



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Efecto del deterioro del trigo (*Triticum aestivum*) sobre
sus proteínas de reserva evaluando su perfil
electroforético”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

OMAR JACINTO CRESCENCIO

**ASESOR: DR. ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE
COASESORA: I.A VERÓNICA JIMÉNEZ VERA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de Granos de la FES Cuautitlán, UNAM, con el apoyo del Programa PIAPI-1606.

Agradecimientos

Durante este lapso de vida he conocido a un gran número de personas con las que he compartido tiempo, espacio y experiencias, sin embargo muy pocas han estado conmigo incondicionalmente, en las buenas, en las malas y en las mejores. A estas personas que están dejando huella en mi vida, a ellas les dedico este proyecto, que si bien fue un gran un gran reto personal, en la que pase desveladas, hambre, estrés, miedo, incertidumbre... ha sido la etapa más increíble en lo que llevo de vida!

Y bien, al primero que quiero agradecer es a mi amigo cuántico... Dios. El estar en el ámbito científico te hace cuestionarte sobre si existe o no, sin embargo todos los días al despertar me doy cuenta que la vida es hermosa cuando tienes a algo o alguien en quien creer.

Aunque quisiéramos que la felicidad fuera un estado estático en la vida, lamentable o afortunadamente no es así. Y cuando compartes el techo y la comida día a día con el mismo grupo de personas las diferencias salen a flote. Pero todo lo malo se soluciona cuando buscas en el fondo de esas personas y comprendes el amor que tienen hacia ti y viceversa. Lo anterior hace referencia a mi familia, que si bien no somos una familia modelo es perfecta para mí.

Gracias:

A mi madre por hacerme ver lo importante que es brindar amor y felicidad a los que te rodean. También gracias a ella aprendí a cocinar y ahora no me puedo morir de hambre jajaja.

A mi padre por enseñarme el valor que tiene el trabajo y el esfuerzo. Somos muy parecidos y por eso a veces chocamos, sin embargo es el hombre que más admiro.

A mis hermanos Miguel y Laura (por que no pedo escribir groserías jajaja) ambos tienen mucho de mí... aprovechenlo! Jajaja Sé que no he sido el mejor ejemplo a seguir, y lo único que les puedo decir es que se aferren a sus sueños y créansela, futuros ingenieros.

A mis amigos, pff tengo muchísimos pero solo nombrare a los que son casi mis hermanos (digo "casi" porque ellos están feos y yo no jajaja). Jesús Fernando Vázquez Prado (alias "El Morado) y Julio Jacinto (alias "El Guama"), gracias por todas las locuras que hemos hecho.

A los culpables que me guiaron al camino del mal (comúnmente llamado Bioquímica). Profesora Guadalupe, que me impartió química en la secundaria. Maestro José Lizarde y al Doctor Bertin Elguea, del taller de bioquímica y la materia de biología durante la preparatoria. Al Doctor Ricardo Santiago Días que me impartió bioquímica y biología molecular durante la universidad. Al Doctor Enrique Martínez Manrique y a la Ingeniera Verónica Jiménez Vera, mis asesores de tesis, por aceptarme en su grupo de trabajo y apoyarme en mi desarrollo profesional. A todos mil gracias por inspirarme en este camino.

Y por ultimo pero no menos importante a todo aquello que me dio fuerzas para seguir adelante. A la universidad más hermosa de todas UNAM, a la cultura Skinhead de la que siempre estaré orgulloso pertenecer, a Iron man (siempre será mejor que el capitán américa), a la música de Roy Ellis, Alton Ellis, Kaos Urbano, Jamaica 69, Oi! The arrase, The Skatalites, Rancid, LNG/SHT, AC-DC, a las botas Doc. Marten's, a las galletas "príncipe" (mi alimento durante 5 años), a las tortas gigantes y a los chicharrones que venden fuera de la FES.

¡A TOD@S GRACIAS!

Índice

Índice de figuras	IV
Índice de tablas	V
Resumen	1
Capítulo 1 Introducción	2
1.1 Origen e historia del trigo.	2
1.1.2 Descripción taxonómica y morfología del trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	3
1.1.3 Estructura y clasificación del grano de trigo	4
1.2 Distribución geográfica mundial del trigo	5
1.2.1 Importancia del cultivo a nivel nacional	7
1.3 Valor nutricional	9
1.3.1 Composición química	10
1.3.1.2 Hidratos de carbono	10
1.3.1.3 Proteínas	11
1.3.1.4 Lípidos	11
1.3.1.5 Vitaminas y minerales	12
1.4 Productos derivados del trigo	13
1.5 Proteínas industrialmente relevantes del grano de trigo	14
1.5.1 Puroindolinas	14
1.5.2 Prolaminas	14
1.5.3 Gluten	15
1.5.4 Gliadinas	16
1.5.5 Gluteninas	17
1.6 Factores que alteran la calidad del grano de trigo y sus proteínas	19
1.6.1 Físicos	19

1.6.1.1 Humedad	19
1.6.1.2 Temperatura	19
1.6.2 Químicos	20
1.6.3 Biológicos	21
1.7 Métodos para la extracción de proteínas	21
1.7.1. Osborne	21
1.7.1.2 Precipitación con sulfato de amonio	22
1.7.2 Técnicas para la identificación y cuantificación de proteínas	23
1.7.2 .1 Lowry	23
1.7.2.2 Biuret	24
1.7.2.3 Método de Bradford	25
1.7.3 Técnicas utilizadas en el análisis de proteínas	26
1.7.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular	26
1.7.3.2 Espectrofotometría	26
1.8 Electroforesis	27
1.8.1 Tipos de electroforesis	27
1.8.1.2 Fundamento de la electroforesis	28
1.8.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	29
1.8.1.4 Formación del gel de poliacrilamida	29
1.8.1.5 Electroforesis SDS-PAGE	31
1.8.1.6 Análisis del producto de la electroforesis	33
1.8.1.7 Factores que afectan la electroforesis	34
1.9 Objetivos	35

Capítulo 2. Metodología experimental	36
2.1 cuadro metodológico	36
2.2 Materiales y métodos	37
2.3 Determinación de grado de deterioro por germinación.	37
2.3.1 Determinación de humedad de las semillas	38
2.3.2 Conductividad.	38
2.3.3 Molienda de harinas	39
2.3.4 Extracción de gluten	39
2.3.5 Índice de sedimentación	40
2.4 Extracción de proteínas	41
2.4.1 Cuantificación de proteínas	42
2.5 Perfil electroforético	43
2.6 Análisis estadístico	43
Capítulo 3 Resultados y discusión	44
3.1 Determinación del grado de deterioro acelerado porcentaje de germinación	44
3.1.2 Determinación de los μ s de conductividad	44
3.1.3 Determinación del porcentaje de humedad	45
3.2 Porcentaje de gluten	46
3.3 Sedimentación con SDS	47
3.4 Cuantificación de proteínas a partir de harina de trigo	48
3.4.1 Cuantificación de proteínas a partir de gluten húmedo	49
3.4.2 Cuantificación de proteínas a partir de gluten seco	50
3.5 Perfiles electroforéticos	51
3.5.1 Evaluación de harinas: albuminas y globulinas	51
3.5.2 Evaluación de harinas: gliadinas y gluteninas	53
3.5.3 Evaluación de Gluten húmedo: gliadinas y gluteninas	54
3.5.4 Evaluación de gluten seco: gliadinas y gluteninas	56
3.6 Análisis estadístico	56
Conclusiones	58
Recomendaciones	60
Referencias	61

