embrión entra en un

¹ En México, los parámetros físicos de calidad para la selección de la cebada maltera están establecidos en la NMX-FF-043-SCFI-2003.

estado de actividad (Tan-Wilson y Wilson, 2012) en el que se inician mecanismos de reparación de macromoléculas (ADN, membranas), se reactiva el ciclo celular, el embrión produce reguladores del crecimiento (e.g., giberelinas) y se inicia en la capa de aleurona la biosíntesis de enzimas hidrolíticas necesarias para la movilización de las macromoléculas de reserva del endospermo (Figura 3). A través del escutelo, el embrión absorbe los carbohidratos y compuestos nitrogenados, producto de la movilización de reservas y empieza a crecer. En un lapso de 2-3 días ocurre la protrusión de la radícula. En la germinación se deben controlar la humedad, el aire y la temperatura para mantener las condiciones constantes en toda la extensión del lote, pues se trata de un proceso exotérmico que puede llegar a causar daño a los granos. Además, la germinación se ve influenciada por el pH y las concentraciones de O₂ y CO₂ (Kleinwächter et al., 2012). Normalmente este proceso se detiene cuando la longitud de la radícula alcanza la misma distancia que la longitud del grano.

3. Horneado: para detener el proceso de germinación y asegurar la estabilidad de la malta, la humedad debe llevarse por debajo del 5 %, lo cual se logra con un aumento de la temperatura, usualmente mediante aire caliente. Dependiendo del tipo de malta que se desee (pálida o tostada), este paso puede llevarse hasta el tostado, con un aumento drástico de la temperatura promoviendo reacciones químicas entre los carbohidratos y las proteínas del grano, (reacciones de Maillard) que producen compuestos coloridos y aromáticos conocidos como melanoidinas. Se considera que las maltas pálidas tienen una alta cantidad de enzimas activas después del secado. En maltas oscuras la cantidad de enzimas que sobreviven es menor y en casos extremos, maltas especiales son tostadas y no contienen enzimas activas (Salgado-Albarrán, 2015).

Como resultado del malteo estándar, (sin tostado) se produce un aumento en la actividad enzimática, la cantidad de proteína soluble y en la degradación del almidón a azúcares sencillos, junto con el desarrollo de colores y sabores típicos (Hoseney, 1994). Al terminar, los granos de malta se someten a un proceso

mecánico de limpieza llamado cribado, para eliminar las radículas y las plúmulas que aparecen como producto de la germinación.

Es a continuación cuando se comienza con la elaboración propiamente dicha de la cerveza (Figura 4) (Hassan-Benasayag y Molina-Cano, 1989):

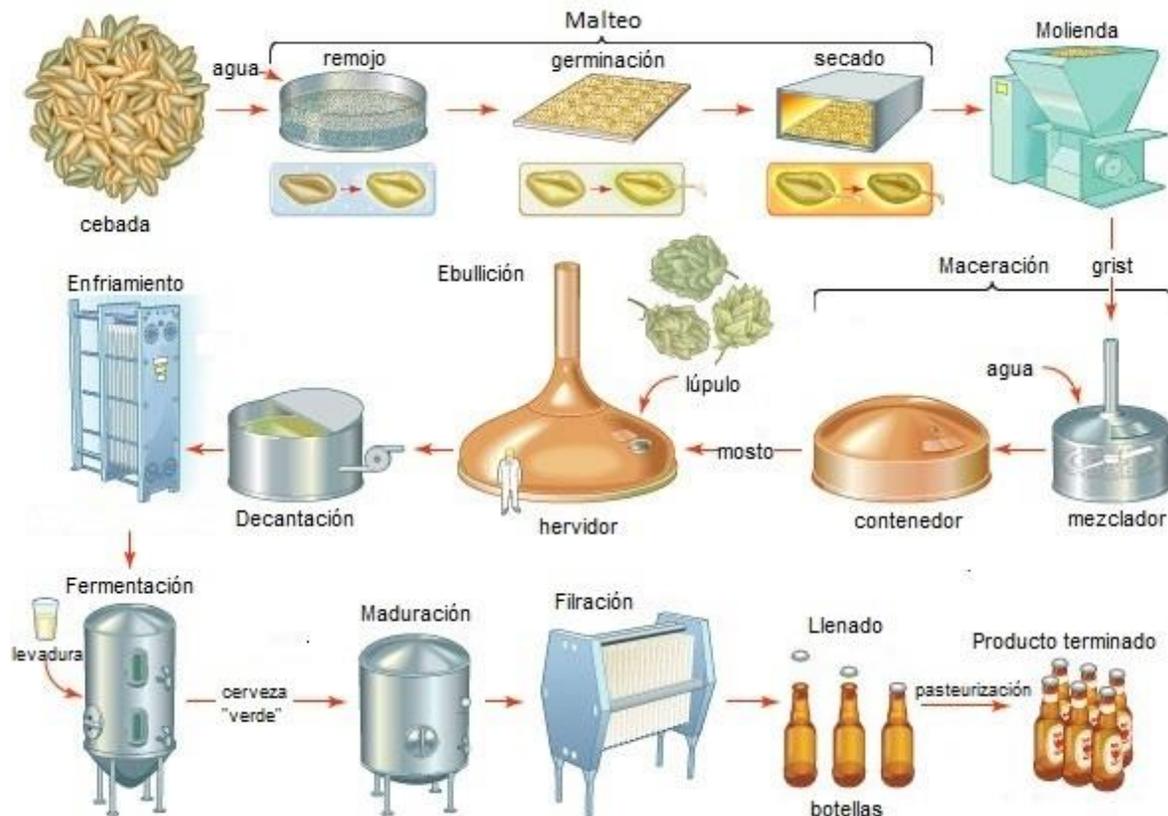


Figura 4. Esquema general de la producción de cerveza, que incluye la etapa de malteo descrita previamente. Tomado de Jelezova, 2015.

1. Molienda: Una vez que la malta ha sido preparada se somete a un proceso de molienda con el fin de reducir lo más posible el tamaño de partícula del endospermo pero manteniendo la integridad de la cáscara, que servirá más adelante como filtro.

2. Macerado y sacarificación: la malta molida se mezcla en un tonel con agua y, según la legislación y el estilo de cerveza a elaborar, con adjuntos² (fuentes de almidón o carbohidratos fermentables, e.g. granos de otros cereales). Esta mezcla se somete a temperaturas lo suficientemente altas para permitir la gelatinización del almidón y promover la acción de las enzimas hidrolíticas de la malta, con el objetivo de degradar las macromoléculas (almidón proteínas, β -glucanos, pentosanos), y obtener azúcares fermentables. Como resultado se obtiene una solución acuosa rica en carbohidratos sencillos llamada mosto dulce, mezclada con las cascarillas de los granos y de la malta molida. Estas cascarillas sirven como filtro durante la separación del mosto, que se pasa a una caldera especial para el siguiente paso.

3. Ebullición: como su nombre lo indica, en esta etapa se aumenta la temperatura del mosto dulce hasta llevarlo a ebullición y se procede a añadir el lúpulo: flores femeninas de la planta *Humus lupulus*, que contienen resinas amargas y aceites esenciales (α - y β -ácidos principalmente) que aromatizan y confieren a la cerveza su sabor característico. Este paso tiene además varios otros objetivos:

- Destruir cualquier microorganismo presente que pudiera desarrollarse por la alta disponibilidad de carbohidratos.
- Terminar con la actividad residual de amilasa.
- Precipitar proteínas que hayan formado complejos coloidales inestables con otras sustancias como los taninos provenientes de la cáscara de los granos.
- Eliminar el exceso de aceites esenciales y compuestos azufrados que pudieran alterar la calidad sensorial de la cerveza.
- Desarrollar el color al favorecer las reacciones de Maillard.
- Reducir del pH y eliminar los iones Ca^{2+} por precipitación como fosfatos.

4. Enfriamiento y aireamiento: como resultado de la etapa de ebullición se obtiene el mosto lupulado, que debe enfriarse antes de la fermentación. Esto se lleva a

² La proporción permitida de adjuntos está marcada en la mayoría de las legislaciones de los países productores de cerveza. En Alemania existe aún la práctica de la Ley de pureza 1516 que prohíbe completamente el uso de adjuntos.

cabo en placas intercambiadoras de calor para que la disminución de la temperatura sea lo más rápida posible y en condiciones de esterilidad que evitan el desarrollo de microorganismos. Una vez que el mosto lupulado se enfría, es filtrado para retirar la turbidez producida por la precipitación de las proteínas. La operación termina con la inyección de aire estéril a la salida del enfriador, con el objetivo de oxigenar el mosto, pues las condiciones de microaerofilia son necesarias para que las células de la levadura sintetizen componentes de membrana que les permitan desarrollarse en las condiciones de la fermentación y resistir la presencia del etanol.

5. Fermentación: En esta etapa el mosto lupulado se inocula con levaduras del género *Saccharomyces*, que llevarán a cabo la transformación de los carbohidratos del mosto en etanol y dióxido de carbono. Al mismo tiempo se producen otros compuestos como alcoholes superiores, ácidos orgánicos volátiles, aldehídos y ésteres que le dan a la cerveza su gusto particular. La inoculación del mosto se hace a unos 5°C, pero al iniciar la fermentación la temperatura aumenta por ser un proceso exotérmico. Dependiendo de la especie de levadura y el estilo de cerveza a elaborar, hay dos condiciones distintas:

- Estilo Lager: se utiliza *Saccharomyces pastorianus*, fermenta a una temperatura de 7-11°C
- Estilo Ale: se utiliza *Saccharomyces cerevisiae*, fermenta a temperaturas de 10-15°C.

Al terminar la fermentación, la cerveza se enfría hasta 0°C y se mantiene así por un periodo prolongado de tiempo, llamado maduración, que dependerá del estilo particular que se esté elaborando pero que tiene dos objetivos claros:

- Flocular y separar la levadura y todas aquellas partículas que puedan enturbiar la cerveza.
- Saturar la cerveza con dióxido de carbono, producto de la fermentación de los azúcares residuales que permanecen después de la fermentación principal.

Finalmente, para evitar que la cerveza se enturbie posteriormente, se le debe filtrar antes de envasarse.

6. Envasado y pasteurización: los últimos pasos antes de llegar al consumidor, deben evitar fundamentalmente la oxidación y las contaminaciones. La presencia de oxígeno en los envases causa la oxidación de los compuestos responsables del sabor amargo de la cerveza, distorsionando el sabor; además reacciona con los polifenoles, que al oxidarse se combinan con péptidos y proteínas, precipitándose y causando enturbiamiento. Las contaminaciones microbianas, además de enturbiar la cerveza, suelen alterar negativamente los sabores y olores, haciéndola no apta para consumo. Sin embargo, es de notar que a pesar de que ningún patógeno humano conocido es capaz de desarrollarse en la cerveza, es práctica común en su elaboración a gran escala pasteurizar el producto antes de hacerlo llegar al consumidor (Hill, 2009).

3.5 La composición del grano de cebada y su importancia para la elaboración de cerveza

El grano de cebada consiste aproximadamente (en peso seco) de 65-68 % de almidón, 10-17 % de proteína, 4-9 % de β -glucano, 2-3 % de lípidos y 1,5-2,5 % de minerales (Gupta et al., 2010). Sin embargo, durante el malteo la composición cambia por la actividad de las enzimas hidrolíticas producidas por acción del embrión. La composición inicial y los cambios que ocurren son determinantes para la calidad de la malta obtenida, y en última instancia, para la calidad de la cerveza y la eficiencia económica del proceso de elaboración (Gupta et al., 2010; Finnie y Svensson, 2009). Dado que las dos biomoléculas más abundantes son el almidón y las proteínas, a continuación se abundará un poco más en su importancia.

Almidón:

Durante el malteo se inicia la degradación del almidón en carbohidratos fermentables (glucosa, maltosa y maltotriosa principalmente) como resultado de la actividad de las enzimas α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa límite y α -glucosidasa

(Gupta et al., 2010). La degradación del almidón depende de factores como el tamaño de los gránulos y del grado de encapsulación en la matriz proteica. Sin embargo, la mayor parte de la modificación del almidón se da durante el macerado, pues la actividad de las amilasas depende en gran medida de la gelatinización del almidón (Hassan-Benasayag y Molina-Cano, 1989).

Proteínas:

Las proteínas de la cebada son esenciales para la malta y la cerveza, ya que hay una relación entre la calidad de ésta última con las variedades de granos utilizados y su composición proteica (Agrawal et al., 2013). Se sabe que un alto contenido de proteína disminuye la disponibilidad de los carbohidratos del grano, lo cual tiene un impacto negativo en la fermentación. El grado de degradación proteica también influye en la viabilidad de la levadura, pues los péptidos y aminoácidos producidos funcionan como fuente de nitrógeno para su desarrollo. En la cerveza las proteínas solubles son importantes para la formación y estabilidad de la espuma (Gupta et al., 2010; Evans y Bamforth, 2009).

Del contenido total de proteína del grano de cebada, 40-50% son proteínas de almacenamiento ricas en prolina (prolaminas) llamadas hordeínas, y el resto se distribuye entre albúminas, globulinas, inhibidores de amilasa, chaperonas, proteínas de unión a lípidos, enzimas y serpinas (Colgrave et al., 2013). Durante el malteo, las proteínas de la cebada son parcialmente degradadas por varias enzimas proteolíticas (metalo-, cisteín-, aspártico- y serín-proteasas; carboxi- y amino-peptidasas), produciendo aminoácidos y péptidos de menor tamaño. La mayoría de las proteínas encontradas en cerveza está en un rango de 10-40 kDa de peso molecular, y de ellas, las de mayor peso provienen de la cebada (Gupta et al., 2010).

El interés en las proteínas de cebada ha cobrado tanta importancia, que su identificación por técnicas como SDS-PAGE o HPLC se ha convertido en una prueba de rutina para la selección de granos en casas malteras y en programas de desarrollo y mejora genética de variedades (Gupta et al., 2010).

3.6 Prolaminas de cebada: las Hordeínas

Las hordeínas representan 40-50 % del total de proteína del grano de cebada, son altamente hidrofóbicas, solubles en soluciones acuosas de etanol e isopropanol, tienen un bajo contenido de aminoácidos esenciales (en particular lisina, treonina y triptofano), y altos niveles de prolina y glutamina (Rechinger et al., 1993; Schmidt et al., 2015). Se sabe que son altamente tolerantes a mutaciones, son seleccionadas neutralmente, muestran alta variabilidad intergenotípica y se han utilizado como marcadores genéticos para estudios evolutivos y de identificación de variedades (Bleidere y Grunte, 2009). Estructuralmente comparten dos características con las prolaminas de otros cereales: la presencia de distintos dominios estructurales y de pequeñas secuencias de aminoácidos en bloques repetidos (Shewry y Halford, 2002).

La familia de las Hordeínas está organizada en 4 sub-familias clasificadas de acuerdo a su movilidad electroforética y su composición de aminoácidos (Figura 5); todas están codificadas en familias multigénicas (loci) localizadas en el cromosoma 5 (1H) de la cebada (Qi et al., 2006).

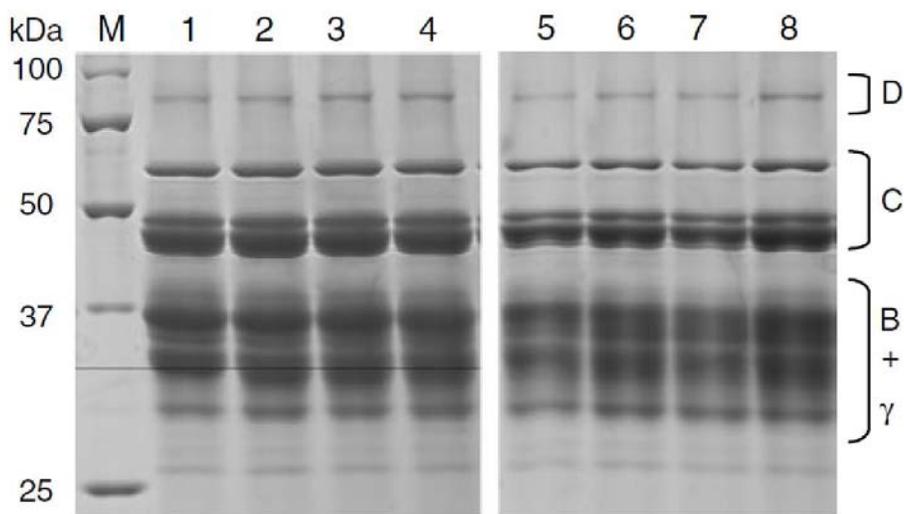


Figura 5. Patrones electroforéticos de las distintas clases de hordeínas. Tomado de Holopainen et al. (2012).

Hordeínas B:

Son las más abundantes (70-80 % del total de las hordeínas), por su composición se clasifican como prolaminas ricas en azufre y tienen un tamaño molecular de 35-45 kDa. Están codificadas principalmente en el locus *Hor2*, (localizado en el brazo corto del cromosoma 5), dividido en dos sub-loci bien identificados; y en menor medida en el locus *Hor4*. Se cree que se componen de al menos diez proteínas diferentes que pueden agregarse vía puentes disulfuro, divididas en dos clases: B1 y B3 (Anderson, 2013; Qi et al., 2006; Rechinger, et al., 1993; Colgrave et al., 2012; Shewry et al., 1988).

La estructura primaria general de las hordeínas B (Figura 6) consiste en un péptido señal (SIG), seguido de una región variable formada por pequeños motivos repetidos que contiene el primer residuo de cisteína (Dominio II), un dominio no repetitivo que contiene cinco residuos de cisteína (Dominio III), una región rica en residuos de glutamina con otro residuo de cisteína (Dominio IV), y un extremo C-terminal de secuencia conservada con el último residuo de cisteína (Dominio V) (Han et al., 2008). Las secuencias repetitivas en el Dominio II son variaciones del heptapéptido PQQPFPQ (Shewry et al., 1995) y de acuerdo con la literatura, el alto grado de conservación entre las hordeínas B1 y B3 sugiere que este dominio evolucionó principalmente por eventos de delección o duplicación (Anderson, 2013). En cuanto a los dominios III, IV y V, se ha encontrado que están relacionados entre sí, lo que indica la posibilidad de que se hayan originado por la triplicación de un dominio corto ancestral (Shewry et al., 1995).

Hordeína B

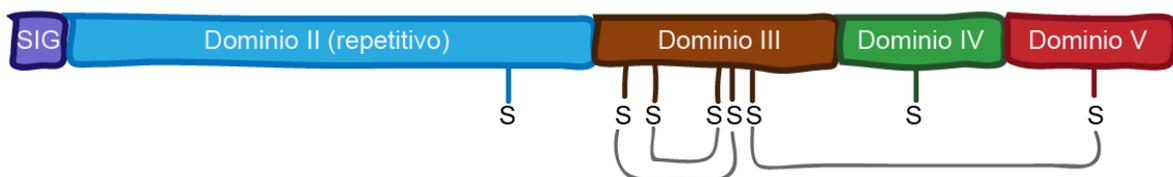


Figura 6. Estructura general de las Hordeínas B. Se muestran las posiciones de los residuos de cisteína junto con los puentes disulfuro predichos (modificado de Anderson, 2013).

Hordeínas C:

Están clasificadas como prolaminas pobres en azufre por la ausencia de residuos de cisteína en sus estructuras primarias, mientras que son ricas en glutamina, prolina y fenilalanina. Su peso molecular está entre 45-75 kDa (Colgrave et al., 2012) y están codificadas en el locus *Hor1*, localizado en el brazo corto del cromosoma 5 (Yin et al., 2003). Representan el 10-12 % del total de hordeínas y tienen una estructura primaria que consiste principalmente en variaciones de péptidos repetidos con la secuencia consenso PFPQ₁₋₂(PQQ)₁₋₂ (Figura 7) (Jin et al., 2011; Tatham y Shewry, 2012).

Hordeína C

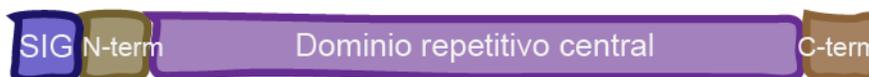


Figura 7. Estructura esquemática de las Hordeínas C.

Se piensa que las hordeínas C están relacionadas evolutivamente con las hordeínas B, pues las secuencias repetitivas de ambas están basadas en motivos similares ricos en prolina y glutamina. Incluso existe la hipótesis de que el grupo de las prolaminas pobres en azufre evolucionó de las prolaminas ricas en azufre por amplificaciones de las secuencias repetidas y deleciones de la mayoría de los dominios no repetitivos que contienen cisteínas (Shewry et al., 1995).

Actualmente sólo hay tres secuencias disponibles de hordeínas C: una de ellas contiene un codón de paro dentro del marco de lectura y las otras dos son secuencias codificantes completas. Sin embargo hay cierta incongruencia entre los tamaños moleculares calculados para las secuencias anotadas (28.3-38.4 kDa) y los reportados por espectrometría de masas (57.6 kDa), lo que indica que la mayoría de las hordeínas C expresadas en semilla probablemente aún no han sido clonadas ni secuenciadas (Tatham y Shewry, 2012).

Hordeínas D:

Están clasificadas como prolaminas de alto peso molecular (≈ 100 kDa) y son de las menos abundantes respecto a las otras familias, pues representan 2-4 % del total de las hordeínas (Qi et al, 2006). Estas se encuentran codificadas en el locus *Hor3*, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (Yin et al., 2003; Pistón et al., 2007). Respecto a su estructura primaria, está compuesta por un péptido-señal y dominios cortos N- y C-terminales entre los que existe un dominio central repetitivo rico en residuos de glicina, glutamina y prolina. En los tres dominios se distribuyen diez residuos de cisteína altamente conservados (Figura 8) (Pistón et al., 2007).



Figura 8. Esquema de la estructura de las Hordeínas D. Modificado de Pistón et al., (2007).

A lo largo de su estructura primaria existen varios motivos de hexapéptidos con la secuencia consenso P(F/H)QGQQ. En los dominios N-terminal y central, estos hexapéptidos están alternados con secuencias repetidas de 11 residuos (consenso: GYYPSATSPQQ), y en el dominio C-terminal están alternados con un tetrapéptido particular (TTVS) (Pistón et al., 2007). El dominio N-terminal está relacionado con los dominios III y IV de las hordeínas B, mientras que la región C-terminal está relacionada con el dominio V, lo cual indica que las hordeínas D pudieron haber evolucionado del mismo ancestro que las hordeínas B (Shewry et al., 1995).

Hordeínas γ (gamma):

Son las menos abundantes, representando 1-2 % del total de hordeínas. Se clasifican como prolaminas ricas en azufre, con masas moleculares de 30-45 kDa y aunque tienen similitud con las hordeínas B en estos últimos dos aspectos, están codificadas en un locus diferente: *Hor5*, cercano a *Hor2* (Qi et al., 2006; Rechinger et al., 1993). Comparten características estructurales con el resto de las prolaminas ricas en azufre: dominios extensos repetitivos basados en motivos ricos en prolina y glutamina, y dominios no repetitivos ricos en cisteínas localizadas en posiciones conservadas (Figura 9) (Shewry y Halford, 2002); comparten homología cercana con la secalina- γ de centeno y la gliadina- γ de trigo, a partir de las cuales se predijo su existencia en cebada (Cameron-Mills y Brandt, 1988).

Hordeína γ (gamma):



Figura 9. Estructura esquemática de las hordeínas γ . Se muestran los puentes disulfuro identificados. Modificado de Shewry y Halford (2002).

Se conocen tres miembros de esta sub-familia: γ 1, γ 2 y γ 3 (41, 36 y 32 kDa respectivamente), con las primeras dos teniendo mayor homología entre ellas (secuencias N-terminales idénticas) que con la última. De manera similar, las hordeínas γ 1 y γ 2 son capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares mientras que γ 3 sólo forma puentes intramoleculares (Rechinger et al., 1993). La hordeína γ 3 es la única hordeína identificada con alguna modificación post-traducciona: una glicosilación en la cisteína 142 (Snégaroff et al., 2013).

3.7 Presencia e importancia de las hordeínas en grano, malta y cerveza

Las distintas clases de hordeínas están involucradas en varias etapas del desarrollo del grano, el proceso de malteo y la elaboración de cerveza. Se han hecho estudios sobre su biosíntesis, deposición, movilización y efectos en la calidad de la malta, de la cerveza y en la salud humana por el potencial que tienen como marcadores moleculares para la cebada.

El control de la expresión de las hordeínas se ejerce principalmente a nivel transcripcional y uno de los elementos principales de regulación es la caja de prolamina: una secuencia regulatoria de 30 pb localizada aproximadamente 300 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, dentro de la cual se encuentra el motivo N en el extremo 3'. Este motivo ejerce un efecto negativo en la expresión génica bajo condiciones de ausencia de nitrógeno, pero en condiciones adecuadas interactúa con otros elementos río arriba para promover la expresión de los genes de las hordeínas (Shewry y Halford, 2002).

Las hordeínas, como el resto de las prolaminas, son producidas por la vía secretoria y sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso (RER) con un péptido señal (Figuras 6, 7, 8 y 9) que es cortado mientras la proteína es transportada cotraduccionalmente hacia el lumen, donde adquieren su conformación adecuada y se forman los puentes disulfuro (Shewry et al., 1995; Shewry y Halford, 2002). La formación de los cuerpos proteicos donde se acumulan las hordeínas es menos clara, pero se han propuesto dos vías: una en la que se acumulan directamente en el lumen del RER, formando cuerpos proteicos discretos rodeados de una membrana originada del mismo RER, y la otra en la que pasan vía el aparato de Golgi a una población específica de vacuolas de reserva proteica, con evidencia de que ambas vías operan en trigo y cebada (Shewry y Halford, 2002).

La formación de los cuerpos proteicos es un ejemplo de acumulación diferencial de hordeínas, pues se ha encontrado que al dejar el RER, los polipéptidos se condensan en glóbulos pequeños que se van agregando poco a poco. En estos glóbulos las hordeínas B y C están localizadas exclusivamente en

la parte interna, mientras las hordeínas γ_1 y γ_2 se presentan en la capa externa (Figura 10). En el estudio de estos procesos de deposición se ha encontrado que la hordeína γ_3 tiene un papel esencial al mantener el transporte competente del resto de las hordeínas, pues su ausencia en líneas mutantes causa un arresto de los polipéptidos en el RER (Rechinger et al., 1993).

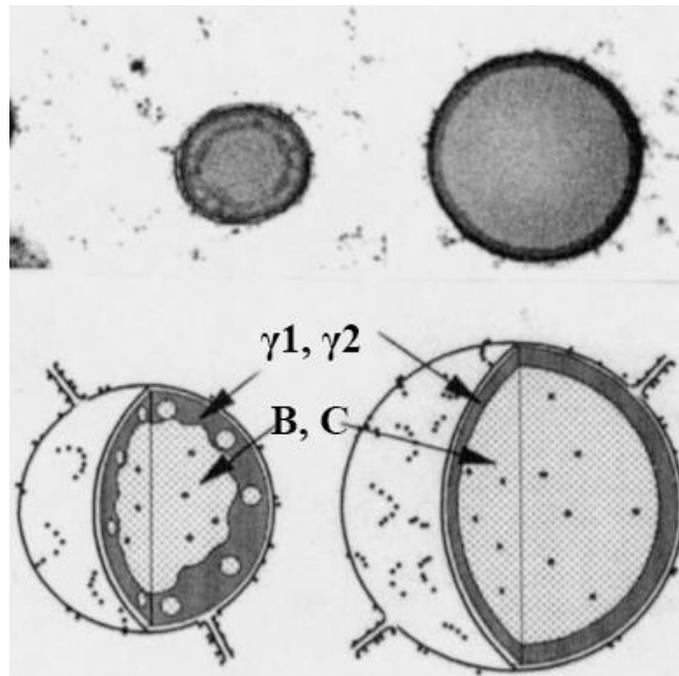


Figura 10. Estructura de los glóbulos proteicos donde se depositan las hordeínas. Modificado de Shewry y Halford (2002).

En cuanto a su distribución en el endospermo, se ha observado que las hordeínas γ , B y C predominan en la zona de sub-aleurona (Figura 3) tanto durante el desarrollo del grano como en la semilla madura, mientras que las hordeínas D se concentran más en las células centrales del endospermo (Holopainen et al., 2012; Shewry y Halford, 2002; Chandra et al., 1999).

Se ha sugerido que tanto las hordeínas B como los β -glucanos son importantes para la absorción de agua en el malteo (Bleidere y Grunte, 2009). Bajo condiciones de fotoperiodos prolongados durante el llenado de los granos, las hordeínas C tienden a acumularse en mayor medida en la parte interna del

endospermo, lo cual está relacionado con una absorción más rápida de agua durante el remojo, sugiriendo que en granos desarrollados en condiciones normales, éstas hordeínas forman una barrera física que retrasa la entrada de agua (Holopainen et al., 2012).

Ya que las hordeínas predominan en la matriz proteica que rodea los gránulos amiláceos dentro de las células del endospermo, su degradación durante el malteo es necesaria para permitir la hidrólisis enzimática del almidón, pues de lo contrario forman una barrera física que impide el paso a las amilasas. Además, las hordeínas no degradadas pueden formar complejos mediante puentes disulfuro durante el macerado que pueden causar problemas de filtración del mosto, resultando en niveles bajos de extractos de malta. Agregados de hordeínas B y D unidas por puentes disulfuro han sido encontrados en los precipitados de proteínas formados durante la ebullición en la elaboración de cerveza (Howard et al., 1996).

La búsqueda de hordeínas que promuevan la formación de espuma ha sido algo parecido al santo grial para los investigadores del área, ya que por su diversidad y sus interacciones con las proteasas, producen una amplia gama de especies potencialmente deseables para la estabilización de este carácter tan determinante (Evans y Bamforth, 2009). Estudios proteómicos sobre la cerveza han identificado proteínas de 23 y 17 kDa derivadas de hordeínas, que se cree promueven y estabilizan la formación de espuma (Iimure y Sato, 2013). De hecho la empresa cervecera Grupo Carlsberg (Dinamarca) ha patentado la manipulación del péptido de 17 kDa para mejorar la estabilidad de la espuma en su cerveza. Sin embargo, la evidencia sugiere que existen tanto hordeínas positivas como negativas para la espuma, por lo que se plantea aprovechar su heredabilidad para seleccionar variedades de cebada que contengan hordeínas favorables una vez que sean caracterizadas (Evans y Bamforth, 2009).

Diversos estudios proteómicos sobre cerveza han identificado a todas las familias de hordeínas en mosto y cerveza, pero no de manera íntegra, sino como polipéptidos derivados de bajo peso molecular, y los han asociado más con la

aparición de la turbidez, que con la estabilidad de la espuma (Iimure y Sato, 2013; Jin et al., 2011). La presencia de las distintas clases de hordeínas en la cerveza parece depender del tipo de cerveza y del proceso de elaboración (Colgrave et al., 2012), pero más importante aún, parece depender de la variedad de cebada utilizada para el proceso.

Además de los aspectos relevantes sobre la calidad de la cerveza, las hordeínas están asociadas con la enfermedad celiaca, un padecimiento autoinmune que produce inflamación gastrointestinal crónica en el individuo afectado como resultado de exposición al gluten (prolaminas) del trigo y sus análogos en centeno y cebada (Tanner et al., 2010; Colgrave et al., 2013). Algunas de las secuencias de polipéptidos en cerveza derivados de hordeínas se han asociado con este padecimiento, y estudios sobre la toxicidad de las diferentes familias han arrojado que las hordeínas D son inmunorreactivas a IgA de suero de pacientes celíacos (Iimure y Sato, 2013). Tanto las hordeínas D como las Hordeínas C causan una alta frecuencia de secreción de interferón- γ (una citosina pro-inflamatoria) en linfocitos T de sangre periférica del mismo tipo de pacientes (Tanner et al., 2010).

3.8 Marcadores moleculares en alimentos y bebidas: nuevas herramientas para calidad, desarrollo y seguridad

Un marcador molecular es una secuencia de ADN o una proteína que se puede relacionar con un carácter de interés, que pueda distinguir entre individuos o poblaciones y que no se vea afectado por las condiciones ambientales en las que se desarrolle. En el caso de los marcadores proteicos, se habla de enzimas o proteínas expresadas diferencialmente o como isoformas diferentes (Jelezova, 2014)

La disponibilidad actual de secuencias genómicas y nuevas tecnologías de alto desempeño y sensibilidad se ha traducido en la posibilidad de analizar alimentos y bebidas a niveles que antes no podían considerarse. En particular, las

tecnologías “ómicas”, con sus enfoques de alto rendimiento, están siendo aplicadas para desarrollar y encontrar marcadores moleculares en alimentos para resolver problemas de calidad, tecnología, autenticidad y seguridad (Agrawal et al., 2013).

Durante la última década, las técnicas de proteómica han sido aplicadas exitosamente al estudio del control de calidad y la seguridad en procesos de producción de alimentos como carne, vino, cerveza y leche, en paralelo con los enfoques de genómica y transcriptómica, buscando determinar los loci asociados a características específicas (Agrawal et al., 2013). Como se ha mencionado, en el caso de la cerveza, la calidad (tanto del producto como del proceso) está fuertemente asociada a la variedad del grano de cebada, su composición proteica y el nivel de modificación que sufre durante el malteo. Así, el proteoma de la cebada ha sido útil para la detección y potencial manipulación de las proteínas de la cerveza relacionadas a la calidad (Agrawal et al., 2013).

La proteómica es generalmente definida como el estudio a gran escala de proteínas por espectrometría de masas, adaptado para la caracterización y/o la cuantificación de las mismas (Colgrave et al., 2013). Existen dos tendencias generales dentro de esta disciplina: dependientes e independientes de geles de electroforesis. La proteómica dependiente de gel fue la primera serie de metodologías a partir de las cuales pudieron separarse, cuantificarse y compararse muestras complejas de proteínas (Rabilloud, 2014).

Las técnicas dependientes de gel involucran el uso de electroforesis de dos dimensiones (2D) para separar las proteínas: la primera dimensión consiste en el isoelectroenfoco, una técnica que aprovecha la propiedad de las proteínas de poseer carga cuando se encuentran en medios con pH distinto a su punto isoeléctrico (pI), característico de cada proteína. Cuando se aplica un potencial eléctrico a un gel con un gradiente inmovilizado de pH (IPG, por sus siglas en inglés) las proteínas migran al valor correspondiente a su pI y al alcanzarlo dejan de moverse. La segunda dimensión involucra la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), usualmente en presencia

de un agente reductor, para realizar una separación por masa molecular impulsada por un campo eléctrico en un sistema discontinuo. El producto final es un mapa bidimensional de manchas de proteínas, cada una resuelta en una coordenada particular (pl x peso molecular) (Colgrave et al., 2013).

Las manchas en un gel pueden ser cortadas, las proteínas digeridas, extraídas y tratadas para un subsecuente análisis por espectrometría de masas, en el que una fuente de ionización rompe las muestras en una serie de iones que serán separados por uno o varios analizadores de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) hasta que finalmente llegan a un detector. Actualmente los espectrómetros de masas permiten determinar la masa de cada péptido producido y compararla con una lista teórica generada por digestiones *in silico* de una, varias o todas las proteínas en una base de datos particular, con el objetivo de encontrar aquellos que coincidan para identificar las proteínas presentes en la muestra original (Colgrave et al., 2013).

4 Antecedentes

Trabajos previos en el grupo de investigación arrojaron información que sugiere la necesidad de hacer un estudio más detallado de las hordeínas de la cebada mexicana para evaluar diferencias entre variedades.

La primera aproximación fue mediante la electroforesis 2D de proteína total extraída de muestras de malta de cuatro variedades mexicanas (Figura 11), donde se observó que las hordeínas parecen acumularse diferencialmente en tres manchas de las variedades analizadas.

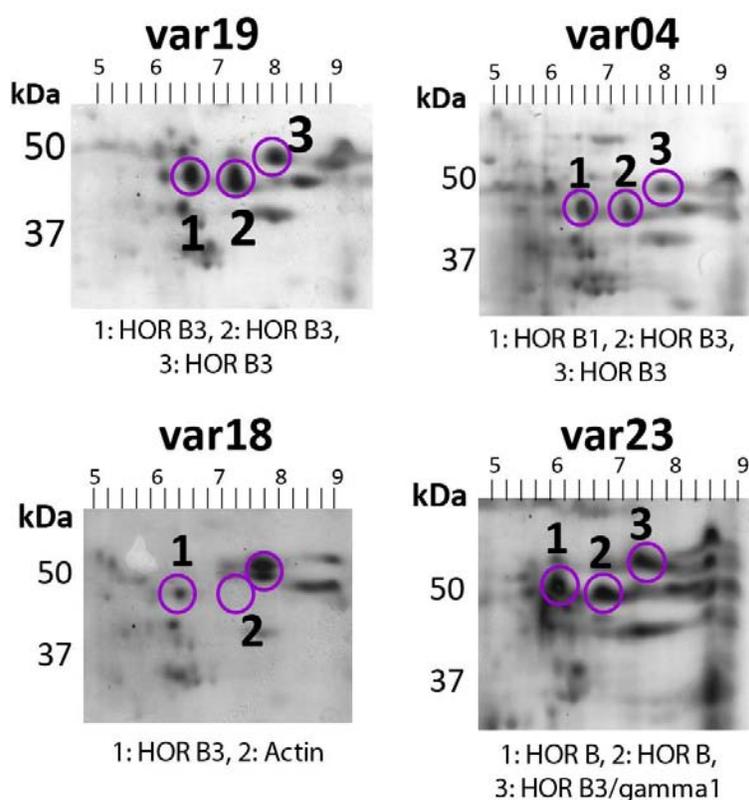


Figura 11. Electroforesis 2D de proteína total de maltas mexicanas. Se señalan las manchas donde se encontraron hordeínas. (Herrera-Díaz, no publicado 2013)

Sin embargo, el método de extracción utilizado en esta primera aproximación es un método general que puede no abarcar todas las poblaciones de hordeínas. Además, fue aplicado a muestras de malta seca, donde ya hubo una actividad proteolítica importante, tanto por el proceso de malteo como por el secado en horno, por lo que es de esperarse que se encuentren degradadas. Dado que su

procesamiento puede ser diferencial entre variedades, es necesario tener un punto de referencia para verificar con seguridad si existen diferencias en la expresión de hordeínas entre variedades.

Para esto, se hizo un segundo estudio en semilla y en malta seca (Salgado-Albarrán et al., 2015), donde se aplicó una técnica de extracción que enriquece las prolaminas, y se compararon los patrones de electroforesis en una dimensión de las cinco variedades de cebada a nivel de semilla seca (Figura 12), y de cuatro de ellas a nivel de malta seca junto con una variedad canadiense comercial (HV2008-08) (Figura 13). Algunas bandas fueron seleccionadas para digestión enzimática e identificación por espectrometría de masas (

Tabla 3).

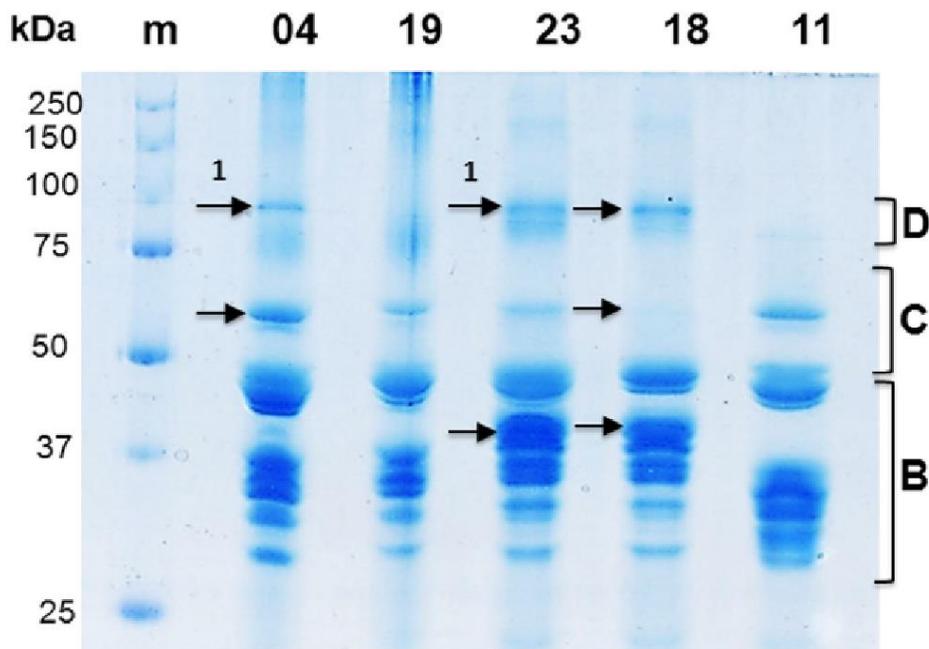


Figura 12. Patrones SDS-PAGE de hordeínas de semillas de variedades mexicanas. Las flechas indican las diferencias más notables y los números las bandas identificadas por espectrometría de masas (Salgado-Albarrán et al., 2015).