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de la planta de trigo	4
Figura 2. Estructura del grano de trigo	4
Figura 3. Principales productores de trigo a nivel mundial	6
Figura 4. Principales consumidores de trigo a nivel mundial	7
Figura 5. Producción nacional de trigo	8
Figura 6. Composición del gluten	16
Figura 7. Estructura molecular de la gliadina	17
Figura 8. Estructura molecular de la glutenina	18
Figura 9. Reacción entre las proteínas y el reactivo de Folin	24
Figura 10. Reacción de proteína con reactivo de Biuret	25
Figura 11. Colorante Coomassie forma complejos	26
Figura 12. Equipo electroforético	27
Figura 13. Partes de un gel de SDS-PAGE	29
Figura 14. Reacción de polimerización de la acrilamida	30
Figura 15. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida	32
Figura 16. Sistema discontinuo	33
Figura 17. Cuadro metodológico	36
Figura 18. Trigo almacenado a 25 c y 75% HR	37
Figura 19. Prueba de germinación del grano de trigo	37
Figura 20. Molienda del grano	39
Figura 21. Medición del índice de sedimentación de harinas	40
Figura 22. Extracción de proteínas por el método de Osborne	41
Figura 23. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	42
Figura 24. Análisis electroforético por el método SDS-PAGE	43
Figura 25. Gel correspondiente a las muestras obtenidas de la harina de trigo	52
Figura 26. Gel correspondiente a las muestras obtenidas de la harina de trigo	53
Figura 27. Gel correspondiente a las muestras obtenidas a partir de gluten húmedo	55

Figura 28. Gel correspondiente a las muestras obtenidas a partir de gluten seco . . . 56

Índice de tablas

Tabla 1. Composición nutricional del grano de trigo	9
Tabla 2. Composición química de las diferentes partes del grano de trigo	12
Tabla 3. Productos derivados del trigo	13
Tabla 4. Proteínas presentes en las fracciones de Osborne	22
Tabla 5. Análisis de porcentaje de germinación, conductividad y humedad	45
Tabla 6. Porcentaje de gluten	46
Tabla 7. Determinación del índice de sedimentación	47
Tabla 8. Cuantificación de proteínas a partir de harina de trigo	49
Tabla 9. Cuantificación de proteínas a partir de gluten húmedo	50
Tabla 10. Cuantificación de proteínas a partir de gluten seco	51
Tabla 11. Análisis de proteínas en harinas: Albuminas y Globulinas	52
Tabla 12. Análisis de proteínas en harinas: Gliadinas y Gluteninas	54
Tabla 13. Análisis de proteínas en Gluten húmedo: Gliadinas y Gluteninas	55
Tabla 14. Análisis de proteínas en Gluten seco: Gliadinas y Gluteninas	57

Resumen

La harina de trigo es el componente más importante en todos los productos de panificación; sus constituyentes químicos afectan la funcionalidad y las características del producto terminado. La compleja composición química de la harina de trigo trae como consecuencia numerosos procesos físicos y bioquímicos que son parámetros fundamentales para la formación del pan. El trigo debe pasar por etapas conocidas como tratamientos post-cosecha en donde el principal factor que debe controlarse en el almacenamiento es el porcentaje de humedad, el cual debe estar entre 11 y 14%. Se calcula que en América Latina las pérdidas durante el almacenamiento son de aproximadamente 25%, debido a problemas climáticos que dificultan la reducción de la humedad del grano (Evans, 2001). Investigaciones anteriores han puesto de manifiesto que el mal almacenamiento, así como el tiempo que el grano este expuesto a este medio inadecuado (25 °C y 75 % humedad relativa) favorece a su deterioro prematuro, teniendo como consecuencia una alteración en la extensibilidad y la fuerza de la masa así como la viscosidad y elasticidad. Por esto, se planteó evaluar por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) si el deterioro de trigo afecta sus proteínas de reserva industrialmente relevantes (gluten).

Se utilizó grano de trigo de la variedad HRW cosecha 2014 el cual se almacenó a 25°C y 75%HR durante 0, 60, 120 y 160 días para su deterioro, analizado por medio del porcentaje de germinación. Se evaluó el grano de trigo y su harina utilizando la prueba de humedad y conductividad para visualizar modificaciones en el grano y sedimentación con SDS para evaluar la calidad de la harina. Se obtuvo el gluten por el método de lavado y se extrajeron sus proteínas por el método de Osborne, de esta forma se separaron las fracciones proteicas de la harina y del gluten de trigo, correspondientes a: albuminas, globulinas, gliadinas y gluteninas. Se determinó la concentración a la que se encuentran estas proteínas por el método de Lowry utilizando espectrofotometría de luz visible leyendo a 750 nm, observando que la concentración de proteínas se ve afectada por el deterioro. Se evaluó el perfil electroforético de las proteínas en geles de poliacrilamida al 10 %, concluyendo que el deterioro del grano de trigo produce modificaciones estructurales en el perfil electroforético de las gliadinas y gluteninas, visualizado por la pérdida de subunidades proteicas por parte de las gliadinas y ganancia de subunidades por parte de las gluteninas en comparación con el trigo sano.

1 Introducción

1.1 Origen e historia del trigo.

En la antigüedad la diosa griega Demeter, que significa señora, era considerada la diosa de la alimentación, en particular del pan y la agricultura. En la mitología romana su equivalente es Ceres, derivando de esta el nombre cereal. Los cereales se han considerado históricamente como el eje de la agricultura y la fuente más productiva de alimentos. La mayor parte de la energía que consume el hombre proviene de los cereales, tales como trigo, arroz y maíz, de todos estos, se considera que el trigo es el más abundante y productivo (Serna- Saldivar, 2009).

El trigo es uno de los cereales que más aparece en la cultura occidental. Su origen se remonta a la antigua Mesopotamia; las evidencias más antiguas provienen de Siria, Iraq y Jordania. Existen hallazgos de restos de grano de trigo que datan del año 6700 a. C. Fue introducido por los españoles a México en el año 1520 y luego llevado a sus demás colonias (Gómez *et al.*, 2007).

Por muchos años el pan ha sido uno de los principales constituyentes de la dieta humana, elaborar pan de masas fermentadas con levaduras es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos. El trigo es por mucho el cereal más importante en la elaboración de pan, aunque en algunas partes del mundo el uso de centeno es bastante considerable, otros cereales son usados en menor medida (Goesaert *et al.*, 2005).

En México el trigo harinero (*Triticum aestivum*) se clasifica de acuerdo a su calidad industrial en trigo de textura semidura a dura y gluten fuerte y extensible (grupo 1), de textura dura a semidura y gluten medio fuerte y extensible (grupo 2), de textura suave y gluten débil y extensible (grupo 3) y trigo de gluten tenaz poco extensible (grupo 4). Estas propiedades reológicas del gluten permiten diversificar su utilización en la industria de la panificación, galletera y repostería (Martínez *et al.*, 2007).