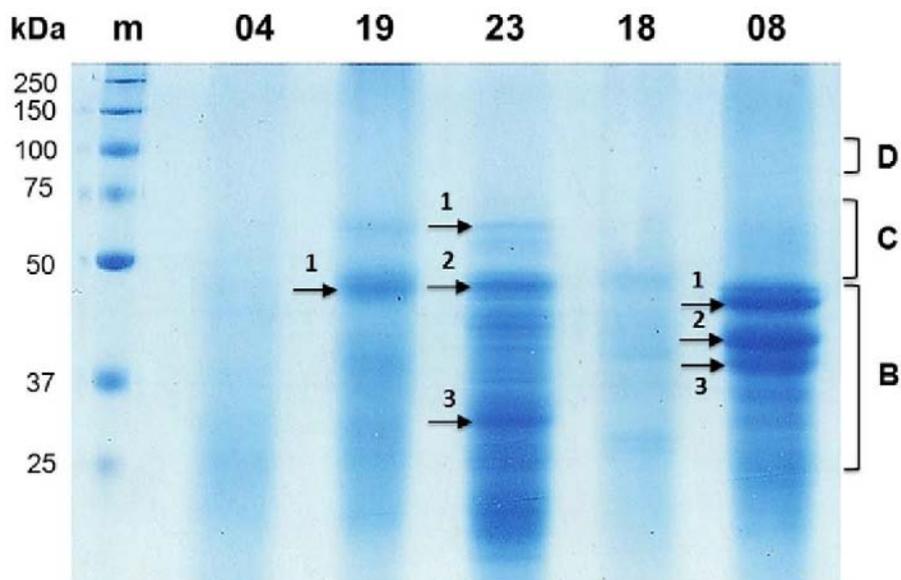


Figura 13. Patrones SDS-PAGE de hordeínas de malta de variedades mexicanas y una variedad canadiense (08), las flechas indican las diferencias más notables y los números las bandas identificadas por EM (Salgado-Albarrán et al., 2015).

Tabla 3. Hordeínas identificadas por espectrometría de masas. Modificado de Salgado-Albarrán et al., 2015.

Muestra		Digestión	Resultado
Semilla	04-1	Tripsyn-LysC	Hordeína γ 3
		Quimotripsina + Tripsina	Hordeína γ 1 Hordeína γ 3 Hordeína C
	23-1	Tripsyn-LysC	Hordeína B3 Hordeína γ 1
		Quimotripsina + Tripsina	Hordeína C
Malta	19-1	Tripsina	--
	23-1	Tripsina	Hordeína B3
		Tripsina	Hordeína B3
	23-2	Tripsyn-LysC	--
		Quimotripsina + Tripsina	--
	23-3	Tripsina	Hordeína γ 1
		Tripsina	Hordeína B3
	08-1	Tripsyn-LysC	--
		Quimotripsina + Tripsina	--
08-2	Tripsina	Hordeína B3 Hordeína γ 1	
08-3	Tripsina	Hordeína γ 1	

De este trabajo se concluyó que las variedades mexicanas de cebada maltera acumulan diferencialmente a las distintas familias de hordeínas en la semilla (Figura 12), y en el caso de los patrones en malta (Figura 13), se encontró que cada variedad presenta un procesamiento diferencial (Salgado-Albarrán et al., 2015).

Finalmente, con respecto a la identificación por espectrometría de masas (Tabla 3), el uso de varios protocolos de digestión enzimática permitió ampliar la identificación, pues las Hordeínas C pudieron ser detectadas solamente con una digestión secuencial de Quimotripsina y tripsina, ya que su alto contenido de fenilalanina aumenta la probabilidad de cortes efectivos por parte de la primera enzima.

Así, considerando lo encontrado en estos trabajos previos y la disponibilidad de las nuevas tecnologías en análisis de proteínas, es que se propuso aplicar la técnica de electroforesis en gel 2D acoplada a la espectrometría de masas para la identificación de hordeínas en muestras enriquecidas en estas, obtenidas de semillas de campo de variedades mexicanas de cebada maltera.

5 Hipótesis

Existen isoformas de los distintos tipos de hordeínas, acumuladas diferencialmente en la semilla seca de variedades de cebada maltera mexicana, que podrán ser evidenciadas mediante la separación electroforética de dos dimensiones e identificadas por espectrometría de masas y western blot.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Identificar a las hordeínas de variedades mexicanas de cebada maltera a partir de sus patrones de electroforesis de dos dimensiones.

6.2 Objetivos particulares

- a) Estandarizar un método de extracción-purificación de hordeínas para obtener muestras adecuadas para electroforesis de dos dimensiones.
- b) Obtener patrones reproducibles de hordeínas de variedades de cebada maltera mexicana en electroforesis bidimensional.
- c) Seleccionar manchas de los geles obtenidos para su identificación por espectrometría de masas.
- d) Comparar las proteínas identificadas por espectrometría de masas para encontrar aquellas que puedan distinguir variedades contrastantes.
- e) Probar la técnica de western-blot para identificar hordeínas, tanto en una como en dos dimensiones, utilizando un anticuerpo comercial anti-gliadina.

7 Materiales y métodos

7.1 Material vegetal

Semillas: se utilizaron semillas de las siguientes variedades de cebada maltera mexicana: HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23, HV2007-18, HV2008-11, cultivadas en campo y muestreadas de lotes cosechados en mayo de 2013.

Maltas: para la etapa de extracción y cuantificación de hordeínas también se utilizaron muestras de malta de las siguientes variedades: HV2005-19, HV2005-04, HV2007-23 y HV2007-18, que son mexicanas y HV2008-08, que es canadiense, de nombre comercial Metcalfle y de la subespecie de dos hileras.

Para mayor simplicidad, en el resto de este trabajo sólo se utilizarán los últimos dos dígitos del código de cada variedad para su identificación.

7.2 Extracción de hordeínas

Se acoplaron dos métodos independientes para asegurar su enriquecimiento y purificación en las muestras de proteína obtenidas. Dichos métodos se describen a continuación:

- I. Extracción inicial de hordeínas: método ajustado del protocolo disponible para extracción de zeínas (Larkins Lab, 2003).
 - 1) Las muestras se obtuvieron pesando aproximadamente 500 mg de semilla o malta en una balanza analítica.
 - 2) Cada muestra fue pre-triturada en un mortero y colocada en un tubo Falcon de 50 mL.
 - 3) A continuación se le añadió a cada una 16 mL de solución amortiguadora de extracción (12.5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 1 % m/v SDS y 2 % v/v β -mercaptoetanol, pH 10).
 - 4) Después se trituraron usando un homogenizador Ultra-Turrax® T18 basic, marca IKA® (14,000-30,000 rpm hasta homogeneizar lo más posible el endospermo).
 - 5) Las muestras ya trituradas fueron incubadas con agitación suave constante a temperatura ambiente toda la noche.

- 6) Al terminar la incubación las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm (Centrífuga Thermo Scientific® Sorvall ST 16R) durante 15 min a temperatura ambiente.
- 7) El sobrenadante de cada muestra fue recuperado en tubos Falcon de 50 mL nuevos y a cada uno se le añadió la cantidad necesaria de etanol anhidro para alcanzar una concentración final aproximada de 70 % v/v de etanol.
- 8) Las muestras fueron incubadas con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación fueron centrifugadas a 11,000 rpm (Centrífuga Thermo Scientific® Sorvall ST 16R) durante 15 min.
- 9) Posteriormente se recuperó el sobrenadante de cada muestra (fracción con hordeínas) en tubos Falcon de 50 mL nuevos.
- 10) A continuación las muestras fueron concentradas utilizando un rotaevaporador, manteniendo una rotación no mayor a 100 rpm, una temperatura del baño de 62-63°C y una presión no menor a 100 mbar, para llevarlas a un volumen de 3-5 mL y recuperarlas en tubos Falcon de 15 mL nuevos.
- 11) Finalmente, las alícuotas del paso anterior fueron congeladas a -70°C y llevadas a sequedad mediante liofilización utilizando un concentrador al vacío (SpeedVac).

II. Purificación con fenol y acetato de amonio en metanol: método ajustado del protocolo de extracción de proteínas totales de Agrawal y Thelen, (2009).

- 1) Cada botón obtenido del último paso de la sección anterior fue resuspendido en 8 mL de buffer de extracción de fenol: 4 mL de solución amortiguadora de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM EDTA, 0.9 M sacarosa, 0.4 % v/v β -mercaptoetanol) y 4 mL de fenol saturado en Tris-HCl, pH 8.8.
- 2) Una vez resuspendidos los botones de proteína, los tubos se dejaron en agitación suave por 15 min a temperatura ambiente.
- 3) Después cada muestra se centrifugó a 4,000 rpm (Centrífuga Thermo Scientific® Sorvall ST 16R) durante 30 min y la fase superior se recuperó en tubos Falcon de 50 mL nuevos.

- 4) A cada fase recuperada se añadieron 5 volúmenes de solución de acetato de amonio 100 mM en metanol frío, se mezcló bien con un vórtex y se dejaron incubando a -20°C toda la noche.
- 5) Al día siguiente los tubos se centrifugaron durante 1 h a 7,000 rpm (Centrífuga Thermo Scientific® Sorvall ST 16R) a 4°C para precipitar las proteínas.
- 6) Se lavaron los botones de precipitado dos veces con acetato de amonio 100 mM en metanol frío, y después dos veces con acetona 80 % v/v en agua fría.
- 7) Los botones se secaron por 15 min a temperatura ambiente bajo la campana de extracción para retirar el exceso de acetona.
- 8) A continuación, a cada botón se le añadieron 400 µL de solución de isoelectroenfoco (IEF, 8 M urea, 2 M tiourea, 4 % m/v CHAPS, 2 % v/v Triton X-100 y 50 mM DTT) y se dejó reposar por 15 min, para luego resuspenderlos por completo con micropipeta.
- 9) Luego se centrifugaron a 15,000 rpm (centrífuga Thermo Scientific® Sorvall Legend Micro 21H) a temperatura ambiente durante 15 min.
- 10) Finalmente el sobrenadante (cristalino) de cada muestra se transfirió cuidadosamente a sus alícuotas correspondientes (2 de 100 µL, 1 de 200 µL), que se almacenaron a -70°C hasta su uso posterior.

7.3 Preparación de las muestras para la electroforesis 2D

I. Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford:

- 1) Se preparó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en tubos de microfuga de 1.5 mL de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4. Construcción de la curva patrón de proteína por el método de Bradford.

Solución BSA 1µg/µL (µL)	Solución IEF (µL)	Reactivo de Bradford (µL)	Agua destilada (µL)	Réplicas
0	1	200	799	1
2	1	200	797	3
5	1	200	794	3
8	1	200	791	3
12	1	200	787	3
15	1	200	784	3

- 2) También se prepararon las muestras a cuantificar de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5. Cuantificación de muestras por el método de Bradford.

Muestra (μL)	Reactivo de Bradford (μL)	Agua destilada (μL)	Réplicas
1	200	799	3

- 3) Una vez listas las reacciones, se registró la absorbancia de cada una a 595 nm en un espectrofotómetro BioMate™ 3 (Thermo Scientific).
- 4) Después se calculó la absorbancia promedio de cada punto de la curva patrón para construir la gráfica 'Absorbancia promedio vs. μg de BSA' y obtener la pendiente y la ordenada al origen.
- 5) Con la pendiente y la ordenada al origen se calculó la cantidad de proteína en cada muestra (μg/μL) para finalmente obtener el promedio de las réplicas.
- II. Electroforesis de una dimensión (SDS-PAGE) para verificar integridad estructural de las hordeínas:
- 1) Se utilizó un sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRAD) con geles para SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida.
- 2) Luego de polimerizar los geles se montaron en los soportes correspondientes y se introdujeron en la cámara para luego llenarla con solución amortiguadora de corrida 1X (Tris 25 mM, glicina 1.44 % m/v, SDS 1 % m/v, pH 8.3, preparado a partir de un stock 10X), hasta el nivel adecuado.
- 3) En cada pozo se cargó una mezcla del volumen de muestra necesario para tener 20 μg de proteína y 10 μL de amortiguador de carga (Tris 240 mM, SDS 0.8 % m/v, glicerol 40 % v/v, azul de bromofenol 0.08 % m/v, β-mercaptoetanol 21 % v/v).
- 4) Se selló el sistema y se programó la separación a 100 V por 2 h 15 min.
- 5) Al terminar la corrida los geles se retiraron y fueron teñidos con Coomassie Coloidal G-250 en agitación suave hasta el día siguiente.

- 6) Al día siguiente los geles fueron sumergidos en solución para destinción (etanol 5 % v/v y ácido fosfórico 1 % v/v) con agitación suave hasta que las bandas se observaron bien definidas (aproximadamente 24 h).

7.4 Electroforesis en gel 2D

- I. Primera dimensión: isoelectroenfoco, método ajustado del protocolo propuesto por Agrawal y Thelen (2009)
 - 1) Se calculó el volumen de cada muestra necesario para cargar 500 µg de proteína y éste fue depositado en un tubo de microfuga de 1.5 mL.
 - 2) Cada volumen fue completado a 215 µL con solución IEF, se añadieron 3 µL de anfolinas (BioRAD™) y se mezclaron bien con micropipeta.
 - 3) A continuación se centrifugaron por 15 min a 15,000 rpm (Centrífuga Thermo Scientific® Sorvall Legend Micro 21H) a temperatura ambiente.
 - 4) El sobrenadante se retiró y distribuyó a lo largo del carril correspondiente en la bandeja de isoelectroenfoco.
 - 5) Se tomaron tiras de gel de poliacrilamida de 11 cm con un gradiente inmobilizado de pH (IPG) en un intervalo lineal de 3-10 (Immobiline Dry Strip, BioRAD™), se separaron de su protector y se colocaron boca abajo sobre cada muestra en la bandeja evitando la formación de burbujas y asegurando que queden en contacto con los electrodos localizados en los extremos de cada carril.
 - 6) Se colocó 1.5 mL de aceite mineral sobre cada tira para evitar deshidratación y encima se dejaron las barras de seguridad.
 - 7) La bandeja se colocó en la unidad de isoelectroenfoco Protean i12 IEF Cell (BioRAD™).
 - 8) Se programó una rehidratación activa (12 h, 20°C), seguida del protocolo de separación pre-cargado en el equipo correspondiente a la longitud y gradiente de pH de las tiras utilizadas: 5 pasos de focalización: 500 V por 30 min (rápida), 1000 V por 1 h (gradiente), 3000 V por 1 h (gradiente), 5000 V por 2 h (gradiente) y 8,000 V (rápida) por 3 h, hasta un voltaje acumulado de 30-35 kV h.

- 9) Al terminar el isoelectroenfoco las tiras IPG se removieron de la charola y se les retiró el exceso de aceite mineral.
- 10) Posteriormente a cada tira se le aplicaron dos lavados, cada uno con 1.5 mL de ditioneitol al 2% m/v en solución amortiguadora de equilibrio SDS (Tris 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 30 % v/v, SDS 4 % m/v) por 10 min para reducir los puentes disulfuro.
- 11) Finalmente, se les aplicó otro par de lavados, cada uno con 1.5 mL de solución de yodoacetamida al 2.5% m/v en amortiguador de equilibrio SDS a resguardo de la luz por 10 min para alquilar las cisteínas y evitar la regeneración de los puentes disulfuro.
- 12) Las tiras IPG con las muestras cargadas se mantuvieron en la última solución de los lavados hasta colocarlas en los geles polimerizados.

II. Segunda dimensión: SDS-PAGE:

- 1) Para la segunda dimensión se utilizó el sistema de electroforesis SE600 Vertical Unit (GE-Healthcare™), empleando geles de acrilamida SDS-PAGE al 12.5 % de 13 x 14 x 0.75 cm.
- 2) Las tiras IPG se colocan cada una sobre la superficie del gel concentrador, evitando que queden burbujas atrapadas entre la tira y la superficie del gel.
- 3) Para sellar los geles se añade una solución de agarosa 0.5 % m/v en amortiguador de corrida SDS-PAGE y con trazas de azul de bromofenol para poder ver el frente de corrida durante la separación electroforética.
- 4) La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 50 V por 25 h (o hasta que el frente de corrida alcanzara el borde de los geles) a temperatura ambiente en solución amortiguadora de corrida 1x recién preparado.
- 5) Al terminar la corrida de la segunda dimensión se desmontaron los sistemas y los geles se tiñeron en Coomassie coloidal con agitación suave hasta el día siguiente, para luego lavarlos con solución de destinción y adquirir las imágenes correspondientes.

7.5 Digestión de proteínas en gel para espectrometría de masas

El análisis visual de los geles hechos por triplicado para las variedades 23, 19 y 04 permitió seleccionar varias manchas diferenciales que fueron cortadas y tratadas para la identificación por espectrometría de masas con el protocolo estandarizado en el Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII), de la Facultad de Química (UNAM). Cada mancha fue sometida a dos protocolos de digestión enzimática, el primero siendo una digestión secuencial de quimotripsina y tripsina, y el segundo una digestión simple con tripsina solamente. El análisis de espectrometría de masas se realizó usando la plataforma SYNAPT-G2-Si nanoUPLC/MS^E de Waters Corporation©.

7.6 Inmunodetección con un anticuerpo comercial

I. Transferencia de proteínas a la membrana:

- 1) Previo a la transferencia de proteínas a las membranas se corrieron geles pequeños (5.7 x 8.5 cm) tanto de una como dos dimensiones bajo las siguientes condiciones:
 - i. Los geles de una dimensión se realizaron de manera similar a los utilizados para verificar la integridad de las proteínas extraídas (sección 7.3.II), con la diferencia de que en cada carril se cargó el volumen suficiente de muestra para tener 10 µg de proteína.
 - ii. Para los geles pequeños de dos dimensiones se siguió el mismo protocolo de la sección 7.4 con la diferencia de que el isoelectroenfoco se hizo en tiras IPG de 7 cm con el mismo gradiente de pH (3-10), colocando en cada una el volumen necesario de muestra para cargar 200 µg de proteína y llevando a un volumen final de 185 µL con solución IEF, añadiendo al final 3.7 µL de anfólinas (General Electric™). Los lavados para reducir y alquilar las proteínas en las tiras IPG se realizaron con 1 mL de solución amortiguadora de equilibrio SDS cada uno; la segunda dimensión se programó a 100 V por 2 h 15 min.

- 2) Se recortaron membranas de transferencia de PVDF (Immobilon Transfer membranes, Milipore™) en piezas de 5.7 x 8.5 cm, así como trozos de papel filtro de 7 x 9 cm.
- 3) Una vez separadas las proteínas en los geles y recortadas las membranas y los trozos de papel filtro, se activó la membrana sumergiéndola brevemente en metanol y se introdujo en solución amortiguadora de transferencia (100 mL de amortiguador de corrida SDS-PAGE 10X, 200 mL de metanol, y H₂O c.b.p. 1 L).
- 4) Para la transferencia se utilizó un sistema Mini Trans-Blot® Cell (Biorad®): al cassette de transferencia se introdujeron, en dirección de cátodo a ánodo, los siguientes elementos en el orden descrito:
 - i. Esponja
 - ii. Papel filtro
 - iii. Gel de electroforesis sin gel concentrador
 - iv. Membrana
 - v. 2 papeles filtro

Todo lo anterior se realizó en una bandeja grande y profunda con un poco de buffer de transferencia con el que se ayudó a eliminar las burbujas que pudieran quedar dentro del cassette.

- 5) El cassette, cerrado con cuidado, se introdujo dentro del soporte cuidando la orientación correcta de los electrodos.
- 6) El soporte a su vez se introdujo en la cámara de transferencia.
- 7) La cámara se llenó con solución amortiguadora para transferencia y se colocó el bloque de refrigerante dentro de su espacio correspondiente.
- 8) La cámara fue cerrada y colocada en una bandeja grande, llena y cubierta de hielo.
- 9) La transferencia fue programada a 250 mA por 3 h.

II. Blotting:

- 1) Durante la transferencia se prepararon las siguientes soluciones:
 - i. 250 mL PBS 10X: 20 g NaCl, 2 g KCl, 3,6 g Na₂HPO₄, 0,6 g KH₂PO₄, H₂O c.b.p. 250 mL
 - ii. 150 mL PBS-TT: 15 mL PBS 10X, 0,15 mL Tritón, 3,75 mL Tween 20 (10%), H₂O c.b.p. 150 mL.
- 2) Una vez terminada la transferencia, las membranas se colocaron en 15-20 mL de solución de bloqueo block-CH (Millipore™) en un recipiente pequeño y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora con agitación suave.
- 3) Se retiraron las membranas del bloqueo y se colocaron en otro recipiente limpio con 15 mL de la dilución 1:5,000 del anticuerpo anti-gliadina de trigo conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich cat. A1052) hecha en PBS-TT.
- 4) La incubación se llevó a cabo toda la noche a 4°C con agitación suave.
- 5) Al día siguiente las membranas se retiraron de la dilución del anticuerpo y se lavaron 3 veces con 15 mL de PBS-TT por 5 min cada una en agitación suave a temperatura ambiente.
- 6) Al terminar los lavados se revelaron en el equipo de adquisición de imágenes ChemiDoc™ de BioRad® colocando 1 mL de reactivo revelador Luminata clásico (Merck™) seleccionando el tiempo de exposición a 120 s tomando 10 imágenes en todo el intervalo y seleccionando la mejor para análisis posterior.

8 Resultados

8.1 Extracción y cuantificación de proteínas

A continuación se muestran los resultados de dos extracciones independientes (réplicas técnicas) de hordeínas. Para cuantificar la cantidad de proteína en las muestras de cada una se construyeron curvas patrón con albúmina de suero bovino (BSA). A continuación se muestra el ejemplo de un gráfico obtenido (Figura 14).

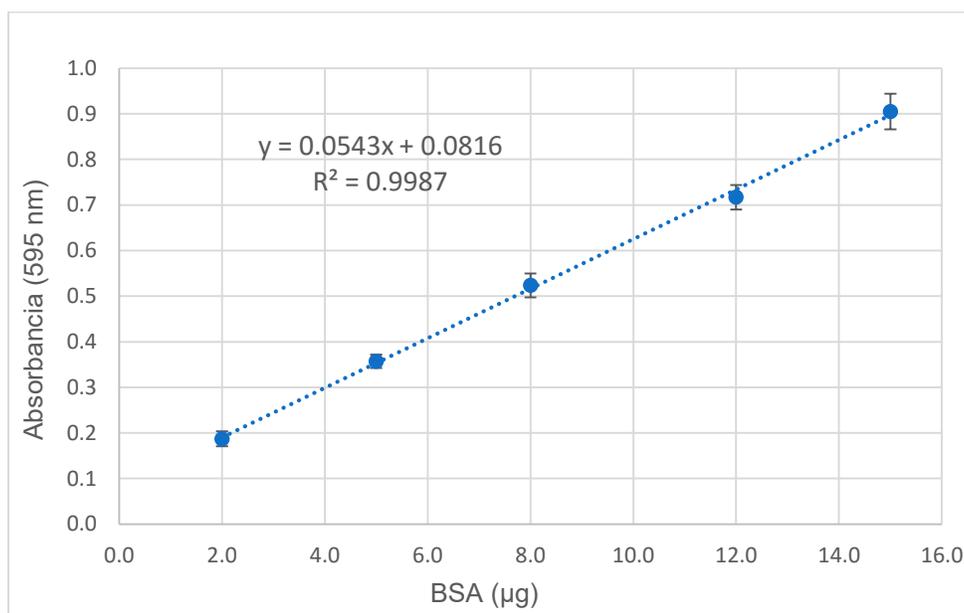


Figura 14. Ejemplo de curva patrón de BSA por el método de Bradford. La línea punteada corresponde a la regresión lineal de los datos cuya ecuación. Las barras verticales indican la desviación estándar de cada punto.

Con la ecuación de la recta se calcularon las concentraciones de las muestras de semilla seca y malta seca de diferentes variedades (Tabla 6).

Tabla 6. Cantidades de proteína obtenidas de dos extracciones de semilla seca y una de malta seca. DS: desviación estándar.

Semilla seca				
variedad	mg (1)	DS (1)	mg (2)	DS (2)
23	2.72	0.293	1.83	0.185
19	5.11	0.713	2.99	0.149
18	4.12	0.625	2.89	0.291
11	4.16	0.526		
04	2.02	0.703	2.51	0.216
Malta seca				
variedad	mg	DS		
19	2.28	0.497		
18	2.40	0.199		
04	4.04	0.729		
08	3.63	0.906		

Para facilitar la visualización y comparación de las muestras obtenidas, se presenta un histograma en la Figura 15.

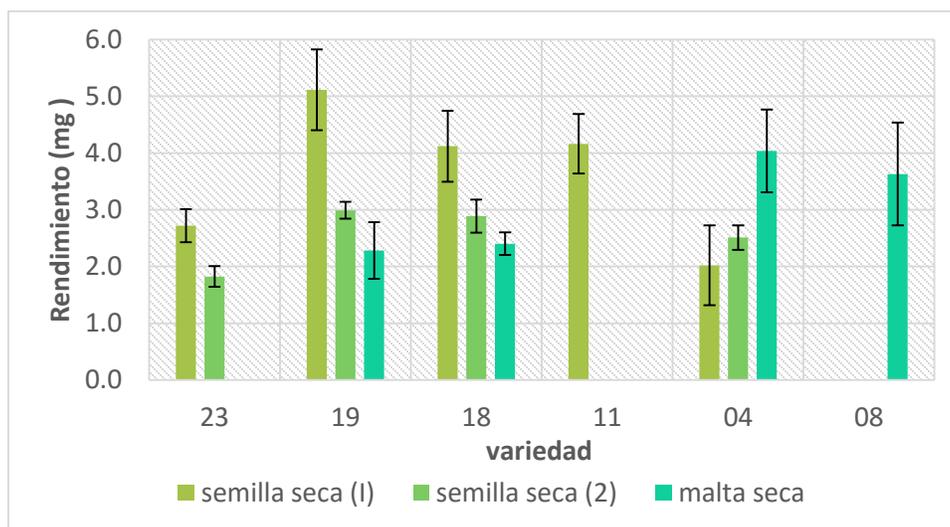


Figura 15. Cantidades de proteína obtenidas. Las barras verticales indican la desviación estándar. No se dispone de malta de la variedad 11 ni de semilla de la variedad 08.

Con el objetivo de verificar que la integridad de las proteínas extraídas se mantuvo durante la extracción y la purificación, se llevaron a cabo separaciones electroforéticas de una dimensión como la que se muestra en la Figura 16.

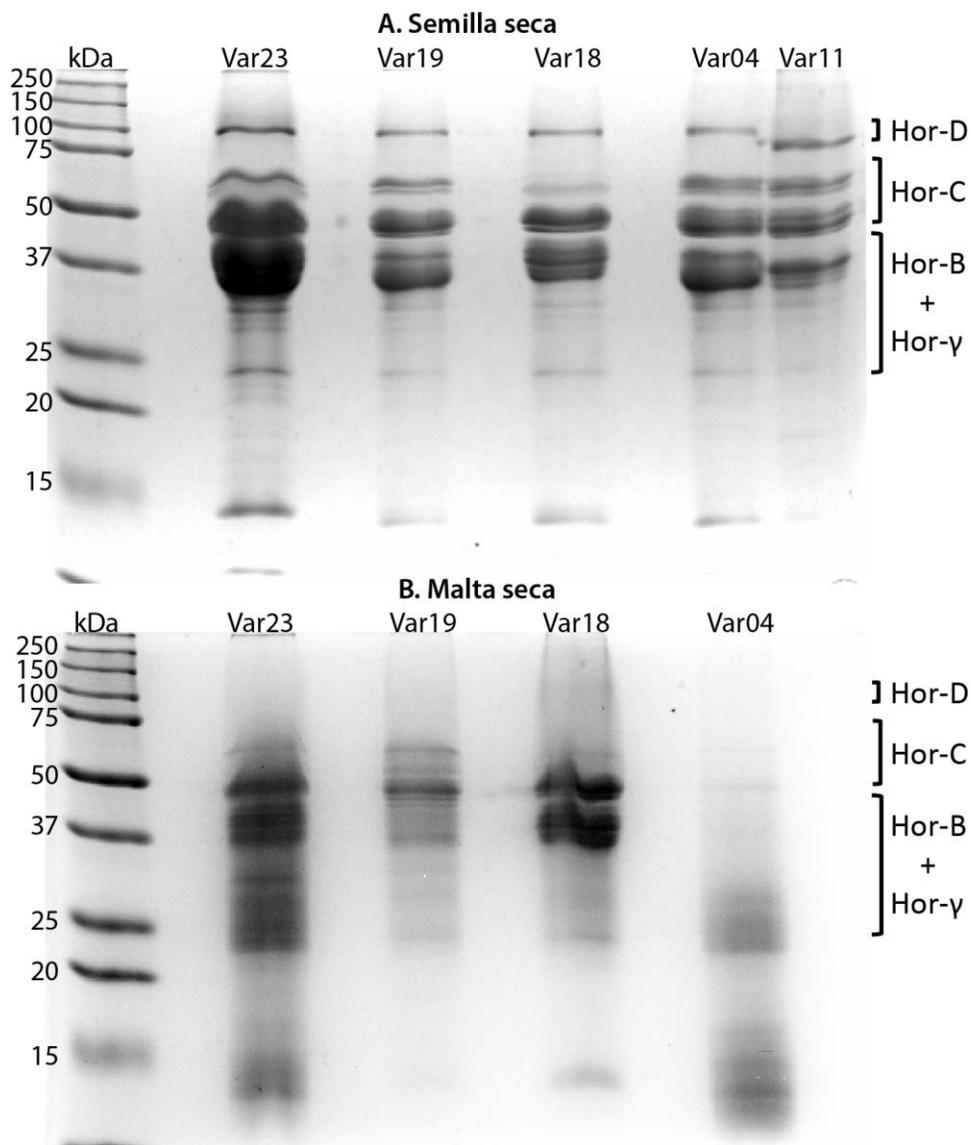


Figura 16. Separación electroforética de las muestras obtenidas. Se señalan las zonas correspondientes a cada clase de hordeína.

Se puede observar una buena calidad de las hordeínas purificadas y, en las muestras de semilla, la acumulación diferencial de bandas bien definidas entre variedades, acorde a lo reportado por Salgado et al. (2015), así como un procesamiento importante en las muestras de malta.

Con los resultados de estas extracciones es posible afirmar que el método de extracción/purificación es adecuado para enriquecer las hordeínas en las muestras proteicas. Sin embargo se puede observar que hay algunas diferencias con lo

observado por Salgado-Albarrán et al. (2015), sobre todo en las bandas correspondientes a las hordeínas D que no fueron observadas en algunas variedades (Figura 12), pero que aparecen en las extracciones realizadas en este trabajo (Figura 16-A). Esto puede deberse a diferencias en la molienda entre extracciones. De acuerdo con la literatura, las hordeínas D son poco abundantes y tienden a acumularse en la zona central del endospermo (Holopainen et al., 2012), por lo que para extraerlas es preferible asegurar una extensiva reducción al mínimo del tamaño de partícula del endospermo. Si esta condición no se alcanzó durante la primera extracción, es probable que el enriquecimiento de esta subfamilia no haya sido el suficiente para que fuera detectada por la tinción con Coomassie. De hecho, en varios trabajos donde se han extraído y analizado hordeínas se parte de harina de cebada como muestra inicial, que ha sido procesada mediante una molienda extensiva en molinos especializados para reducir el tamaño de partícula del endospermo.

En los geles correspondientes a ambas extracciones se puede apreciar que las bandas en la región de las hordeínas B y C fueron mayoritarias, lo que coincide con su mayor abundancia, estas dos subfamilias componen aproximadamente el 90 % de todas las hordeínas. Sin embargo es interesante considerar el sesgo que puede darse por la misma técnica de cuantificación: el método de Bradford depende de la interacción entre el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 y las proteínas principalmente a través de los residuos de arginina y en menor medida por aminoácidos aromáticos (Compton & Jones, 1985). Las hordeínas son particularmente pobres en arginina (Salgado-Albarrán, 2015), lo que significa que podría haber una mayor cantidad de proteína en las muestras que la que se está cuantificando por la poca frecuencia con la que los residuos de arginina pueden unirse a las moléculas de colorante, compensado esto por efecto de una concentración mayor. Como consecuencia, las concentraciones reales pueden estar ligeramente subestimadas causando que se esté cargando una mayor cantidad de proteína en los carriles de los geles de integridad de la que se está calculando.

El protocolo estandarizado para extraer, enriquecer, purificar y cuantificar las hordeínas con posibilidad de análisis en geles 2D es relativamente sencillo y ofrece la ventaja de identificar las diferentes clases de hordeínas de semilla con mayor resolución a la obtenida en el estudio previo (Salgado-Albarrán et al., 2015).

8.2 Patrones electroforéticos 2D de hordeínas en diferentes variedades mexicanas de cebada

Para el análisis de patrones electroforéticos 2D se utilizaron muestras proteicas de tres variedades contrastantes: 23 (riego), 19 (riego) y 04 (temporal) en tres réplicas de electroforesis (Anexo 13.1, figuras 23, 24 y 25).

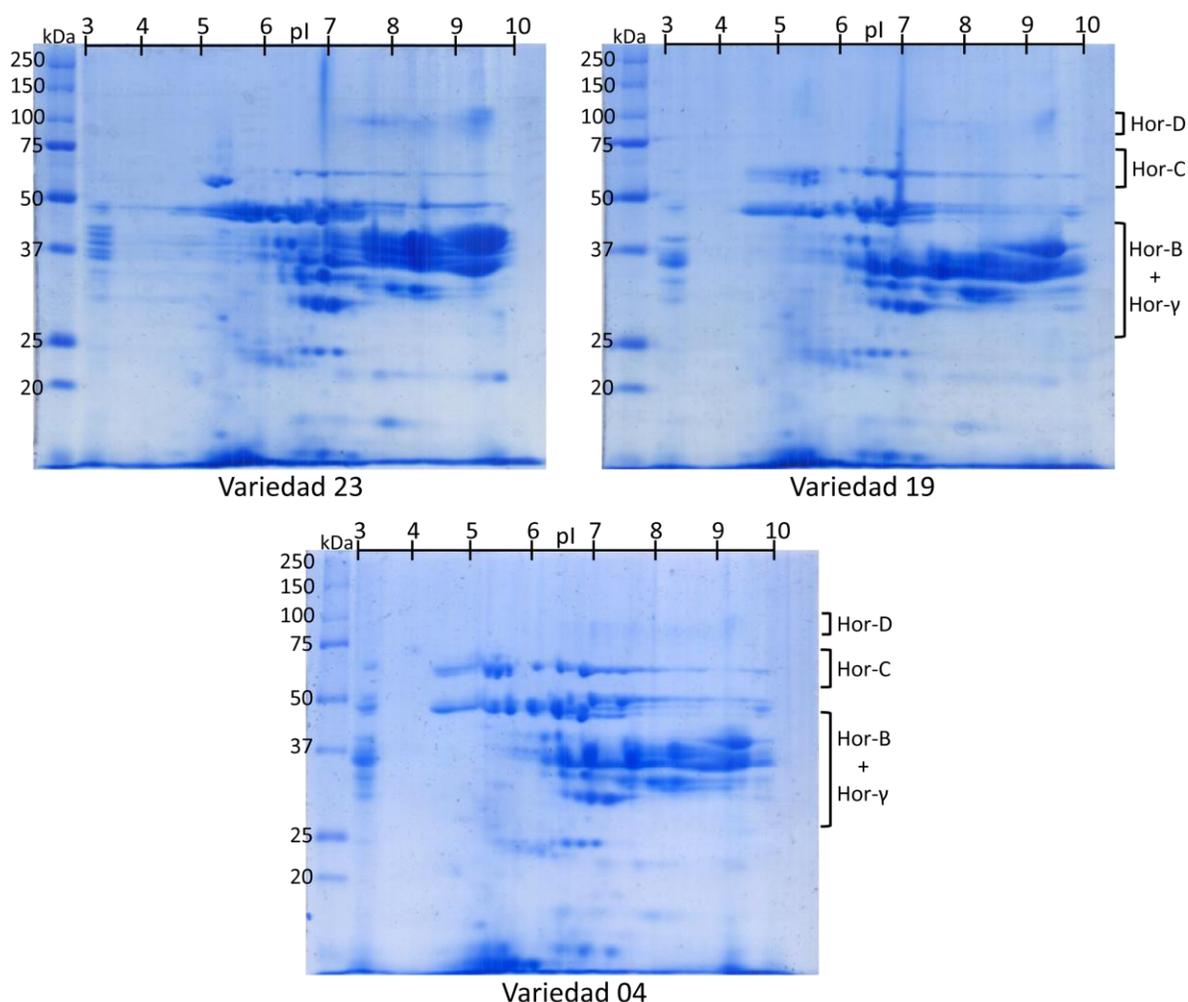


Figura 17. Separación electroforética 2D de las hordeínas extraídas de semilla de tres variedades de cebada maltera mexicana. En la parte superior se muestran los rangos de pH de la primera dimensión.

Acorde al análisis de réplicas, se observó que los patrones de acumulación de hordeínas en semilla madura son diferentes entre variedades, fundamentalmente en las zonas correspondientes a las hordeínas B y C. La separación por isoelectroenfoque permitió diferenciar isoformas de proteínas pertenecientes a la misma masa molecular cuyos patrones eran también distintos entre variedades.

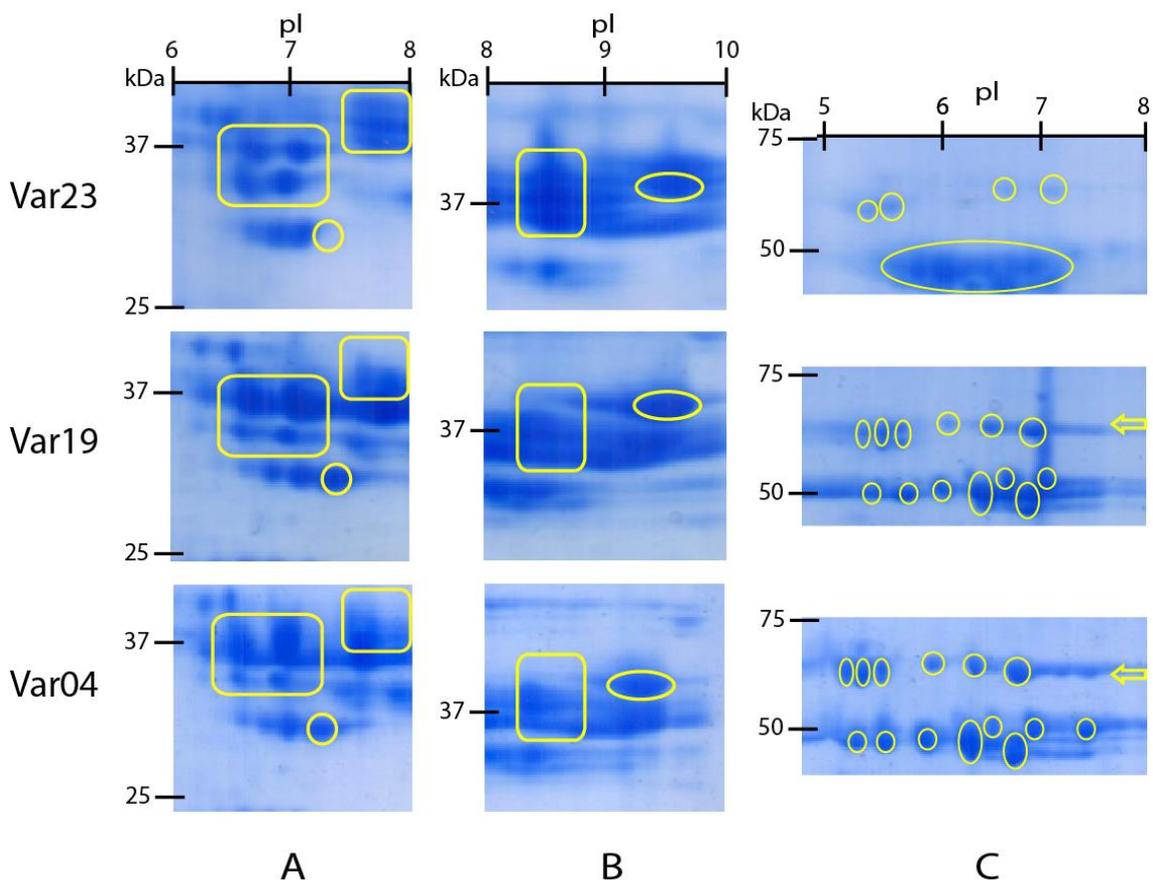


Figura 18. Diferencias en los patrones 2D de las diferentes zonas de separación. Se muestran dos regiones del gradiente de pH correspondientes a la zona de las hordeínas B (A y B), y la región correspondiente a la masa molecular de las hordeínas C.