1.1.2 Descripción taxonómica y morfología del trigo (*Triticum aestivum*).

El trigo es una de las plantas más ampliamente cultivadas en el mundo. Es una gramínea anual, de la familia del césped, con espigas de cuyos granos molidos se obtiene la harina. Con respecto a la clasificación biológica las tres principales especies cultivadas son *Triticum aestivum*, a la cual pertenecen la mayor parte de las variedades; *T. Compactum* y *T. Durum*, este último pertenece a la clase de trigo duro. (Corella, 2002).

El trigo crece en ambientes con las siguientes características:

Temperatura mínima de 3 °C y máxima de 30 a 33 °C, siendo la temperatura óptima entre 10 y 25 °C, requiere una humedad relativa entre 40 y 70%; desde el espigamiento hasta la cosecha es la época que tiene mayores requerimientos en este aspecto, ya que exige una humedad relativa entre el 50 y 60% y un clima seco para su maduración, tiene unos bajos requerimientos de agua, ya que se puede cultivar en zonas donde caen precipitaciones entre 25 y 2800 mm anuales de agua, aunque un 75% del trigo crece entre los 375 y 800 mm/ciclo, los mejores suelos para su crecimiento deben ser sueltos, profundos, fértiles y libres de inundaciones, y deben tener un pH entre 6,0 y 7,5; en terrenos muy ácidos es difícil lograr un adecuado crecimiento (SAGARPA, 2005).

Las partes de la planta de trigo se pueden describir en la figura 1:

1- Inflorescencia: es una espiga compuesta por un tallo central de entrenudos cortos, sobre el cual van dispuestas 20 a 30 espiguillas en forma alterna y compacta, llevando cada una nueve flores, rodeadas por glumas, glumillas y glomélulas. Los granos son carióspsides que presentan forma ovalada con sus extremos redondeados.

2-Hojas: tienen forma lineal lanceolada (alargadas, rectas y terminadas en punta) con vaina, lígula y aurículas.

3-Tallo: es una caña hueca con 6 nudos que se alargan hacia la parte superior, alcanzando entre 0,5 a 2 metros de altura.

4-Raíz: es fasciculada con numerosas ramificaciones, las cuales alcanzan en su mayoría una profundidad de 25 cm, llegando algunas de ellas hasta un metro de profundidad (SAGARPA, 2005).

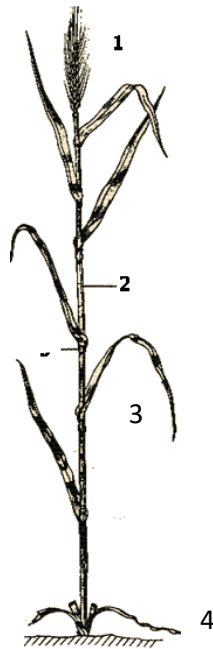


Figura 1. Morfología de la planta de trigo, 1- inflorescencia y grano, 2 tallo, 3 hoja, 4 raíz.
 Fuente: CANIMOLT (2017).

1.1.2 Estructura y clasificación del grano de trigo

El grano de trigo tiene forma ovalada y sus extremos redondeados, sobresaliendo el germen en uno de ellos y en el otro, un mechón de pelos finos (pincel). El resto del grano, denominado endospermo, es un depósito de alimentos para el embrión, que representa el 82% del peso del grano. A lo largo de la cara ventral del grano hay una depresión (surco) una invaginación de la aleurona y todas las cubiertas (Serna-Saldiva, 2009). (Figura 2).

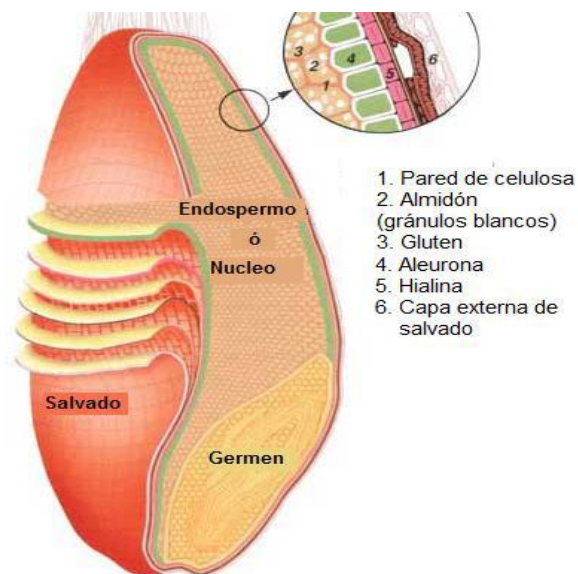


Figura 2: Estructura del grano de trigo, Fuente: Veggie Meat (2016)

En el fondo del surco hay una zona vascular fuertemente pigmentada. El pericarpio y la testa, juntamente con la capa aleurona, conforman el salvado de trigo. El grano de trigo contiene una parte de la proteína que se llama gluten.

A nivel general, el trigo se clasifica de acuerdo a la textura del endospermo, porque esta característica del grano está relacionada con su forma de fraccionarse en la molturación, la cual puede ser vítrea o harinosa, y de acuerdo a la riqueza proteica, porque las propiedades de la harina y su conveniencia para diferentes objetivos, están relacionadas con esta característica.

En México los trigos se clasifican de acuerdo a su funcionalidad en fuertes, medio fuertes, suaves, tenaces y cristalinos.

Los trigos más importantes para el comercio son el *Triticum durum* (utilizado principalmente para pastas y macarrones), el *Triticum aestivum* (utilizado para elaborar pan) y el *Triticum compactum* (se utiliza para hacer galletas) (SAGARPA 2005).

1.2 Distribución geográfica mundial del trigo.

El consumo mundial de trigo durante el ciclo 2014/15 fue de 701.52 millones de toneladas, una cifra récord a la fecha, superior en 1.51 por ciento al consumo del año anterior. Las estimaciones de consumo para 2015/16 sitúan a este en 714.81 millones de toneladas. El dinamismo del consumo se atribuye al consumo de países en desarrollo al igual que a las preferencias de los consumidores por el trigo como sustituto de cereales como el maíz. Otro importante factor que está impulsando el consumo de trigo a nivel global es el crecimiento de la demanda de este cereal para uso forrajero. De esta forma, para el resto del ciclo 2015/16 se espera un escenario mundial de altos niveles de producción y con un precio internacional en niveles relativamente bajos, comparado con los últimos años (Bloomberg Bussines, 2015).

La producción mundial de trigo, durante el periodo 2005/06-2014/15 (Figura 3), creció a una tasa promedio de 1.78 por ciento, para llegar a 732 millones de toneladas, principalmente por aumentos de la producción en la Unión Europea y Rusia, compensando las reducciones en Canadá y la India. Durante el ciclo 2014/15, la producción aumentó 1.40 por ciento con respecto al ciclo 2013/14, para llegar a 725 millones de toneladas. Mientras que para el año agrícola 2015/16, se espera un incremento ligeramente inferior, de 1.08 por ciento, para cerrar en un nivel récord de 733 millones de toneladas. Este aumento esperado se debe a la expectativa de mayores cosechas en Australia, China, Unión Europea y Ucrania, pese a una menor producción esperada en la India (FAO, AMIS, Market Monitor, 2015).