En el panel A de la Figura 18 se muestran diferencias observadas entre variedades en el rango de pI de 6-8 y masa molecular correspondiente a las hordeínas B. El recuadro mayor incluye cuatro manchas que en la variedad 23

presenta una intensidad similar, mientras que las variedades 19 y 04 muestran mayor intensidad en las dos superiores respecto a las inferiores. Una mancha de masa molecular aproximada de 30 kDa y pI de 7.4 se encuentra presente las variedades 19 y 04 (señaladas con círculos), pero está ausente en la variedad 23. Por otra parte, un grupo de manchas con pI entre 7.5 y 8 y masas moleculares ligeramente mayores a 37 kDa mostraron mayor diversidad en la variedad 23 (cuadrado superior).

En el panel B de la Figura 18, que muestra la región de pI 8-10 y masa molecular alrededor de 37 kDa. Se puede apreciar que la variedad 23 presenta tres manchas apiladas (diferentes masas moleculares) alrededor de 37 kDa y de $pI \approx 8.5$ (recuadro vertical), mientras las variedades 19 y 04 presentan sólo una mancha en esas coordenadas. Con pI de 9.5 también se observa un mayor número e intensidad de manchas en la variedad 23 (óvalo horizontal pequeño). Esto podría representar polipéptidos de diferente tamaño o estado de oligomerización que no pudieron ser reducidos completamente por los agentes reductores utilizados en la metodología, aunque no se puede descartar la posibilidad de una mayor expresión de hordeínas tipo B o gamma en la variedad 23.

El panel C de la Figura 18 corresponde a un rango de pI 5-8 y masa molecular entre 50 y 75 kDa lo que incluiría a las hordeínas C. La intensidad de manchas en esta región es menor que la observada en la zona de hordeínas B o gamma. También se pueden observar diferencias: para las variedades 19 y 04 se presentan al menos seis proteínas o grupos de proteínas con diferente pI en la región de 70 kDa, mientras que en la variedad 23, se observan solo cuatro de estas. Sin embargo, para la variedad 19 se debe considerar que dos de las réplicas 2D parecen tener menor cantidad de proteína, siendo imposible distinguir en ellas a las manchas correspondientes a hordeínas C. Al utilizar una mayor cantidad de proteína en una tercer réplica (la que se muestra en las figuras 18 y 19), se observaron las seis manchas similares a las de la variedad 04 (Ver Anexo 13.1), por lo que en este caso las diferencias pueden ser debidas a menores

niveles de expresión de estas hordeínas en 19 respecto a 04 y no a polimorfismos o modificaciones post-traduccionales.

También en el panel C de la Figura 18 pero en la zona de 50 kDa se observan patrones con tendencias similares a las anteriores: la variedad 23 muestra varias manchas pequeñas concentradas entre $pI \approx 5.5$ y 7.2 (señaladas con un óvalo), mientras que las variedades 19 y 04 comparten al menos siete manchas definidas distribuidas entre $pI \approx 5.2$ y 7.0. La variedad 04 presenta una octava mancha en esta misma zona pero en pI de 7.5 que no aparece en la variedad 19.

Todo lo anterior sugiere que la movilidad electroforética de hordeínas B y C muestra mayor similitud entre las variedades 19 y 04, y es diferente en la variedad 23.

La resolución de hordeínas en geles 2D permite observar un mayor número de diferencias entre los patrones de hordeínas B de las variedades mexicanas de cebada. En la separación 1D, la mayoría de proteínas migraba como un gran aglomerado siendo imposible distinguir formas con diferente pI pero similar masa molecular (Figura 16). La gran diversidad de manchas que se observa en la región correspondiente a las hordeínas C, B y gamma sugiere la posibilidad de la existencia de polimorfismos en estas familias, así como modificaciones post-traduccionales y patrones de asociación (complejos protéicos) diferentes entre variedades.

8.3 Identificación de hordeínas diferenciales entre variedades por espectrometría de masas

Tomando en cuenta algunas diferencias reproducibles entre los patrones 2D de hordeínas entre las variedades 23, 19 y 04 se decidió realizar una identificación de las proteínas contenidas en las manchas diferenciales mediante espectrometría de masas. En la Figura 19 se muestran las manchas seleccionadas para identificación que incluyeron a las zonas correspondientes tanto a hordeínas B como a hordeínas C. Estas se sometieron a dos protocolos de digestión enzimática (Sección 8.5) para la identificación y secuenciación de péptidos por espectrometría de masas.

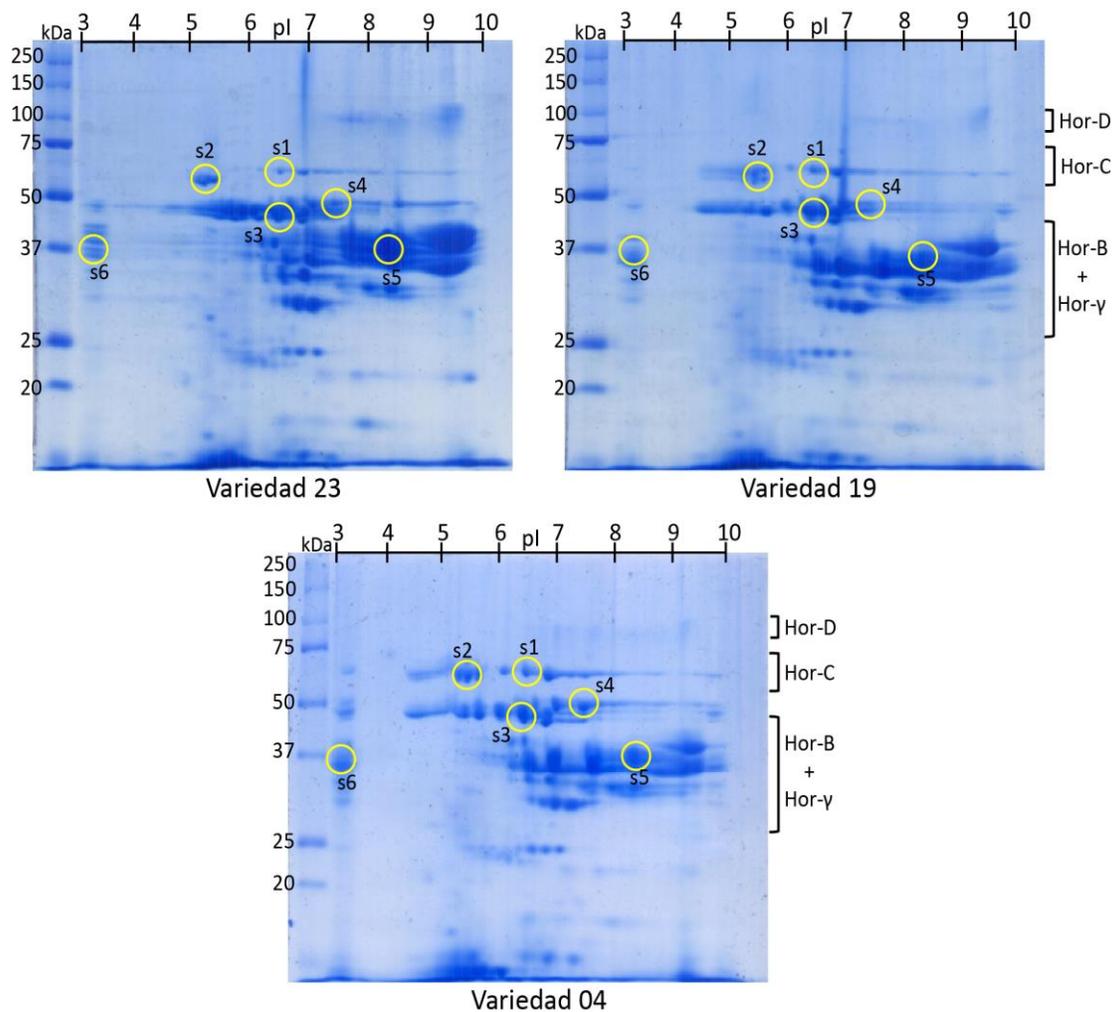


Figura 19. Manchas seleccionadas para identificación por espectrometría de masas.

Los resultados de la identificación de cada mancha se muestran en la Tabla 7. En ninguna variedad se logró identificar proteína alguna en la mancha s2. En las manchas s1, s3 y s4 se identificó la presencia de hordeínas C utilizando la digestión conjunta de quimiotripsina y tripsina. De estas, solo en la variedad 19, no se identificó nada en la mancha s1, probablemente porque el gel de donde fue cortada tenía una menor cantidad de proteína, como se mencionó anteriormente. En la mancha s3 para la variedad 23 y en s4 para la variedad 19 también se identificó a la hordeína B3, indicando que los dos tipos de hordeínas, C y B3 forman complejos multiprotéicos más estables en estas variedades.

En las manchas s5 y s6 de las tres variedades se identificó la presencia de hordeínas B, en particular de B3, mediante ambos protocolos de digestión. Hordeínas B1 fueron identificadas sólo mediante digestión simple con tripsina en la mancha s5 de la variedad 04 y en la mancha s6 de la variedad 23, que están localizadas en valores de pI opuestos, lo que sugiere la presencia de polimorfismos o modificaciones post-traduccionales.

Una única hordeína γ 1 fue identificada solamente en la mancha s5 de la variedad 23, mediante ambos protocolos de digestión enzimática, lo que confirma su comigración con las hordeínas B, reportada en la literatura.

En el caso de las hordeínas C identificadas, se encontraron tres fragmentos diferentes reportados en la base de datos UniProt: HORC_HORVS de 28 residuos de longitud, identificado en *Hordeum spontaneum*; HOR7_HORVU y HOR8_HORVU de 105 y 72 residuos de longitud respectivamente, identificados en *Hordeum vulgare*.

Tabla 7. Resultados de la identificación por espectrometría de masas.

Mancha (pl, kDa) aprox	Var	Digestión: Q+T			Digestión: T		
		ID	Descripción	PLGS score*	ID	Descripción	PLGS score*
s1 (6.5, 70)	23	HORC_HORVS HOR7_HORVU	Hordeína C	31,858.80 7562.65	--	--	--
	04	HORC_HORVS HOR7_HORVU	Hordeína C	80,054.70 46,025.43	--	--	--
s3 (6.5, 47)	23	HORC_HORVS HOR8_HORVU HOR7_HORVU	Hordeína C	106,134.4 67,789.1 16,582.51	HOR8_HORVU HOR3_HORVU	Hordeína C Hordeína B3	2,992.74 748.55
	19	HORC_HORVS HOR8_HORVU HOR7_HORVU	Hordeína C	100,239.6 71,648.9 3,989.94	--	--	--
	04	HORC_HORVS HOR7_HORVU HOR8_HORVU	Hordeína C	116,339.2 44,659.82 27,967.57	--	--	--
s4 (7.5, 50)	23	HORC_HORVS HOR8_HORVU	Hordeína C	36,883.8 5,134.244	--	--	--
	19	HORC_HORVS HOR7_HORVU HOR3_HORVU	Hordeína C	31,858.85 7,562.65	--	--	--
			Hordeína B3	671.3			
04	HORC_HORVS HOR8_HORVU	Hordeína C	50,177.50 49,993	--	--	--	
s5 (8.5, 37)	23	HOR3_HORVU HOG1_HORVU	Hordeína B3 Hordeína γ1	2,222.50 889.8	HOR3_HORVU HOG1_HORVU	Hordeína B3 Hordeína γ1	15,905.70 1,008.30
	19	HOR3_HORVU	Hordeína B3	884.4	HOR3_HORVU	Hordeína B3	7,058.50
	04	HOR3_HORVU	Hordeína B3	11,021.10	HOR3_HORVU HOR1_HORVU	Hordeína B3 Hordeína B1	12,878.30 388.6
s6 (3, 37)	23	HOR3_HORVU	Hordeína B3	535.3	HOR3_HORVU HOR1_HORVU	Hordeína B3 Hordeína B1	5,196.30 711.79
	19	--	--	--	HOR3_HORVU	Hordeína B3	899.5
	04	HOR3_HORVU	Hordeína B3	1,463.04	HOR3_HORVU	Hordeína B3	3,372.90

*PLGS score es un valor calculado por el Protein Lynx Global Server (Waters™) a partir de todos los datos disponibles de espectrometría de masas y es una medida estadística de la exactitud de la asignación de péptidos (Rosenegger, 2010). Valores por arriba de 100 señalan una identificación confiable.

8.4 Inmunodetección de hordeínas diferenciales entre variedades

La inmunodetección es un método de identificación que puede ser tan específico como el anticuerpo del que se disponga. Para las hordeínas se utilizó la técnica de inmuno-réplica tipo Western con un anticuerpo policlonal generado en conejo contra la fracción de gliadinas de trigo y conjugado con la enzima peroxidasa. De acuerdo con el fabricante (Sigma-Aldrich®), este anticuerpo es capaz de reconocer a las hordeínas de cebada. Sin embargo, no se ha reportado su especificidad para las diferentes familias y subfamilias de las hordeínas. Por ello resultaba importante determinar si todas o solo algunas de las diferencias en los patrones electroforéticos de las hordeínas de variedades mexicanas de cebada podían detectarse con el uso del anticuerpo.

Para estos análisis se incluyó a la variedad 18, ya que su patrón electroforético en una dimensión es similar al de la variedad 23, y diferente de 19 y 04.

8.4.1 Patrones 1D de hordeínas identificadas con Ac anti-gliadina.

Al revelar las reacciones con el anticuerpo se detectó la presencia de señales principalmente en la zona de movilidad electroforética correspondiente a las hordeínas B. En la Figura 20 se pueden observar las diferencias en los patrones de bandeo entre variedades (lado izquierdo), así como en la masa molecular de las bandas identificadas por el anticuerpo anti-gliadina (lado derecho). Las variedades 23 y 18 presentan una fuerte señal de mayor masa molecular que las variedades 19 y 04. En todas las variedades hay una banda alrededor de 50 kDa con fuerte intensidad en Coomassie que no parece reconocerse por el anticuerpo. Al parecer el anticuerpo reacciona preferencialmente con hordeínas B, a pesar de estar dirigido contra gliadinas en general; incluso, el software de adquisición de imágenes no es capaz de detectar señal alguna en el resto de los carriles a pesar de que se pueden observar bandas muy tenues por encima y por debajo de las bandas principales, indicando que el anticuerpo podría reconocer otras clases de hordeínas pero con menor especificidad.

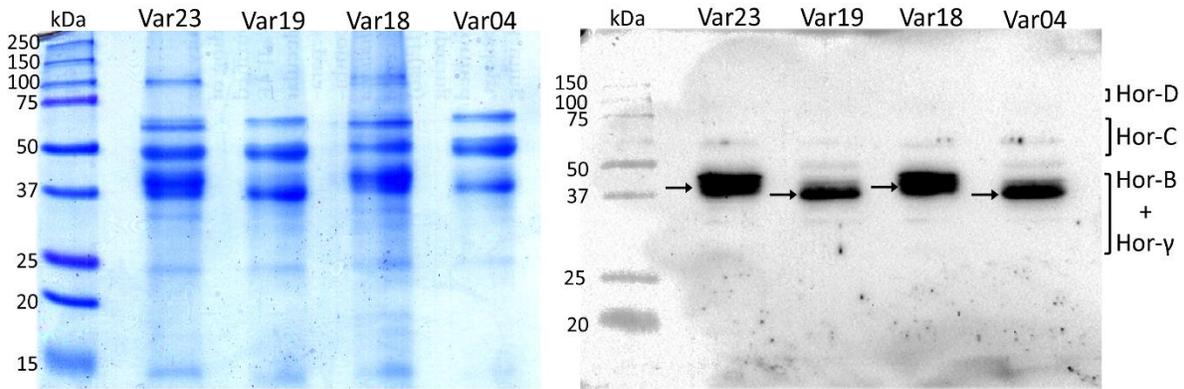


Figura 20. Inmuno-réplica tipo Western de las hordeínas extraídas de semilla seca (derecha). Se muestra también el gel teñido con Coomassie (izquierda).

Las réplicas del análisis por western-blot (Anexo, sección 13.2) permitieron hacer una comparación densitométrica (Figura 21) de las bandas principales, señaladas con flechas en la figura anterior.

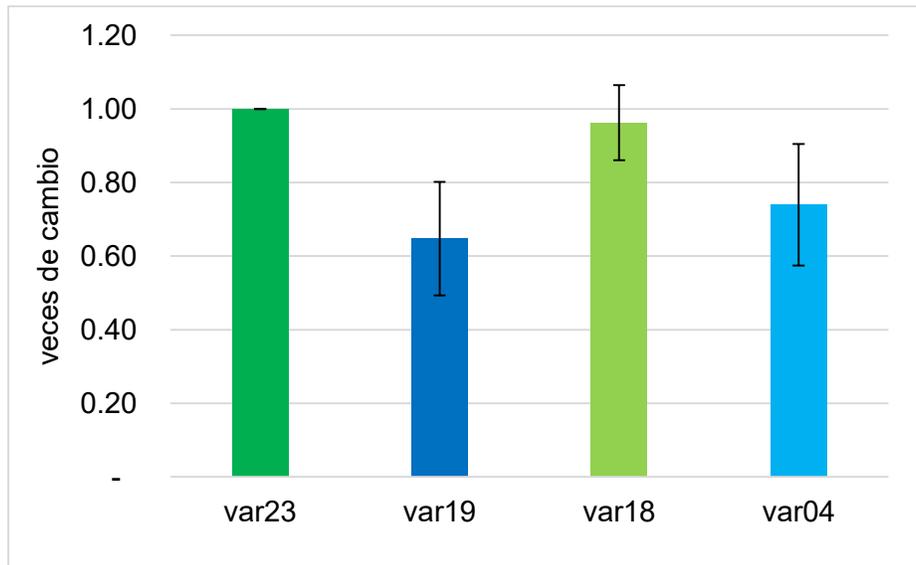


Figura 21. Análisis densitométrico de las bandas señaladas en la figura 21. Se grafican las veces de cambio de la banda de 37 kDa de cada variedad respecto a var23.

Se puede observar que las bandas de las variedades 23 y 18 tienen prácticamente la misma intensidad, al igual que las variedades 19 y 04, que es menor a las primeras, aunque la desviación estándar de los datos obliga a

considerar la similitud entre las bandas de las variedades 18 y 04. El análisis de varianza arroja que existe una diferencia significativa entre las variedades (Anexo: sección 13.2), que corresponde a la variedad 19.

Las diferencias en densitometría sugieren una acumulación diferencial de las hordeínas B entre variedades, sin embargo este no es un método cuantitativo, por lo que se tendría que recurrir a mediciones por ELISA para determinar si la acumulación de hordeínas reconocidas por este anticuerpo es realmente diferencial. Las variedades 04 y 19 muestran patrones y cantidades similares de hordeínas reconocidas por el anticuerpo utilizado, pero se cultivan en ciclos y condiciones de riego distintas. Acorde a esto, se puede sugerir que la expresión de hordeínas en las variedades mexicanas es independiente del ambiente.

8.4.2 Patrones 2D de hordeínas identificadas con Ac anti-gliadina.

Para resolver la interrogante de si el anticuerpo utilizado es más afín a las hordeínas B que al resto y dilucidar si las diferencias observadas entre variedades se deben al enriquecimiento de proteínas de la misma masa molecular pero con diferente pI, se decidió combinar la inmunodetección tipo Western con la separación 2D. En esta combinación, el uso de una mayor cantidad de proteína por cada muestra, permite el enriquecimiento de proteínas menos abundantes, como las hordeínas C y D, aumentando la probabilidad de su detección con el anticuerpo. Además ofrece una mejor idea de la distribución de isoformas electroforéticas y su grado de expresión.

En la Figura 22 se puede observar que en general las diferencias entre los patrones de las variedades se mantienen con respecto a los observados en las figuras 18 y 19, y que algunas de estas se reproducen en los patrones de la inmuno-réplica tipo Western indicando que efectivamente representan isoformas electroforéticas de las hordeínas B. Es de notar que el anticuerpo reconoce proteínas en las manchas de la región ácida del gradiente de pH, evidenciando la presencia de posibles polimorfismos o isoformas ácidas de hordeínas B.