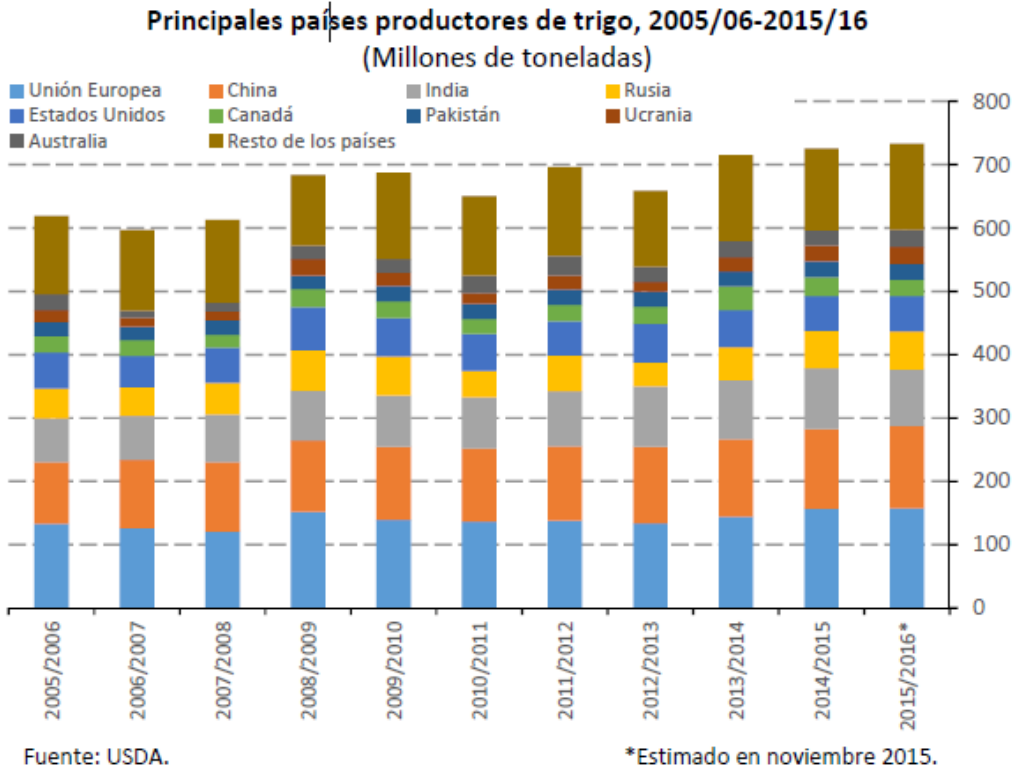


Figura 3. Principales productores de trigo a nivel mundial Fuente: USDA (2015).

Los cinco principales países consumidores de trigo, con respecto al consumo total mundial se muestran en la figura 4: Unión Europea (18 por ciento), China (17 por ciento), India (13 por ciento), Rusia (5 por ciento) y Estados Unidos (5 por ciento) (USDA, 2015).

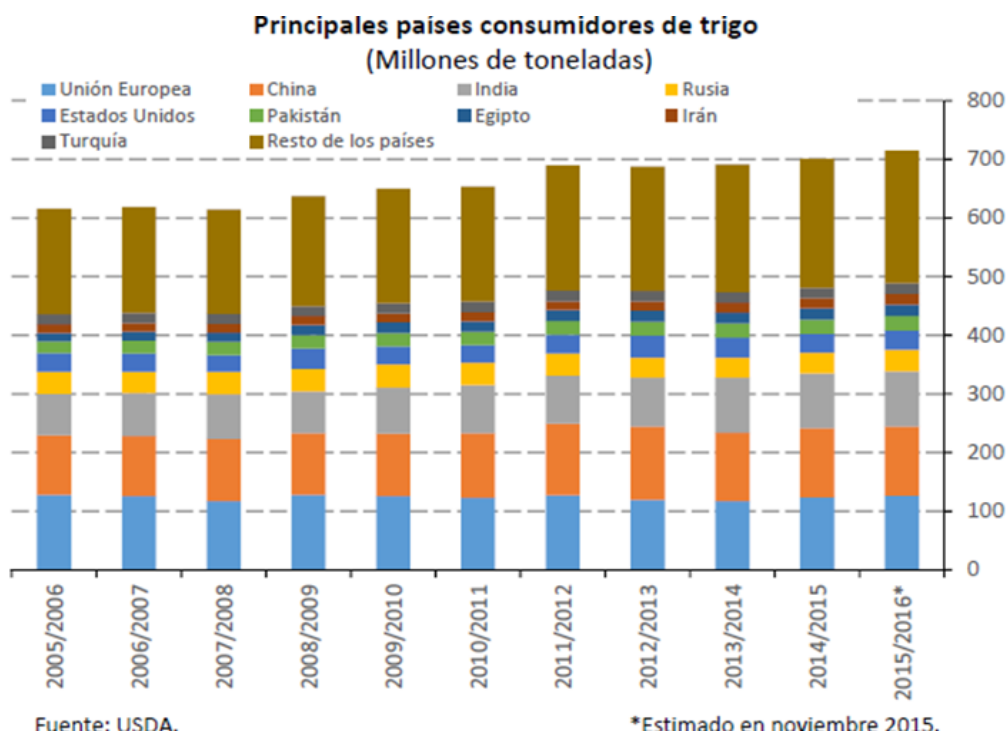


Figura 4. Principales consumidores de trigo a nivel mundial, fuente: USDA (2015)

1.2.1 Importancia del cultivo a nivel nacional.

El 90.4% de la producción del trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) en México es procesada por la industria molinera nacional, por lo que debe de cumplir con variables de calidad físicas y químicas del grano, así como de fuerza y extensibilidad de la masa (CANIMOLT, 2010). Éstas dos últimas variables dependen parcialmente de la cantidad y calidad de las proteínas, gluteninas y gliadinas, presentes en la harina (Souza et al., 2013).

El nivel de producción de trigo en México para el año agrícola 2014 representa 0.50 por ciento con respecto a la producción global. En el citado periodo, el nivel de producción aumentó 9.3 por ciento con respecto al año agrícola anterior, para llegar a 3.7 millones de toneladas (Figura 5). En cuanto a la producción de trigo por año comercial, es decir, de abril de 2015 a marzo de 2016, se prevé que esta sea de 3.77 millones de toneladas, lo que representa un aumento de 2.1 por ciento a tasa anual. La producción nacional se compondrá por 1.96 millones de toneladas de trigo cristalino y 1.8 millones de toneladas de trigo panificable. La producción de trigo panificable crecerá a una tasa anual de 7.7 por ciento, mientras que la cosecha de trigo cristalino disminuirá 2.6 por ciento en el periodo citado. (SAIP-SAGARPA, 2015).

El trigo se cultiva en veintitrés estados de la república y tiene una mayor concentración en la zona norte y noroeste del país. Los principales cinco estados productores de trigo son: Sonora, Baja California, Guanajuato, Sinaloa y Michoacán, los cuales acumulan 89 por ciento de la producción total.