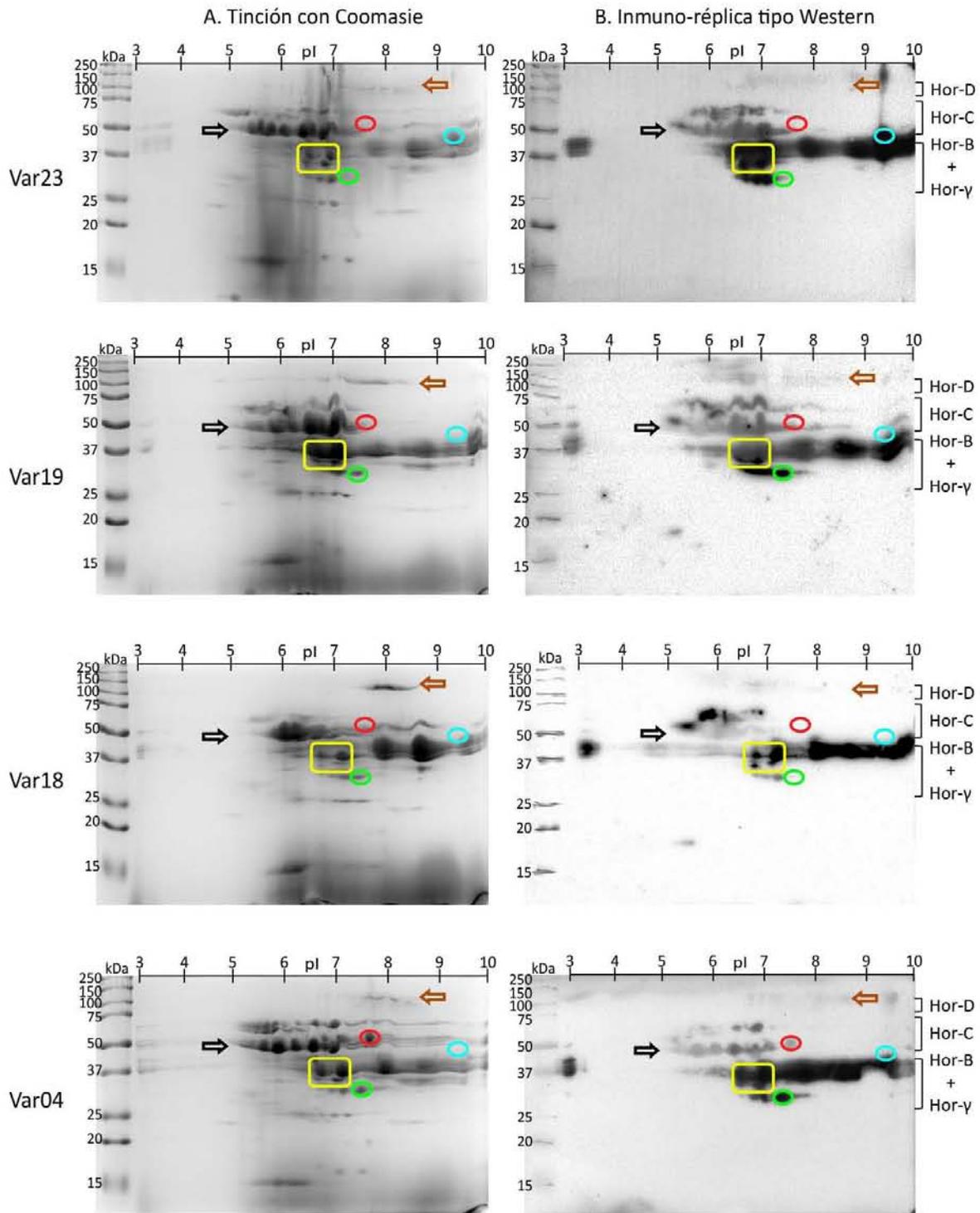


Figura 22. Resultados de la inmuno-réplica tipo Western de geles 2D de las variedades analizadas. Del lado izquierdo se muestran los patrones electroforéticos 2D por tinción con Coomassie.

También se observan diferencias entre las intensidades de la señal con anticuerpo en proteínas presentes en ambas variedades. Aunque estas diferencias no fueron analizadas de manera cuantitativa, al compararlas con otras regiones de similar intensidad entre las variedades, son indicativas de acumulación diferencial de isoformas particulares. Por ejemplo, en la variedad 04 se puede observar la presencia de una mancha en 50 kDa y pl 7.7 (óvalo rojo), tanto por tinción con Coomasie como en el anticuerpo, que no se observa en ninguna de las otras tres variedades. En las variedades 23 y 18, caso contrario a 19 y 04, la mancha debajo de 37 kDa y pl 7.3 (óvalo verde) se encuentra ausente. También en la variedad 23 se puede distinguir una mayor acumulación de las proteínas más alcalinas justo debajo de 50 kDa (óvalo verde agua), en contraste con 19, 18 y 04. En la región de pl 6.7-7.0 y 37 kDa (recuadro amarillo), donde se observan cuatro isoformas en las cuatro variedades, se distinguen intensidades variables dependiendo de la variedad, que parecen mantenerse al observarla en la inmuno-réplica y que son consistentes con lo observado en el panel A de la Figura 18. Además, en la región de 50 kDa entre pl 5 y 7 (señalada con flechas negras), se puede ver la acumulación diferencial de manchas que es característica en cada variedad, aún cuando en SDS-PAGE se observaban patrones de bandeo similares en esta región de masa molecular.

9 Discusión de resultados

9.1 Distribución de las hordeínas identificadas por EM en tres variedades contrastantes

Abordando las diferencias entre los protocolos de digestión, es de notar que las hordeínas C tuvieron una mejor identificación con el protocolo secuencial quimotripsina + tripsina (Q+T) (Tabla 7) en concordancia con lo reportado por Salgado-Albarrán et al., (2015).

Con respecto a la distribución de las hordeínas identificadas en las distintas zonas de los geles de electroforesis, es de notar que varias de ellas aparecen en más de una mancha específica (Tabla 7). El caso de las hordeínas C es de particular interés pues se identificaron tres fragmentos distintos reportados en la base de datos UniProt distribuidos en tres manchas diferentes:

- HORC_HORVS se identificó en s1 (pl 6.5, 70 kDa), s3 (pl 6.5, 47 kDa) y s4 (pl 7.5, 50 kDa). Es un fragmento pequeño (28 residuos), por lo que se puede afirmar que forma parte de proteínas maduras diferentes. Tatham y Shewry (2012) reportan al menos tres secuencias de hordeínas C que contienen esta secuencia localizada cerca del extremo N-terminal.
- HOR7_HORVU aparece también en s1 (pl 6.5, 70 kDa), s3 (pl 6.5, 47 kDa) y s4 (pl 7.5, 50 kDa). De nuevo, se trata de una secuencia parcial que está contenida en lo que parecen ser tres proteínas maduras. Los alineamientos realizados por Tatham y Shewry (2012), que incluyen esta secuencia (referida como P06472), la ubican en el extremo C-terminal de las mismas tres proteínas donde se encontró el péptido anterior (HORC_HORVS).
- HOR8_HORVU se identificó tanto en s3 (pl 6.5, 47 kDa) como en s4 (pl 7.5, 50 kDa). En este caso, parece tratarse de dos proteínas con peso molecular muy similar y diferente pl. La secuencia de este fragmento también fue reportada por Tatham y Shewry (2012), pero bajo el identificador 1307151A,

y se le ubica en el extremo C-terminal de dos proteínas de mayor tamaño, distintas a aquellas donde se encontraron los dos fragmentos anteriores.

A partir de su movilidad electroforética, de los diferentes fragmentos identificados por espectrometría de masas y de su distribución, se propuso la designación de diferentes hordeínas con diferentes identificadores resumidos en la Tabla 8.

Tabla 8. Distribución electroforética de hordeínas acorde a los resultados de identificación por espectrometría de masas.

Hordeínas encontradas			Coordenadas estimadas		Mancha
Var23	Var19	Var04	pI	kDa	
C1		C1	6.5	70	s1
C4	C4**	C4	7.5	50	s4
C3*	C3	C3	6.5	47	s3
B3.3*					
	B3.4**		7.5	50	s4
B3.5	B3.5	B3.5	8.5	37	s5
		B1.5			
B3.6	B3.6	B3.6	≤3		s6
B1.6					
γ1			8.5		s5

*, **: encontradas en asociación.

En la mancha s1 (pI 6.5, 70 kDa) se encontró una hordeína C, aquí identificada como C1, que parece incluir los fragmentos HORC_HORVS y HOR7_HORVU (Tabla 7), y que según la literatura se localizan en los extremos N- y C-terminal respectivamente. Ésta hordeína está ausente en la variedad 19, pero se debe tomar en cuenta la cantidad menor de proteína cargada en el gel de donde se cortó la mancha para procesamiento, como explicación a la falta de identificación. En la réplica de este gel donde se observa una cantidad adecuada de proteína, es posible ver la mancha correspondiente a s1 (Anexo, Figura 24), por lo que se

puede especular que la hordeína propuesta C1 también se encuentra expresada en la variedad 19.

La mancha s4 parece contener, en el caso de las variedades 23 y 04, una hordeína C diferente, ligeramente más alcalina (pI 7.5) y más pequeña (50 kDa) que también incluye al fragmento HORC_HORVS en el extremo N-terminal pero en el extremo C-terminal contiene al fragmento HOR8_HORVU, por lo que se le designó como C4. En la misma mancha s4 pero de la variedad 19 aparece también una hordeína C pero con estructura similar a C1 (Tabla 7) y asociada a una hordeína B3, por lo que se podría hablar de una asociación variedad-específica que modifica las propiedades electroforéticas de estas proteínas.

De acuerdo con Tatham y Shewry (2012), las hordeínas C tienden a mostrar homología en las secuencias de sus dominios N- y C-terminales pero divergen en los dominios centrales (Figura 7), lo cual se ve reflejado en las estructuras propuestas para las hordeínas aquí identificadas como C1 y C4 que comparten el dominio N-terminal, y sus dominios C-terminales contienen secuencias con el 63.2 % de identidad (según alineamiento en línea por UniProt de HOR7_HORVU y HOR8_HORVU), por lo que las diferencias en pI y peso molecular son atribuibles principalmente a variaciones en la estructura primaria del dominio repetitivo central.

El caso de la mancha s3 (pI=6.5, 47 kDa) requiere un análisis algo más detallado: a primera vista parece ser que no se trata de una hordeína C, por estar en un peso molecular muy bajo (estimado: 47 kDa), pero la literatura parece ser algo inconsistente cuando se trata de definir los pesos moleculares de las distintas clases de hordeínas. Diversos trabajos ubican a las hordeínas C entre 55-75 kDa (Qi, Zhang, & Zhou, 2006), 49-72 kDa (Dai, y otros, 2014), o entre 49-66 kDa (Bleidere & Grunte, 2009). Con esta gama de rangos de movilidad electroforética sólo se puede asumir que el intervalo real donde se encuentren estas hordeínas dependerá de la variedad de cebada y de las condiciones experimentales de la separación. Habiendo dicho esto y considerando que a las hordeínas C se les puede encontrar en pesos moleculares tan bajos como 45 kDa (Colgrave et al.,

2012), se asume que se trata de una hordeína C con un fragmento en el extremo C-terminal que engloba tanto a HOR7_HORVU como a HOR8_HORVU, y que tiene una longitud menor en el dominio repetitivo central, explicando su bajo peso molecular. A esta hordeína se le identifica como C3 en la Tabla 8.

Las hordeínas B también presentan una distribución bastante amplia (como se ve en la Figura 19), con las dos sub-familias reportadas (Anderson, 2013) presentes de forma diferencial según lo presentado en la Tabla 7: las hordeínas B3 parecen ser las más abundantes apareciendo con mayor frecuencia en diferentes coordenadas electroforéticas, mientras las hordeínas B1 aparecen solo en dos variedades en dos manchas específicas.

Una hordeína B3 fue identificada en la mancha s3 (pI=6.5, 47 kDa) de la variedad 23, asociada a una hordeína C (C3). Sin embargo, de acuerdo a la herramienta en línea de UniProt, ExPASy, el pI de la hordeína B3 encontrada (identificada como HOR3_HORVU en UniProt), es de 7.74 y su peso molecular es de 30.2 kDa, lo que indica que la asociación con la hordeína C pudo causar un cambio en las propiedades electroforéticas de B3. Esta hordeína se identifica como B3.3 en la Tabla 8.

Algo similar ocurre en la mancha s4 (pI=7.5, 50 kDa) de la variedad 19 donde también aparece una hordeína B3, identificada aquí como B3.4 (Tabla 7), acompañada de una hordeína C (C4), sugiriendo que en algunas variedades mexicanas de cebada hay asociación fuerte entre estas clases de hordeínas capaces de resistir las condiciones desnaturizantes del protocolo seguido en este trabajo.

En la mancha s5 (pI=8.5, 37 kDa), las tres variedades presentan hordeínas B3, denominadas por movilidad electroforética como B3.5. También, las tres variedades presentan hordeínas B3 en la mancha s6 (pI≤3, 37 kDa), referidas como B3.6, lo cual muestra que existen miembros de esta sub-familia en ambas regiones: ácida y alcalina, de masa molecular y expresión similar en las tres variedades analizadas.

Hordeínas de la sub-familia B1 fueron encontradas solamente en la mancha s5 ($pI=8.5$, 37 kDa) de la variedad 04 y en la mancha s6 ($pI\leq 3$, 37 kDa) de la variedad 23 (Tabla 7), lo que muestra la existencia de al menos dos isoformas electroforéticas: una alcalina (identificada como B1.5) y una ácida (identificada como B1.6), similares a las de las hordeínas B3, pero que se expresan en variedades diferentes y contrastantes.

La identificación de hordeínas γ por espectrometría de masas era esperada en las tres variedades analizadas, por su asociación con las hordeínas B y porque dos de los miembros de esta familia son esenciales en la formación de los cuerpos proteicos durante el llenado de los granos (Shewry y Halford, 2002). Sin embargo, solamente $\gamma 1$ fue identificada en la mancha s5 ($pI=8.5$, 37 kDa) de la variedad 23 lo que podría deberse a un mayor nivel de expresión de esta familia en esta variedad. Debido a esto, se propone cuantificar y comparar los niveles de expresión de estas hordeínas entre variedades con anticuerpos específicos, como los utilizados por Rechinger (1993) o Snégaroff (2013), o incluso estudiar estas diferencias a nivel de transcritos mediante RT-qPCR.

9.2 Sobre los patrones encontrados con el Ac anti-gliadina

En los resultados reportados por Salgado-Albarrán (2015), en cuyo trabajo se identificaron hordeínas B por espectrometría de masas en las bandas correspondientes a las hordeínas D, se llegó a la conclusión de que en realidad se trataba de oligómeros de hordeínas B asociadas mediante puentes disulfuro. Sin embargo, si esto hubiera ocurrido en las extracciones realizadas en este trabajo, se esperaría que el anticuerpo anti-gliadina empleado para la inmunodetección hubiera reconocido también las bandas correspondientes a las hordeínas D (Figura 20), lo que no se observó, probablemente porque las condiciones reductoras establecidas en la metodología fueron lo suficientemente efectivas para disgregar los posibles oligómeros de hordeínas B de mayor masa molecular.

Por otro lado, por lo observado en la inmuno-réplica tipo Western del gel 2D, la acumulación de hordeínas de las cuatro variedades analizadas resultó no ser tan similar entre algunas de ellas, como se esperaba con base en lo observado en la detección con anticuerpo en las proteínas separadas en gel 1D. En éste, los patrones de bandeo de las variedades 23 y 18 fueron similares entre sí pero distintos a los de 19 y 04, a su vez muy parecidos, pero como se menciona en la sección 9.4.2, el anticuerpo reacciona al menos con una mancha que distingue a la variedad 04 del resto (incluida 19), señalada en la Figura 22 con un óvalo rojo en la zona de las hordeínas C. De forma similar, la variedad 23 presenta una mayor expresión de uno de los polipéptidos alcalinos de las hordeínas B, señalada con un óvalo verde agua en la misma figura, que no se ve en la variedad 18. Además, en el caso de estas últimas dos variedades, el patrón de manchas observado en la zona por encima de 50 kDa (señalado con flechas negras, Figura 22), muestra una acumulación diferente de las varias proteínas que corresponderían a hordeínas C, patrón que no se puede apreciar en el gel teñido con Coomassie o la reacción del anticuerpo en el gel 1D.

La detección de hordeínas con el anticuerpo en el gel 2D mostró que la zona de las hordeínas B es donde se presentan manchas de mayor intensidad, lo que contrasta con las manchas correspondientes en los geles teñidos con azul de Coomassie, que son más tenues. Esto podría explicarse por la diferencia entre la sensibilidad de la tinción de Coomassie y la sensibilidad del anticuerpo, siendo ésta última mucho mayor. Sin embargo, este comportamiento en las hordeínas B no se observa en la zona de las hordeínas C, donde se pueden distinguir manchas de intensidad menor con el anticuerpo, y que en los geles teñidos por Coomassie corresponden a manchas intensas y bien definidas. Esto lleva a la conclusión de que el anticuerpo aquí utilizado presenta una mayor afinidad por las hordeínas B y tal vez las y, que por el resto de las hordeínas.

En cuanto a las hordeínas D, el hecho de que no sean distinguibles en separaciones por electroforesis 2D en los geles de mayor tamaño (Figura 17) podría deberse a su baja abundancia (Colgrave, 2012): si la banda observada en

los geles de una dimensión se separa en isoformas de diferente pI en el isoelectroenfoque, cada una podría encontrarse en una cantidad por debajo de la sensibilidad de tinción con Coomasie. Sin embargo, en el caso de la separación electroforética de proteínas en geles 2D pequeños (Figura 22) se pueden observar algunas bandas tenues (señaladas con flechas marrón) que corresponden a la masa molecular de las hordeínas D, y aunque no son reconocidas por el anticuerpo en la inmunodetección, esto podría deberse a la mayor afinidad que éste tiene por las hordeínas B. Esto lleva a proponer el desarrollo de una técnica de enriquecimiento para las hordeínas D, si se quieren explorar las diferencias que puedan presentar entre variedades, así como el uso de un anticuerpo específico si se opta por la técnica de inmuno-réplica tipo Western o ELISA para dicho fin.

A manera de integración, sobre las hordeínas B se puede afirmar que las diferencias de su acumulación entre variedades resaltaron desde su separación por SDS-PAGE 1D, se confirmaron e hicieron más evidentes en los patrones de electroforesis 2D teñidos por Coomasie, y mediante la inmuno-réplica tipo Western se encontraron diferencias específicas que pudieron distinguir variedades que previamente se consideraban prácticamente iguales en la expresión de esta familia de hordeínas. Sin embargo, fue con la identificación por espectrometría de masas que se logró encontrar miembros específicos de las dos subfamilias que las integran: B1 y B3, y la distribución diferencial que parecen presentar entre las variedades analizadas.

En cuanto a las hordeínas C, las diferencias de su acumulación entre variedades no son tan evidentes en la separación electroforética en geles 1D ni con Coomasie o la detección específica por anticuerpo, pero sí se observan en la cuando se hace una segunda dimensión, donde se encuentran isoformas electroforéticas y patrones de acumulación que distinguen variedades previamente consideradas casi idénticas. Gracias a la identificación por espectrometría de masas se pudo proponer la presencia de tres proteínas pertenecientes a esta

familia, distinguidas por la secuencia primaria parcial deducida de los péptidos obtenidos de la identificación.

La diversidad aquí observada lleva a proponer a ambas familias de hordeínas, B y C, como buenas candidatas para un análisis más profundo que permita generar un perfil de expresión para las variedades contrastantes de cebada mexicana. En el caso de las hordeínas B, la subclase B1 parece ser un buen indicador de diferencias entre variedades, así como la asociación de algunos miembros de la subclase B3 con hordeínas C parece ser un fenómeno variedad-específico que vale la pena investigar.

Asimismo, es recomendable explorar más a fondo a las hordeínas menos abundantes, D y γ , para ver las diferencias que éstas pueden presentar entre variedades. En el caso de las hordeínas γ , dichas diferencias parecen ser de niveles de expresión, mientras que para las hordeínas D, el enriquecimiento previo parece ser necesario para un análisis a nivel proteína, aunque en todos los casos, un análisis a nivel transcrito, utilizando cebadores adecuados para RT-qPCR, podría ser una herramienta útil y complementaria a lo aquí presentado.

10 Conclusiones

1. El método propuesto de extracción-purificación de hordeínas es adecuado para obtener extractos proteicos de buena calidad y con concentraciones adecuadas para una separación electroforética 2D.
2. Se obtuvieron patrones reproducibles en electroforesis 2D de las hordeínas presentes en la semilla madura de tres variedades de cebada maltera mexicana.
3. Los patrones electroforéticos mostraron diferencias particulares en la distribución de hordeínas C y B entre las variedades 23, 19 18 y 04.
4. Estas diferencias fueron comprobadas por espectrometría de masas y por inmuno-réplica tipo Western con un anticuerpo comercial anti-gliadina.
5. La inmunodetección con el anticuerpo anti-gliadina, acoplada con la electroforesis 2D provee una metodología adecuada para la identificación de hordeínas diferenciales entre las variedades mexicanas de cebada maltera.

11 Perspectivas

De continuarse este trabajo en el futuro se requeriría extender los análisis aquí realizados al resto de las variedades mexicanas de cebada, para tener una idea completa de la distribución de las hordeínas y su comportamiento según la región y el ciclo de cultivo, utilizando semillas obtenidas de invernadero como punto de referencia. También, sería recomendable ampliar el número de manchas seleccionadas para identificación por espectrometría de masas, para tener una visión más amplia de la distribución de las hordeínas y la estructura primaria de las isoformas electroforéticas con base en los péptidos obtenidos.

Entre las cosas que podrían explorarse para mejorar la metodología está el uso de una proteína estándar diferente y más cercana a las hordeínas para la cuantificación, e.g. gliadina de trigo. Existe también la posibilidad de aplicar técnicas de extracción y separación específicas para enriquecer las distintas clases de hordeínas, lo cual abre la puerta a un análisis más detallado para la búsqueda de polimorfismos o proteínas diferenciales entre variedades, sin mencionar la posibilidad de enriquecer aquellas que son poco abundantes. La inmunodetección de las hordeínas también puede mejorarse desarrollando anticuerpos específicos para cada clase, lo que permitiría la cuantificación específica de cada familia mediante inmuno-réplicas tipo Western o incluso ELISA.

El proceso de malteo es muy complejo y tiene una dinámica que incluye proteasas e inhibidores además de las hordeínas, por lo que el estudio de su degradación e interacción con otros posibles marcadores moleculares (e.g. proteína disulfuro isomerasa), en variedades de calidades malteras contrastantes podría llevar a un mejor entendimiento y a encontrar marcadores que influyan en la calidad del proceso y de la cebada mexicana misma para desarrollar en última instancia nuevas variedades con características deseables. Incluso, con las herramientas propuestas en este trabajo y en el párrafo anterior, es posible un seguimiento de las hordeínas durante el malteo y la elaboración de cerveza a partir de las diferentes variedades, que podría arrojar información sobre el beneficio o los inconvenientes que pudieran estar causando en los diferentes

parámetros que se consideran para el control de calidad (e.g. hidratación del grano durante el remojo, % de extracto en el macerado y la sacarificación, precipitación de proteínas durante la ebullición, taponamiento de filtros, formación de turbidez y estabilidad de la espuma en la cerveza, etc.).

La falta de un genoma completo bien anotado de *Hordeum vulgare* L. en bases de datos públicas dificulta la identificación de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas. En este sentido, en el grupo de trabajo se está abordando el problema a través del estudio de los transcritos de las diferentes clases de hordeínas, para entender la dinámica con la que se sintetizan durante el llenado de los granos y el desarrollo del endospermo. Se ha encontrado que la mayoría de las hordeínas analizadas hasta el momento tienen un pico de expresión a los 20 días post-antesis (Luján-Soto, en proceso). Este trabajo podría complementarse con el estudio de inmunolocalización de las diferentes clases de hordeínas en el llenado del grano, específicamente en la formación de los cuerpos proteicos, su composición, ubicación en el endospermo y su modificación cuando el grano alcanza la madurez y durante el malteo, para explorar las diferencias que puede haber entre variedades desde antes del proceso de malteo. Con esto eventualmente se espera obtener secuencias de transcritos que puedan permitir a su vez encontrar polimorfismos, SNPs o incluso predecir secuencias de aminoácidos que puedan usarse como referencia para una futura identificación de proteínas, o como marcadores moleculares adicionales, creando una base de datos específica de hordeínas de cebada mexicana a distintos niveles del flujo de información génica.

12 Anexos

12.1 Réplicas de las electroforesis en gel 2D

La separación electroforética de las proteínas en gels 2D mostrados en la Figura 17 son los representativos de triplicados hechos para cada variedad, que se muestran a continuación.

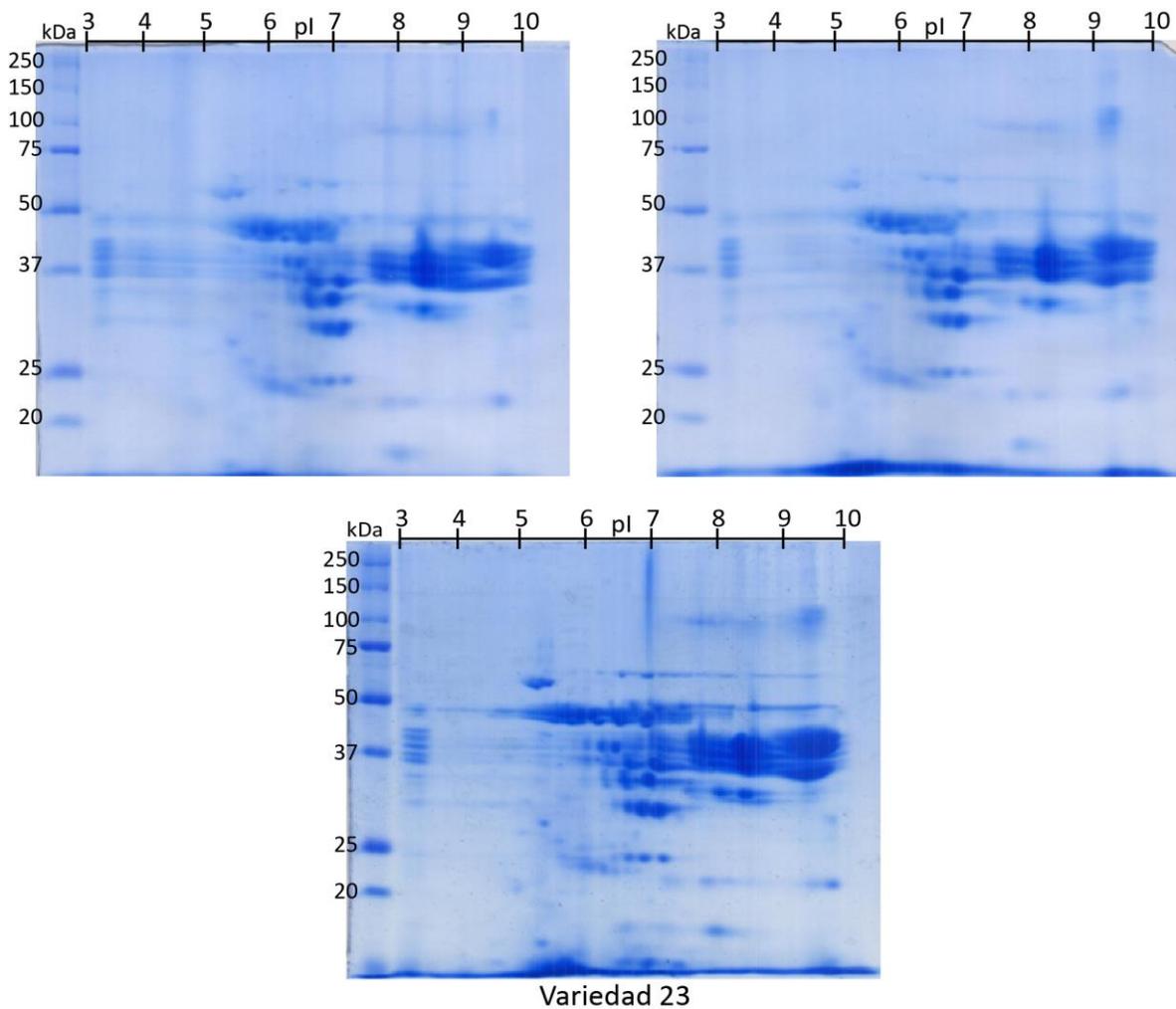


Figura 23. Triplicado de la separación electroforética en gel 2D de proteínas de la variedad 23.

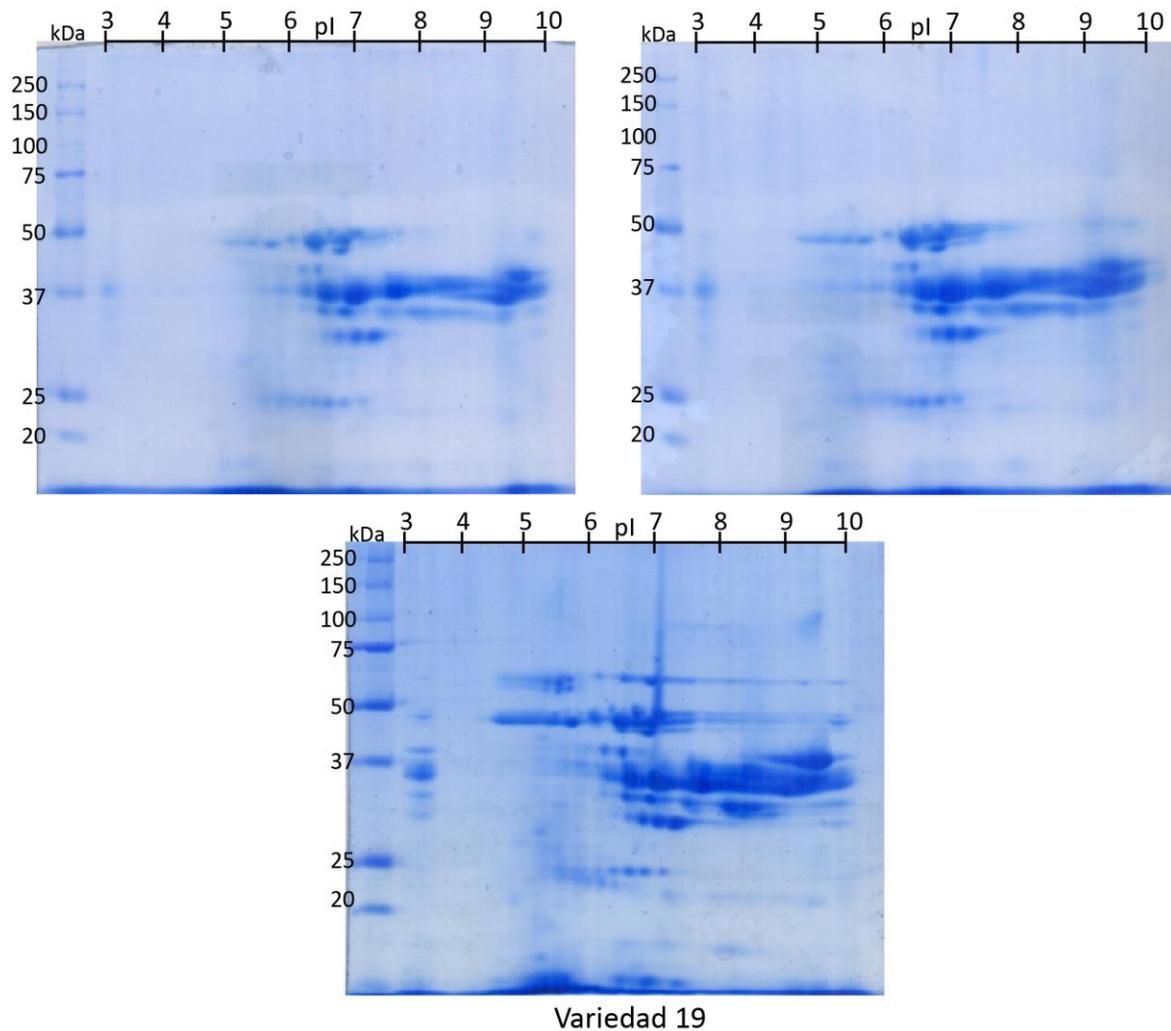


Figura 24. Triplicado de la separación electroforética en gel 2D de proteínas de la variedad 19.

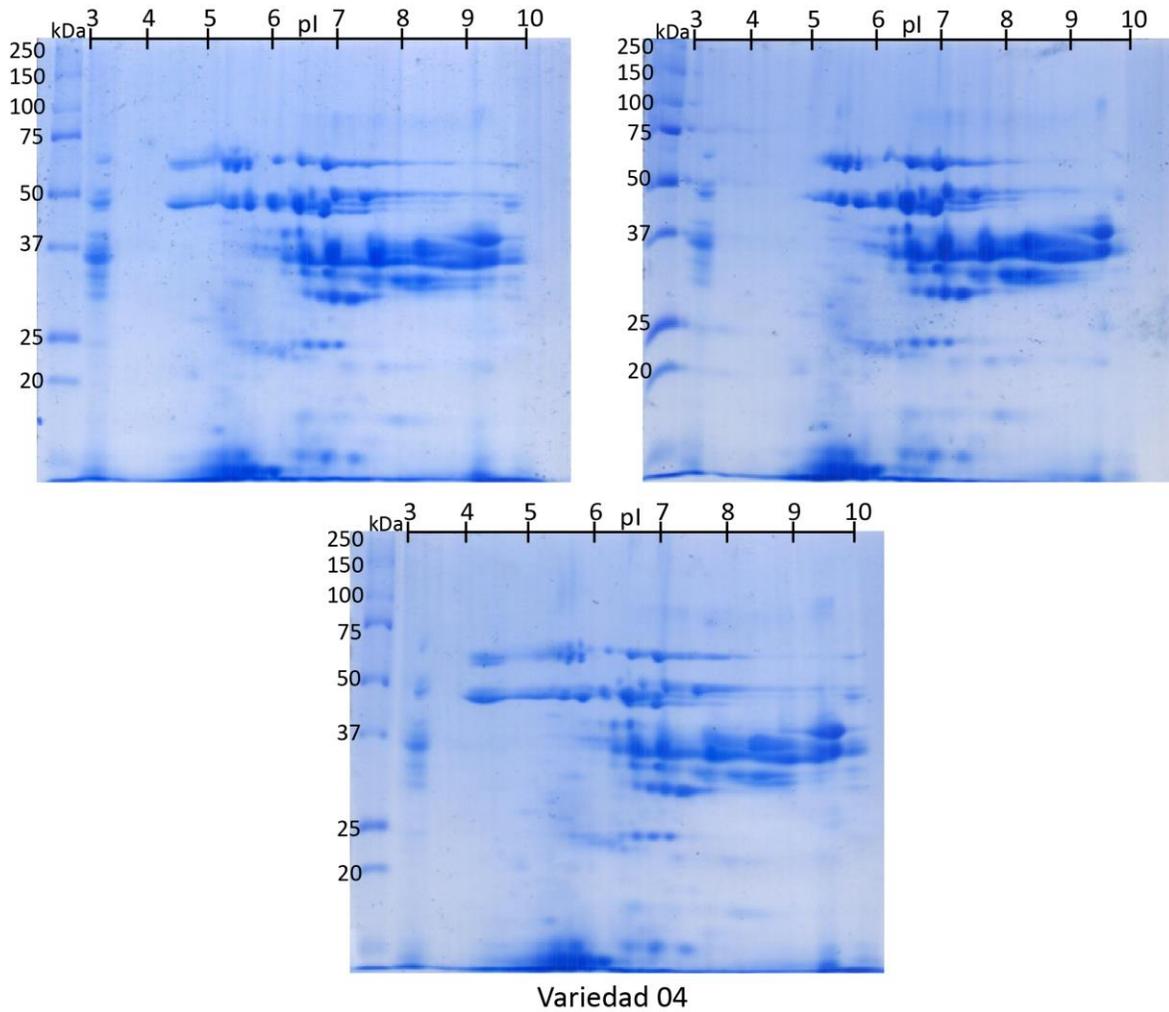


Figura 25. Triplicado de la separación electroforética en gel 2D de proteínas de la variedad 04.

12.2 Densitometría de las inmuno-réplicas tipo Western de la separación electroforética en geles 1D

Una vez que se estandarizaron las condiciones para el western-blot 1D se realizaron réplicas para poder hacer un análisis densitométrico de las diferentes bandas identificadas. A continuación se muestran dichas réplicas:

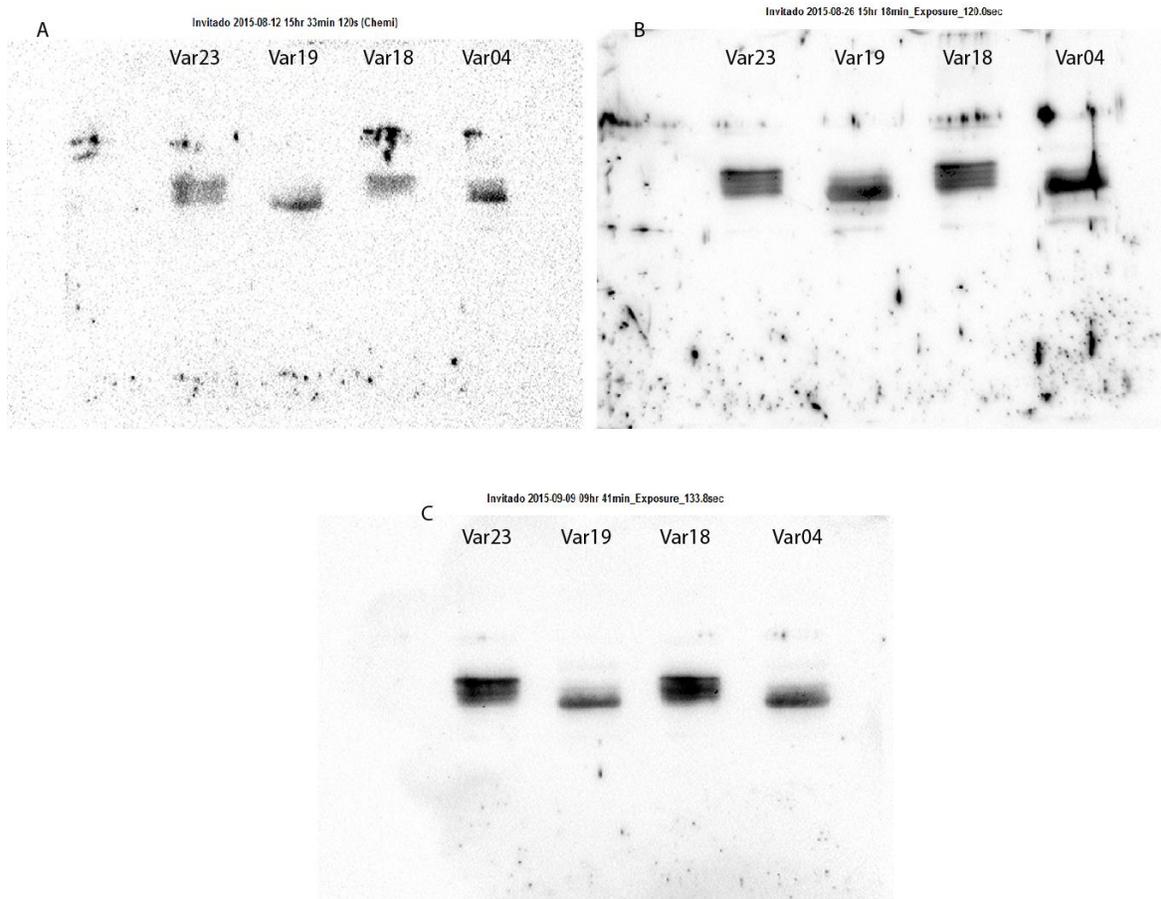


Figura 26. Inmuno-réplicas tipo Western de la separación electroforética 1D utilizadas para el análisis densitométrico de las bandas seleccionadas (37 kDa).

Los valores densitométricos fueron normalizados por la cantidad de proteína total de cada carril utilizando como referencia el gel control teñido por Coomassie de inmuno-réplica, mediante el software Image Lab 4.1 de Bio-Rad Laboratories, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 9. Valores densitométricos normalizados por cantidad total de proteína por carril.

var23	var19	var18	var04	Réplica
34,623,126	22,570,594	34,555,289	29,315,998	A
730,626,211	584,223,087	618,813,514	600,350,325	B
177,861,909	87,258,817	185,184,544	97,625,139	C

Una vez obtenidos los valores densitométricos normalizados (Tabla 9) se procedió a calcular las veces de cambio en la intensidad de cada variedad con respecto a la variedad 23, que el software automáticamente tomó como referencia por encontrarse en el carril inmediato al del marcador de peso molecular, para poder hacer comparables los valores entre réplicas.

Tabla 10. Veces de cambio promedio de la intensidad de las bandas de western-blot 1D.

	var23	var19	var18	var04	Réplica
Veces de cambio	1	0.6519	0.9980	0.8467	A
	1	0.7996	0.8470	0.8217	B
	1	0.4906	1.0412	0.5489	C
promedio	1.00	0.65	0.96	0.74	
Desv. Estándar	-	0.15	0.10	0.17	

Una vez que se obtuvieron los valores de veces de cambio promedio (Tabla 10) se procedió a realizar un análisis de varianza de un factor.