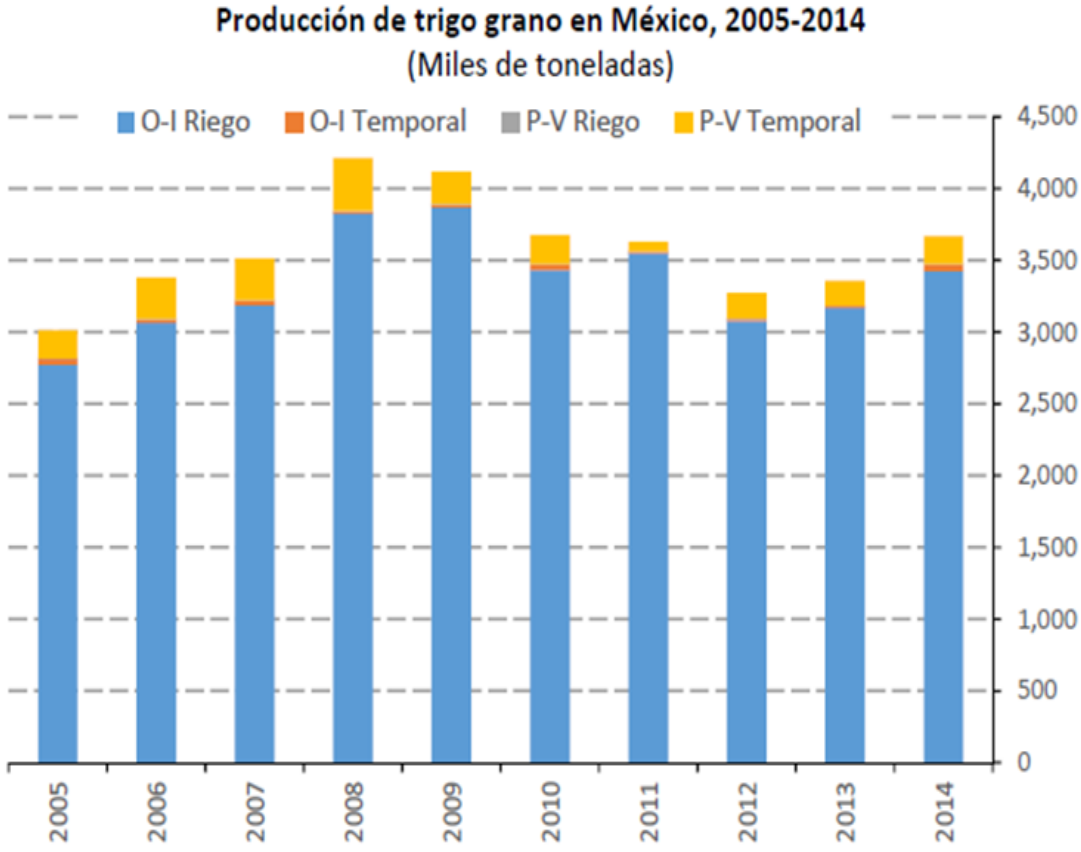


Figura 5. Producción nacional de trigo: Temporadas O-I (Otoño-Invierno) y P-V (Primavera-Verano) Fuente: SAGARPA (2015).

1.3 Valor nutricional.

La composición nutricional del grano de trigo puede variar de acuerdo a la región, condiciones de cultivo y año de cosecha. También la calidad y cantidad de nutrientes depende de las especies de trigo que influirán en sus propiedades nutritivas y funcionales (Kamal et al., 2009).

En general, el grano maduro está compuesto por hidratos de carbono, compuestos nitrogenados, lípidos, minerales y agua, junto con trazas de vitaminas, enzimas y otras sustancias (Altenbach et al., 2003). (Tabla 1).

Tabla 1. Composición nutricional del grano de trigo.

Composición química y nutrimental del grano de trigo					
Nutriente	Unidades por 100g	Grano	Harina de grano entero	Refinada	Cáscara
Análisis proximal					
Proteínas	g	12.6	13.7	9.7	15.6
Almidón	g	62.4	60.0	58.9	14.1
Lípidos	g	1.54	1.87	1.48	4.25
Cenizas	g	1.57	1.60	0.58	5.79
Fibra dietética	g	12.2	12.2	5.5	42.8
Minerales					
Hierro	mg	3.19	3.88	1.26	10.57
Magnesio	mg	126	138	25	611
Fosforo	mg	288	34	107	1.01
Potasio	mg	363	405	149	1.18
Zinc	mg	2.65	2.93	1.02	7.27
Cobre	ug	0.43	0.38	0.19	1.00
vitaminas					
Tiamina	mg	0.38	0.45	0.19	0.52
Riboflavina	mg	0.12	0.22	0.07	0.58
Niacina	mg	5.46	6.37	1.20	13.58
Ácido pantoténico	mg	0.95	1.01	0.25	2.18
Vitamina B-6	mg	0.30	0.34	0.04	1.30
Folato	ug	38	44	31	79
Vitamina A	IU	9	9	0	9
Vitamina E	mg	1.01	0.82	0.05	1.49
Vitamina K	ug	1.90	1.90	0.30	1.90
Perfil lipídico					
Saturados	g	0.27	0.32	0.30	0.63
Monoinsaturados	g	0.20	0.23	0.19	0.64
Poliinsaturados	g	0.63	0.78	0.85	2.21
Carotenoides					
Luteína+Zeaxantina	ug	220	220	18	240

Fuente: USDA-ARS, (2006)

1.3.1 Composición química

La composición química del trigo en promedio, lo constituye en un 74% de Carbohidratos, 11% de proteína, 1.25% de lípidos y 0.4% de vitaminas y minerales (Magaña, 2005). El grano maduro del trigo está formado por: hidratos de carbono, (almidón, maltosa, sucrosa, glucosa, melibiosa, pentosanos, galactosa y rafinosa), compuestos nitrogenados (principalmente proteínas: albúmina, globulina, prolamina y gluteínas), lípidos (ac. grasos: mirístico, palmítico, esteárico, palmitoleico, oléico, linoléico), sustancias minerales (K, P, S,) y agua junto con pequeñas cantidades de vitaminas (inositol, colina y del complejo B), enzimas (B amilasa, celulasa, glucosidasas) y otras sustancias como pigmentos. Estos nutrientes se encuentran distribuidos en las diversas áreas del grano de trigo, y algunos se concentran en regiones determinadas (Tabla 2). El almidón está presente únicamente en el endospermo, la fibra cruda está reducida, casi exclusivamente al salvado y la proteína se encuentra por todo el grano. Aproximadamente la mitad de los lípidos totales se encuentran en el endospermo, la quinta parte en el germen y el resto en el salvado, pero la aleurona es más rica que el pericarpio y testa. Más de la mitad de las sustancias minerales totales están presentes en el pericarpio, testa y aleurona (Magaña, 2005).

1.3.1.2 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono presentes en los cereales incluye al almidón (que predomina), celulosa, hemicelulosas, pentosanos, dextrinas y azúcares. El almidón es el hidrato de carbono más importante de todos los cereales, constituyendo aproximadamente el 64 % de la materia seca del grano completo de trigo y un 70 % de su endospermo. Forma 70% del grano de trigo en forma natural, es insoluble en agua fría. Cuando se calienta con agua, la absorbe, se hincha y revienta; este fenómeno se llama gelificación (Serna-Saldivar, 2009).

La fibra no digerible que es la parte del producto que queda sin digerir en el tubo digestivo, comprende: celulosa, polisacáridos no celulosos (gomas, mucílagos, sustancias pépticas, hemicelulosas) y también lignina, un polímero aromático no hidrocarbonatado.

La cifra de fibra no digerible es siempre mayor que la de fibra cruda, ya que una parte de los componentes de la fibra no digerible se degrada durante la valoración de la fibra cruda; sin embargo, la relación es constante (Badui, 2013).

1.3.1.3 Proteínas

La porción proteica del grano de trigo está localizada en el endospermo, embrión y escutelo (germen) en mayor abundancia. Hay varios tipos de proteínas; albúminas, globulinas y las que constituyen el gluten, esto es, proláminas y glutelinas, estas últimas se encuentran únicamente en el endospermo amiláceo. Las proteínas que constituyen el gluten al ser mezcladas con agua forman una masa elástica y compacta. Es donde van a residir las propiedades panarias de una harina. Ello es necesario para que la masa acoja el gas y lo retenga para que salga un producto esponjoso. Es importante tanto la cantidad como la calidad de las proteínas del gluten. El gluten con mayor aptitud para la panificación es el del trigo y el del centeno, aunque éste último es de menor calidad. Las proteínas del trigo están clasificadas en 4 categorías, atendiendo a sus características de solubilidad. Se puede hacer una clasificación semejante de las proteínas de todos los cereales (Gómez- Pallarés *et al*, 2007).

1.3.1.4 Lípidos

Forman parte del trigo en pequeñas proporciones 1,5-2,5% y están localizados principalmente en el germen y en la cubierta de la semilla. Aun siendo minoritarios, estos lípidos tienen efectos beneficiosos en el proceso de panificación. Cuando son extraídos con agua saturada de butanol a temperatura ambiente, muestran una composición casi equitativa de lípidos polares y no polares. De entre los lípidos polares, cerca de un 26% son glucolípidos y un 23% corresponde a los fosfolípidos (Ferrerías., 2009).

1.3.1.3 Vitaminas y minerales

Estos son constituyentes importantes en los alimentos, así que los cereales no se encuentran exentos de ellos teniendo vitaminas como la tiamina, riboflavina, entre otras y varios minerales. Las vitaminas están presentes en la capa aleurona y/o en el esculeto y los minerales solo en la aleurona (Zhao *et al*, 2009).

Tabla 2. Composición química de las diferentes partes del grano de trigo (en % sobre materia seca).

Parte del grano (% de la masa del grano)	Proteínas	Materias minerales	lípidos	celulosa	Hemi celulosa	Almidón
Pericarpio (4%)	7-8	3-7	3	25-40	35-43	0
Tegumento seminal (1%)	15-20	10-15	3-5	30-35	25-30	0
Epidermis nuclear, envuelta proteica (7-9%)	30-35	6-15	7-8	6	30-35	10
Germen (3%)	35-40	5-6	15	1	20	20
Endospermo (82-85%)	8-13	0.35-0.60	1	0.3	0.5-3.0	70-85
Grano entero (100%)	10-14	1.6-3.1	1.5-2.5	2-3	5-8	60-70

Fuente: Ferreras (2009).

1.3 Productos derivados del trigo

Tabla 3. Productos obtenidos a partir de la manufactura del trigo.

Trigo integral	Grano descortezado libre del pericarpio, se conserva la hialina y sirve de protección al núcleo y evita que se desprenda el germen; con el fin de aprovechar al máximo los elementos nutritivos del trigo, sin desperdiciar tan alta proporción de nutrientes, como se hace al preparar las harinas refinadas.
Trigo malteado	Se puede preparar con trigo integral, que se pone a germinar para que aumente las proporciones de vitamina b y c para que hidrolicen parcialmente los alimentos y después se aplastan los granos, se deshacen y se envasan.
Trigo inflado	Se usan para servirlo con leche, es el desayuno o algunos postres, es un alimento de precio alto y bajo valor nutritivo.
Harina	Con el término harina se designa al producto de la molienda del grano de trigo, generalmente el blando, sin impurezas. Es el producto más importante derivado de la molturación de los cereales, especialmente del trigo maduro.
Pan	La panificación consiste en la obtención de pan a partir de harina, a la que se añade agua, sal y levadura. La gran variedad y tipos de pan que existen hacen que sea imposible conocer la composición de todos ellos. Está en dependencia de los elementos que se añaden o de la forma como se fabrica. Los suplementos pueden ser azúcar, miel, leche, germen de trigo, gluten, pasas, higos, entre otros. El pan integral es el que se prepara con una harina cuya tasa de extracción es del 90-98%. Es más rico en vitaminas del grupo B y en fibra que el pan blanco.
Bollería	Así se denomina a una serie de productos alimenticios elaborados a base de harina, azúcar, materias grasas y otros alimentos. Gran parte de la bollería puede considerarse "dura": galletas hechas con mantequilla (no contienen huevo).
Pasta	Se obtiene a partir de trigo duro, tras realizar una serie de operaciones semejantes a las que se hace con el blando. Puede ser sencilla o compuesta, si se le añaden otros alimentos, como verduras y huevo, entre otros. Se comercializa en forma de tallarines y macarrones, entre otros.
Sémola	La trituration del grano de trigo, pero conteniendo pequeñas cantidades de cáscara, se conoce como sémola.
Salvado	Es el producto obtenido de las diferentes envueltas del trigo.
Cereales	Para desayuno son productos elaborados por la industria a partir de diversos granos, principalmente trigo, maíz y arroz, sometidos a procesos por los que se consiguen que estallen, se expandan, se hinchen o se aplasten, de manera que estén listos para tomar. Conservan su valor nutricional y son más digeribles que como grano entero y natural.

Fuente: Gonzales, 2016

1.5 Proteínas industrialmente relevantes del grano de trigo

Las proteínas que acompañan al almidón, tienen una buena tasa de digestibilidad, sin embargo, dado su bajo porcentaje (8 al 16%) y a la ausencia de los aminoácidos esenciales lisina, triptófano y treonina, se considera al trigo de calidad proteica baja para las primeras etapas de la vida del humano. La cantidad de proteínas en el grano depende de las condiciones ambientales y de su genotipo, el mayor porcentaje es en el germen y la capa de aleurona (Kidwell, 2000; Serna-Saldivar, 2009).

Las proteínas pueden dividirse en dos grupos: las proteínas del gluten o de almacenamiento y las proteínas que no forman gluten, englobando a la mayoría de las enzimas. Las albuminas y globulinas se encuentran en el germen, el salvado y la aleurona, y en menor proporción en el endospermo, conteniendo un buen balance de aminoácidos. Las gliadinas y gluteninas se encuentran en el endospermo, distinguiéndose por sus altas concentraciones de glutamina y prolina (Dupont y Altenbach, 2003; Gomez-Pallares et al, 2007).

1.5.1 Puroindolinas

La dureza del endospermo del trigo panadero se relacionó al principio con la proteína de 15Da denominada friabilina. Varios investigadores al purificarla friabilina observaron que estaba formada principalmente por tres polipeptidos: puroindolina a, puroindolina b y GSP-1 (grain softness protein-1). El locus Ha controla los genes que determinan la textura del endospermo del grano de trigo. En él se encuentran los genes pina-D1, Pinb-D1 y GSP-1 que codifican para las dos puroindolinas y para la GSP-1 (Morris, 2002).

1.5.2 Prolaminas

Dentro del conjunto de proteínas de reserva, las prolaminas son las que confieren las propiedades reológicas únicas a la masa obtenida de la harina de trigo. La estructura, propiedades y base genética de estas proteínas se han estudiado exhaustivamente con el objetivo de relacionar su base bioquímica y molecular con sus propiedades funcionales.