Tabla 11. Análisis de varianza de las veces de cambio en la intensidad de la banda seleccionada en en las inmuno-réplicas.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F crítica</i>
Entre grupos	0.2633	3	0.0878	5.6999	0.0219	4.0662
Dentro de los grupos	0.1232	8	0.0154			
Total	0.3864	11				

Dado que el valor calculado de F es mayor al valor de F crítica, se concluye que hay al menos una variedad que tiene una intensidad significativamente diferente a la de la variedad 23. Por los valores de densitometría y la dispersión de los datos se deduce que esta variedad es 19.

12.3 Secuencias de los péptidos identificados por espectrometría de masas

Se muestran a continuación las secuencias de los péptidos detectados por espectrometría de masas, alineados con la secuencia reportada de la hordeína correspondiente:

Hordeína C (HOR8_HORVU)

Digestión: Tripsina

FPQPQEPFPQQPQQPFPLQPQQPFPPQQPQQPFPPQQPQQPFRQQAELIIPQQPQQPFPLQPH

QPYTQQTIWSMV

-----<

----->

Péptido encontrado en mancha s3 var23, predicho por digestión in silico.

Hordeína C (HOR8_HORVU)

Digestión: Quimotripsina+Tripsina

FPQPQEPFPQQPQQPFPLQPQQPFPPQQPQQPFPPQQPQQPFRQQAELIIPQQPQQPFPLQPH

QPYTQQTIWSMV

-----> 3 <-----

-----> 4 <-----

-----> 1 <----- 2 <-----

Tabla 12. Péptidos encontrados de Hordeína C (HOR8_HORVU).

Mancha	Var	Péptido encontrado			
		1	2	3*	4
s3	23		✓	✓	
	19	✓	✓	✓	✓
s4	23		✓	✓	
	04		✓	✓	

*: Péptidos predichos por digestión in silico.

Hordeína C (*HOR7_HORVU*) Digestión: Quimotripsina+Tripsina

QPQQSYFVQPQQPFPPQPVPVQQRPQQASPLQPQQPFPPQGSEQIIPQQPFPLQPQPFPPQQ
 PQQPLPQPQQPFRQQAELIIPQQPQQPLPLQPHQPYTQQTIWSMV



Tabla 13. Péptidos encontrados de Hordeína C (*HOR7_HORVU*) por digestión con Q+T.

Mancha	Var	Péptido encontrado		
		1	2*	3
s1	23	✓	✓	
	04	✓	✓	✓
s3	23	✓	✓	
	19	✓	✓	✓
	04	✓	✓	
s4	19	✓	✓	

*: Péptido predicho por digestión in silico.

Hordeína C (*HORC_HORVS*) Digestión: Quimotripsina+Tripsina

RQLNPSSQELQSPQQSYLQQPYQPQNPYL

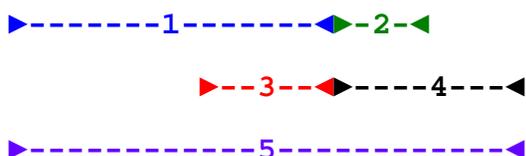


Tabla 14. Péptidos encontrados en Hordeína C (*HORC_HORVS*) por digestión Q+T.

Mancha	Var	Péptido encontrado				
		1	2	3*	4	5
s1	23	✓	✓	✓		
	04	✓			✓	
s3	23	✓	✓			
	19					✓
	04					✓
s4	23	✓			✓	
	19	✓				
	04					✓

*: Péptido predicho por digestión in silico.

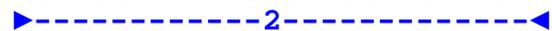
Hordeína B3 (HOR3_HORVU)

Digestión: Tripsina

QQPVSRQPQQIIPQQPQQPFPLQPQQPQQPFQQPPIPQQPQQPYPQQPQSFPQQPFPSQQPFP

QQPPFWQQQPVLSQQQPCTQDQTPLLQEQQDQMLVQVQIPFVHPSILQQLNPCKVFLQQQC


SPLAMSQRIARSQMLQQSSCHVLQQQCCQQLPQIPEQLRHEAVRAIVYSIVLQEQSLQLVQ




GVSQPQQQSQQQVVGQCSFQQPQPQQGQQQVQSVFQLQPHQIAQLEATTSIALRTLPTMC


SVNVPLYRIVPLAIDTRVGV

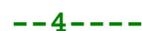




Tabla 15. Péptidos encontrados en Hordeína B3 por digestión con tripsina.

Mancha	Var	Péptido encontrado					
		1*	2*	3	4*	5*	6
s3	23		✓		✓	✓	
s5	23		✓	✓	✓	✓	✓
	19		✓	✓	✓	✓	✓
	04	✓	✓	✓	✓	✓	✓
s6	23	✓	✓	✓	✓	✓	
	19	✓	✓		✓	✓	
	04		✓	✓	✓	✓	

*: Péptidos predichos por digestión in silico.

Hordeína B3 (HOR3_HORVU)

Digestión: Quimotripsina+Tripsina

QQPVSRQPQQIIPQQPQQPFPLQPQQPQPFQQPPIPQQPQPYPQQPQSFPQQPFPSQQPFP

QQPFWQQQPVLSQQQPCTQDQTPLLQEQQDQMLVQVQIPFVHPSILQQLNPKVFLQQQC

▶--1-◀

▶-----2-----◀

SPLAMSQRIARSQMLQQSSCHVLQQCCQQLPQIPEQLRHEAVRAIVYSIVLQEQLVQ

▶-----◀

GVSQPQQQSQQQVVGQCSFQQPQPQQGQQQVQSVFLQPHQIAQLEATTSIALRTLPTMC

-----3-----▶-----4-----▶-----5-----

SVNVPLYRIVPLAIDTRGV

-----▶-----6-----▶

Tabla 16. Péptidos encontrados de hordeína B3 por digestión Q+T.

Mancha	Var.	Péptidos encontrados					
		1*	2	3	4*	5	6
s5	23	✓	✓	✓	✓	✓	
	19		✓	✓			
	04	✓	✓	✓	✓	✓	✓
s6	23		✓	✓			
	04		✓	✓	✓		

*: Péptidos predichos por digestión in silico.

Hordeína B1 (*HOR1_HORVU*) Digestión: Tripsina

MKTFLIFALLAIAATSTIAQQQPFPPQQPIPIQQPQYPYQQPQYPQQPFPPQQPFPPQQPVPQ

QQPYPQQPFPPQQPFPPQQPPFWQQKPFPPQQPPFGLQQPILSQQQPCTPQQTPLPQGQLYQ

TLLQLQIQYVHPSILQQLNPCVKVFLQQQCSPVPVPQRIARSQMLQQSSCHVLQQQCCQQLP

QIPEQFRHEAIRAIVYSIFLQEQPQQLVEGVVSQPQQQLWPQQVVGQCSFQQPQQVGGQQQ

VPQSAFLQPHQIAQLEATTSIARLTLPMCSVNVPLYRILRGVGPSVGV

Tabla 17. Péptidos de Hordeína B1 encontrados por digestión con tripsina.

Mancha	Var	Péptido encontrado		
		1	2*	3*
s5	04	✓	✓	✓
s6	23		✓	

*: Péptidos predichos por digestión *in silico*.

Hordeína γ1 (*HOG1_HORVU*) Digestión: Tripsina

MKILIIILTIILAMATTFATSEMQVNPVSVQVQPTQQQPYPESQQPFISQSQQQFPQPQQPFP

QQPQQPFPQSQQQCLQQPQHQFPQPTQQFPPQRPLLPTHPFLTFPDQLLPQPPHQSFPQP

PQSYPPQPLQPFPPQPPQKYPEQPQQPFPWQQPTIQLYLQQQLNPCKEFLQCRPVSL

SYIWSKIVQQSSCRMQQCCCLQLAQIPEQYKCTAIDSIVHAIFMQQGQRQGVQIVQQQP

QPQQVVGQCVLVQGGVQVQPQQLAQMEAIRTLVLQSVPSMCNFNVPNCSTIKAPFVGVVT

GVGGQ

Péptidos encontrados en la mancha s5 var23, todos predichos por digestión *in silico*.

Hordeína γ 1 (*HOG1_HORVU*)

Digestión: Quimotripsina+Tripsina

MKILIIILTILAMATTFATSEMQVNPSVQVQPTQQQPYPESQQPFISQSQQQFPQPQQPFP

QQPQQPFPQSQQQCLQQPQHQFPQPTQQFPQRPLLPTHPFLTFPDQLLPQPPHQSFPQP

PQSYQPPLQPFPQPPQQKYPEQPQQPFPWQQPTIQLYLQQQLNPKKEFLLQQCRPVSL

▶-----1-----◀

SYIWSKIVQQSSCRMQQQCCLQLAQIPEQYKCTAIDSIVHAIQFMQQGQRQGVQIVQQQP

▶-----2-----◀

QPQQVGGQCVLVQGGVVQPQQLAQMEAIRTLVLQSVPSMCFNVPPNCSTIKAPFVGVVT

▶-----3-----◀

GVGGQ

-4--◀

Péptidos encontrados en la mancha s5 var23, los péptidos 3 y 4 fueron predichos por digestión in silico.

13 Referencias

- Agrawal, G. K., & Thelen, J. J. (2009). A High-Resolution Two Dimensional Gel- and Pro-Q DPS-Based Proteomics Workflow for Phosphoprotein Identification and Quantitative Profiling. En M. De Grauw, *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols* (págs. 3-19). Humana Press.
- Agrawal, G. K., Timperio, A. M., Zolla, L., Bansal, V., Shukla, R., & Rakwal, R. (2013). Biomarker discovery and applications for food and beverages: Proteomics to nanoproteomics. *Journal of Proteomics*(93), 74-92. doi:10.1016/j.jprot.2013.04.014
- Aguado-Santacruz, G. A. (2008). Recuperado el 26 de enero de 2016, de Obtención de materiales de cebada tolerantes al estrés hídrico mediante variación somaclonal: <http://www.intranetfgp.com/SIAC/2007/366-05/Informe%20Final/Informe%20Final.pdf>
- Anderson, O. D. (2013). The B-hordein prolamin family of barley. *Genome*, 56, 179-185. doi:10.1139/gen-2013-0016
- Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H., . . . Salamini, F. (2000). On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499-510.
- Bleidere, M., & Grunte, I. (2009). Hordein diversity in spring barley genotypes related to crude protein content. *LLU Raksti*, 22(317), 89-99.
- Cameron-Mills, V., & Brandt, A. (1988). A gamma-hordein gene. *Plant Molecular Biology*, 11, 449-461.
- Chandra, G. S., Proudlove, M. O., & Baxter, E. D. (1999). The structure of barley endosperm - An important determinant of malt modification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 37-46.
- Colgrave, M. L., Goswami, H., Howitt, C. A., & Tanner, G. J. (2012). What is in a beer? Proteomic characterization and relative quantification of hordein (gluten) in beer. *Journal of Proteome Research*, 11, 386-396.
- Colgrave, M. L., Goswami, H., Howitt, C. A., & Tanner, G. J. (2013). Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. *Food Research International*(54), 1001-1012. doi:10.1016/j.foodres.2012.09.043
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 369-374.

- Dai, H., Zhang, X.-Q., Harasymow, S., Roumeliotis, S., Broughton, S., Eglinton, J., . . . Li, C. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry provides an efficient approach to monitoring protein modification in the malting process. *International Journal of Mass Spectrometry*, 371, 8-16.
- Evans, D. E., & Bamforth, C. W. (2009). Beer foam: achieving a suitable head. En C. W. Bamforth, *Beer: A quality perspective* (págs. 16-17). USA: Academic Press.
- Fernández-Vera, Z. (2013). Recuperado el 26 de Enero de 2016, de 4° Congreso Latinoamericano de Cebada:
<http://congresocebada.files.wordpress.com/2012/10/31-10-13-2-nuevas-variedades-de-cebada-cervecera-adaptadas-a-mc3a9xico.pdf>
- Ferrán-Lamich, J. (1959). *Cebada, variedades cerveceras y cerveza*. Barcelona, España: Aedos.
- Finnie, C., & Svensson, B. (2009). Barley seed proteomics from spots to structures. *Journal of Proteomics*, 72, 315-324.
doi:10.1016/j.jprot.2008.12.001
- Galarza-Mercado, J. M. (2006). Recuperado el 25 de enero de 2016, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera:
http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Cebada1995-2007.pdf
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. (2010). Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and application of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 310-328.
- Han, Z. X., Qian, G., Wu, F., Pan, Z. F., Deng, G. B., & Yu, M. Q. (2008). Sequences variation and classification of B-hordein genes in hull-less barley from the Qinghai-Tibet Plateau. *Molecular Biology*, 42(1), 56-63.
doi:10.1134/S0026893308010081
- Hassan-Benasayag, S., & Molina-Cano, J. L. (1989). Fabricación de malta y cerveza, calidad cerveceras de la malta. En J. L. Molina-Cano (Ed.), *La cebada* (págs. 199-212). Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Hill, A. E. (2009). Microbiological stability of beer. En C. W. Bamforth (Ed.), *Beer: A quality perspective* (págs. 163-180). EEUU: Academic Press.

- Holopainen, U. R., Wilhelmson, A., Home, S., Poutanen, K., & Shewry, P. R. (2012). Day-length effects on protein localisation affect water absorption in barley (*Hordeum vulgare*) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2944-2951. doi:10.1002/jsfa.5706
- Hoseney, R. C. (1994). *Principles of cereal science and technology*. 2nd ed. USA: American Association of Cereal Chemists, Inc. .
- Howard, K. A., Gayler, K. R., Eagles, H. A., & Halloran, G. M. (1996). The relationship between D Hordein and malting quality in barley. *Journal of Cereal Science*, 24, 47-53.
- Limure, T., & Sato, K. (2013). Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International*, 54, 1013-1020. doi:10.1015/j.foodres.2012.11.028
- Jelezova, M. K. (2014). *Expresión de marcadores moleculares para mejoramiento de cebada maltera durante el desarrollo de semilla (Tesis de licenciatura)*. Facultad de Química. Ciudad de México: UNAM.
- Jin, B., Li, L., Feng, Z.-C., Li, B., Liu, G.-Q., & Zhu, Y.-K. (2011). Investigation of hordeins during brewing and their influence on beer haze by proteome analysis. *Journal of Food Biochemistry*(35), 1522-1527. doi:10.1111/j.1745-4514.2010.00474.x
- Kirin. (10 de Agosto de 2015). Recuperado el 25 de Noviembre de 2015, de Kirin Beer University Report: Global Beer Production by Country in 2014: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/0810_01.html
- Kleinwächter, M., Meyer, A.-K., & Selmar, D. (2012). Malting revisited: Germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) is inhibited by both oxygen deficiency and high carbon dioxide concentrations. *Food Chemistry*, 132, 476-481. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.027
- Larkins Lab. (2003). *Protein extraction from flour*. Obtenido de <http://www.ag.arizona.edu/research/larkinslab/protocols/protein%20extraction%20from%20flour.pdf>
- Molina-Cano, J. L. (1989). Taxonomía. Citología. Origen filogenético. En J. L. Molina-Cano (Ed.), *La cebada* (págs. 19-23). Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2007). Recuperado el 24 de enero de 2016, de INPhO: Información sobre

operaciones de poscosecha: [http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es/?page=2&ipp=7&no_cache=1&tx_dynalist_pi1\[par\]=YToxOntzOjE6IkwiO3M6MToiMil7fQ==](http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es/?page=2&ipp=7&no_cache=1&tx_dynalist_pi1[par]=YToxOntzOjE6IkwiO3M6MToiMil7fQ==)

- Pistón, F., Shewry, P. R., & Barro, F. (2007). D hordeins of *Hordeum chilense*: a novel source of variation for improvement of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *115*, 77-86. doi:10.1007/s00122-007-0542-0
- Qi, J.-C., Zhang, G.-P., & Zhou, M.-X. (2006). Protein and hordein content in barley seeds as affected by nitrogen level and their relationship to beta-amylase activity. *Journal of Cereal Science*(43), 102-107. doi:10.1016/j.jcs.2005.08.005
- Rabilloud, T. (2014). Paleoproteomics explained to youngsters: how did the wedding of two-dimensional electrophoresis and protein sequencing spark proteomics on: Let there be light. *Journal of Proteomics*, *107*, 5-12. doi:10.1016/j.jprot.2014.03.011
- Rechinger, K. B., Bougri, O. V., & Cameron-Mills, V. (1993). Evolutionary relationship of the members of the sulphur-rich hordein family revealed by common antigenic determinants. *Theoretical and Applied Genetics*(85), 829-843.
- Rechinger, K., Simpson, D., Svendsen, I., & Cameron-Mills, V. (1993). A role for gamma3 hordein in the transport and targeting of prolamin polypeptides to the vacuole of developing barley endosperm. *The Plant Journal*, *4*(5), 841-853.
- Rosenegger, D., Wright, C., & Lukowiak, K. (2010). A quantitative proteomic analysis of long-term Memory. *Molecular Brain*, *3*(9). Obtenido de <http://www.molecularbrain.com/content/3/1/9>
- SAGARPA. (2014). Recuperado el 26 de Enero de 2016, de Mejora INIFAP variedad de cebada malteada tolerante a la roya y con mayor rendimiento.: <http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B006.aspx>
- Salgado-Albarrán, M. (2015). *Análisis de hordeínas en semilla y malta de diferentes variedades de cebada (Tesis de licenciatura)*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Salgado-Albarrán, M., Herrera-Díaz, J., & Dinkova, T. D. (2015). Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *18*(1), 43-51.

- Schmidt, D., Rizzi, V., Gaziola, S. A., Medici, L. O., Vincze, E., Kozak, M., . . . Azevedo, R. A. (2015). Lysine metabolism in antisense C-hordein barley grains. *Plant Physiology and Biochemistry*(87), 73-83. doi:10.1016/j.plaphy.2014.12.017
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 947-958.
- Shewry, P. R., Napier, J. A., & Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 945-956.
- Shewry, P. R., Parmar, S., Franklin, J., & White, R. (1988). Mapping and biochemical analysis of Hor 4 (Hrd G), a second locus encoding B hordein seed proteins in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genetical Research*, 51, 5-12. doi:10.1017/S00166
- Snégaroff, J., Bouchez, I., Amine Smaali, M. E., Pecquet, C., Raison-Peyron, N., Jolivet, P., & Lauriere, M. (2013). Barley gamma3-hordein: Glycosilation at an atypical site, disulfide bridge analysis, and reactivity with IgE from patients allergic to wheat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834, 395-403. doi:10.1016/j.bbapap.2012.07.016
- Solano-Hernández, S., & Zamora-Díaz, M. (2009). Alina, nueva variedad de cebada maltera para riego en el Bajío. *Agricultura Técnica en México*, 34(4), 467-469.
- Taner Akar, M. A. (2004). *INPhO: Información sobre operaciones de poscosecha*. (F. Danilo Mejía, Ed.) Recuperado el 24 de enero de 2016, de <http://www.fao.org/3/a-au997e.pdf>
- Tanner, G. J., Howitt, C., Forrester, R. I., Campbell, P. M., Tye-Din, J. A., & Anderson, R. P. (2010). Dissecting the T-cell response to hordeins in coeliac disease can develop barley with reduced immunotoxicity. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32, 1184-1191. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04452.x
- Tan-Wilson, A. L., & Wilson, K. A. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*(145), 140-153.
- Tatham, A. S., & Shewry, P. R. (2012). The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *Journal of Cereal Science*(55), 79-99.

- Yin, Y., Ma, D., & Ding, Y. (2003). Analysis of genetic diversity of hordein in wild close relatives of barley from Tibet. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 837-842.
- Zamora Díaz, M., Solano Hernández, S., Garza García, R., Islas Gutiérrez, J., Huerta Zurita, R., & López Cano, M. (2010). Armida, nueva variedad de cebada maltera para riego en el Bajío. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(5), 723-726.
- Zamora Díaz, M., Solano Hernández, S., Gómez Mercado, R., Rojas Martínez, I., Ireta Moreno, J., Garza García, R., & Ortiz Trejo, C. (2008). Adabella: variedad de cebada maltera para valles altos de la mesa central de México. *Agricultura Técnica en México*, 34(4), 491-493.
- Zohary, D. (1969). The progenitors of wheat and barley in relation to domestication and agriculture dispersal in the Old World. En P. y. Ucko, *The domestication and exploitation of plants and animals* (págs. 47-66). Londres: Duckworth.
- Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford: Oxford.
doi:10.1093/acprof:osobl/9780199549061.001.0001