Las prolaminas, llamadas así por su alto contenido en los aminoácidos prolina y glutamina, se subdividen en gliadinas y gluteninas de acuerdo con su estructura (Espì, 2013).

La glutamina es el aminoácido más abundante junto con la prolamina y la glicina, conforma más del 50 % de los aminoácidos residuales en el gluten. Esto puede limitar los tipos de conformaciones estructurales secundarias que son posibles para el gluten (Shewry *et al*, 2003).

1.5.3 Gluten

El gluten es la estructura del trigo que le confiere a la harina propiedades únicas para obtener una masa viscoelástica y cohesiva capaz de retener gas y preparar productos horneados aireados y livianos como panes y galletas. El gluten está formado por dos proteínas: gliadina (una prolamina) y glutenina (una glutelina). Diversos modelos se han propuesto a través de los años para tratar de explicar la manera en la que los componentes del gluten interactúan, pero aún existe una brecha en el conocimiento y entendimiento de la exclusividad del gluten y su rol en la elaboración de diferentes productos horneados. (Villanueva, 2014).

El gluten, por su alto contenido en prolina (14% del total de aminoácidos) no posee una conformación helicoidal, favoreciendo que los grupos amida de la glutamina (37% del total de aminoácidos) formen puentes de hidrogeno intra e intermoleculares, sumado a esto, el gluten es rico también en cisteína que permite la formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares, los cuales se forman durante el amasado. Las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas ayudan a que los polímeros se orienten longitudinalmente originando una red elástica y cohesiva para la formación del esponjado producido por la generación de CO₂, producto de la fermentación (Wienser, 2007; Kamal et al., 2009; Badui, 2013)

Otras características adicionales del gluten son el número relativamente elevado de aminoácidos hidrofóbicos residuales (aproximadamente 35 %) y la baja densidad de carga debido a la relativa carencia de aminoácidos básicos y a la presencia de la forma amida de los aminoácidos ácidos. Metionina, triptófano y lisina son los aminoácidos limitantes en el gluten (De la O y Espitia, 2010).

El procedimiento de fraccionamiento de Osborne fue un paso adelante en la identificación de los grupos principales de proteínas que comprenden el gluten. El desarrollo de la electroforesis condujo a este descubrimiento y la consecuente aclaración de que las gliadinas y gluteninas son dos grupos amplios de proteínas, cada una compuesta de muchas subunidades individuales (Villanueva, 2014).

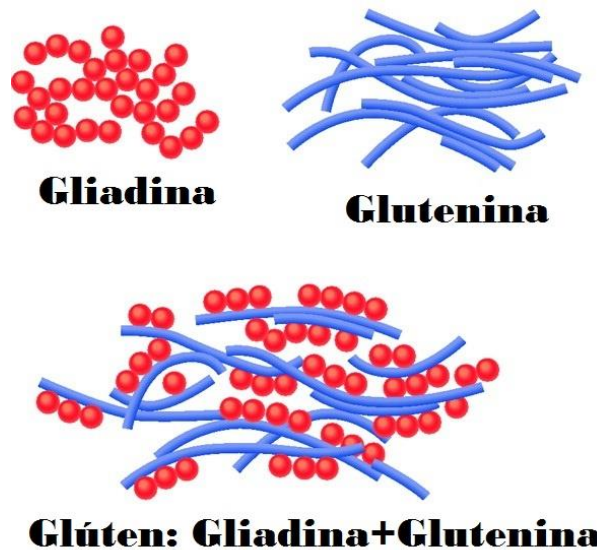


Figura 6. Composición del gluten. Fuente: APS (2011).

1.5.4 Gliadinas

Las proteínas gluteninas y gliadinas, están relacionadas estructuralmente pero presentan solubilidades diferentes. Las gliadinas son monómeros que interactúan por fuerzas no covalentes, mientras que las gluteninas son polímeros de alto peso molecular estabilizados por puentes disulfuro (Shewry *et al.*, 2003).

Las gliadinas son proteínas monoméricas que se clasifican en cuatro grupos, α , β , γ , y ω gliadinas, según su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida a pH ácido (A-PAGE). Las α y β gliadinas son tan parecidas en secuencia como en estructura que algunos autores la consideran dentro de un mismo grupo. Atendiendo a su composición, las ω gliadinas son ricas en glutamina, prolina y fenilalanina, y se estabilizan mediante interacciones hidrofóbicas ya que no pueden formar puentes disulfuro. Las α , β , y γ gliadinas son ricas en residuos de cisteína y metionina. Se estabilizan por medio de puentes disulfuro intercatenarios (Shewry *et al.*, 2003).

Se considera que las gliadinas le dan extensibilidad y viscosidad a las masas, mientras que las gluteninas le dan elasticidad y fuerza (Carceller y Aussenac, 2001). Los numerosos parámetros relacionados a la composición proteica que determinan la calidad panadera pueden ser una guía para seleccionar características específicas en los programas de mejoramiento de trigo (Cuniberti *et al.*, 2003).

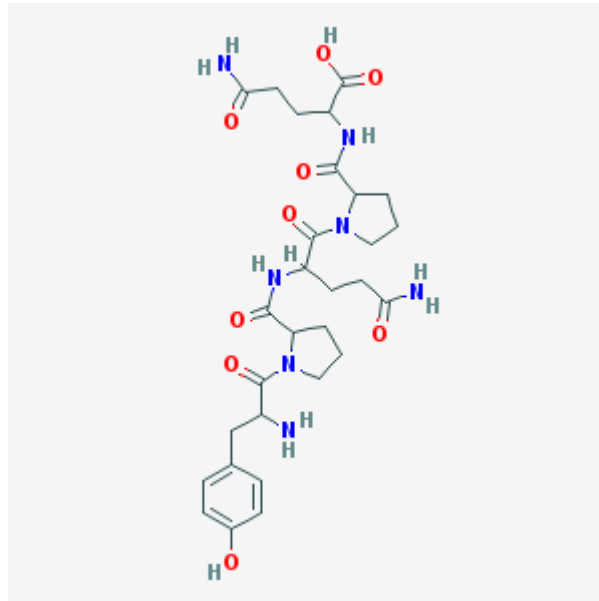


Figura 7. Estructura molecular de la gliadina. Fuente: NCBI (2017).

1.5.5 Gluteninas

Las gluteninas son proteínas poliméricas, algunas de ellas formadas por hasta 20 subunidades, unidas por puentes disulfuro inter e intracatenarios. Los polímeros de gluteninas están entre las macromoléculas más grandes presentes en la naturaleza, con pesos moleculares que pueden exceder el millón de Daltons. Se ha visto que se pueden establecer interacciones no covalentes, como puentes de hidrogeno, entre estos macropolímeros y las gliadinas (Belton, 2005).

En presencia de un agente reductor en geles de electroforesis SDS-PAGE, se diferencian dos tipos de gluteninas según su peso molecular: gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) con un rango de peso molecular entre 70,000 y 90,000 Da, y gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS) en el rango de 20,000-45,000 Da. Las HMW-GS componen el 10% del total de las prolaminas y tienen una gran influencia en la calidad panadera.

Esta va a depender en gran medida de la variación alélica, es decir, del tipo y el número de subunidades que puede variar entre 3 y 5 en cada variedad de trigo panadero. Todas las subunidades de HMW están compuestas aproximadamente de un 35% de glutamina, un 20% de glicina y un 10 % de prolina (Singh y Khatkar, 2005).

Las LMW-GS componen el 40% de las proteínas de reserva en el endospermo del grano de trigo. Se subdivide en tres grupos según su movilidad en SDS-PAGE: B, C y D. Basándose en la secuencia N-terminal de la proteína, la mayoría de las B y C LMW se subdividen en tres subgrupos LMW-s, LMW-m y LMW-i de acuerdo con el primer aminoácido de la secuencia de la proteína madura: serina, metionina o isoleusina respectivamente (D´Ovidio y Masci, 2004).

Las gluteninas de tipo D-LMW, en cambio, son ω gliadinas modificadas, presentan puentes disulfuro impares de manera que les permite establecer puentes intercatenarios con otras moléculas lo que hace que sean poliméricas. Las gluteninas pueden separarse en dos grupos con base en el tamaño de los polipéptidos que forman sus polímeros: las subunidades de bajo peso molecular (G-BPM) y las de alto peso molecular (G-APM) (Gianibelli *et al.*, 2001).

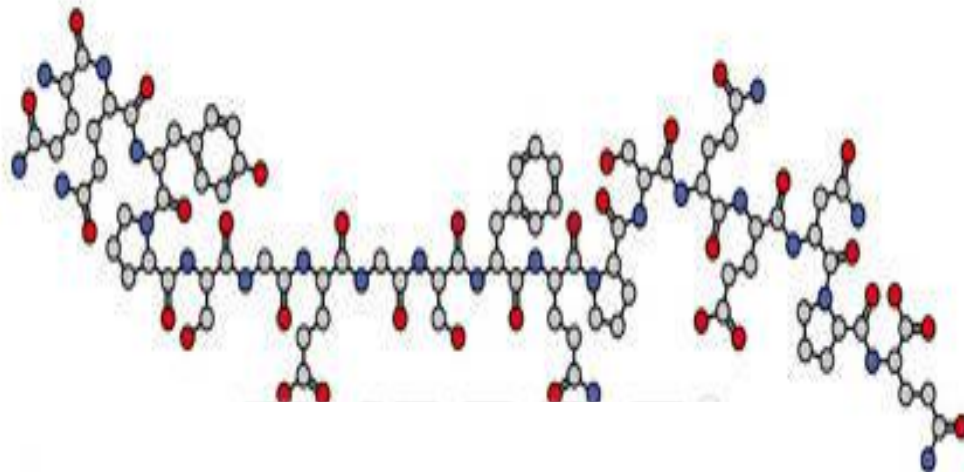


Figura 8. Estructura molecular de la glutenina. Fuente: Singh, 2005)

1.6 Factores que alteran la calidad del grano de trigo y sus proteínas durante su almacenamiento

Durante el almacenaje del grano en silos se debe realizar con una humedad inferior al 14 %, previa desinfección y limpieza de los mismos. Cuando esto no ocurre y el grano se almacena húmedo, sin controlar temperatura, se puede producir el deterioro por la acción de hongos y bacterias, que provocan incremento de la temperatura y como consecuencia el “ardido” del grano (que ha sufrido cierto grado de deterioro por fermentación y/o distintas acciones orgánicas). El efecto sobre la calidad industrial es semejante al daño por calor. El grano de trigo almacenado a 12,5% de humedad en silo bolsa, no sufre ningún deterioro importante en su calidad panadera. A humedad superior a 16,5%, se ven afectados algunos parámetros de calidad (Cuniberti, 2001).

1.6.1 Físicos

1.6.1.1 Humedad

El agua es el segundo componente cuantitativo de la harina, según la reglamentación vigente debe de estar como máximo al 15%. La humedad es el contenido en agua que tiene la harina. La humedad que tiene el grano de trigo y consiguientemente la harina, es una característica importante particularmente en relación con la seguridad del almacenamiento de la harina, ya que si el grano no está lo suficientemente seco después de la recolección, germinará o se enmohecerá una vez almacenado. Si la recolección se produce en malas condiciones se puede secar el grano, pero si la temperatura es demasiado alta, la proteína del grano se desnaturalizará de tal forma que la harina al mezclarse con agua no producirá gluten.(Férreras, 2008).

1.6.1.2 Temperatura

El clima durante el ciclo del cultivo, pero especialmente en floración y llenado de grano, cumple un rol muy importante en la expresión de la calidad de trigo. Así por ejemplo si en floración persisten días de alta humedad relativa, temperaturas entre 20-25°C favorecerán la presencia de *Fusarium graminearum*, hongo causante de “fusariosis”, afectando no sólo la calidad comercial sino también panadera.

Por otro lado, temperaturas superiores a los 30 °C y baja humedad relativa durante el llenado de grano, producen modificación en la composición de las proteínas y una reducción en la calidad. Bajo estas condiciones la síntesis de gluteninas se reduce o interrumpe, continuando la síntesis de gliadinas. Como consecuencia el grano maduro tiene una alta relación gliadina/glutenina produciendo un glúten débil y masa extensible, de menor tiempo de desarrollo. Es decir, el estrés térmico modifica la composición de las proteínas sin influenciar en la cantidad (Gaido, 2008).

1.6.2 Químicos

La respiración de los granos, los insectos y microorganismos asociados a ellos, involucra el uso de oxígeno. Mientras menor sea el contenido de oxígeno de un almacén, menor será la respiración del grano y la actividad de los insectos y microorganismos reduciéndose sus efectos de daño. En métodos tradicionales de almacenamiento la presencia de oxígeno no es una limitante, salvo el almacenamiento en estructuras herméticas como en silos metálicos y barriles. En estos casos los niveles de oxígeno pueden reducirse al sellar completamente la estructura y permitir que la respiración del grano, insectos y microorganismos consuma todo el oxígeno disponible. Esto ha sido reconocido como una alternativa para evitar el deterioro y ha sido utilizada para almacenar grano húmedo para ensilaje, sin embargo, en el caso del grano almacenado para consumo humano su uso es limitado. (Postcosecha, 2017).

Por otra parte la persistencia y bioacumulación de pesticidas es un factor importante, ya que son de poco a moderadamente persistente, lo que significaría una permanencia de un mes a un año en el grano de trigo; esto implica una gran responsabilidad de los productores y comercializadores de observar este tiempo antes de poner a la venta sus productos para no exponer al consumidor a sustancias (Juárez, 2014).

1.6.3 Biológicos

Los microorganismos (hongos) que atacan el grano almacenado se desarrollan rápidamente a temperaturas mayores de 25°C, con un rango óptimo entre 28 y 32°C si se encuentra humedad disponible. Según se desarrollen, la temperatura irá en aumento debido a su metabolismo y crecimiento, causando la descomposición del grano. Los hongos mueren cuando la temperatura del grano está fuera del margen en que se efectúa su crecimiento. Su muerte es rápida si la temperatura sobrepasa su máximo de tolerancia y lenta, si está por debajo de la mínima. Es importante mantener el grano a temperaturas inferiores de las óptimas para evitar el desarrollo de los hongos y que este no se dañe.

Todas las especies de insectos tropicales importantes de almacén se desarrollan en un rango óptimo de temperatura entre 25 y 35°C. Temperaturas debajo de 20°C reducen su tasa de crecimiento a puntos tan bajos que a los niveles de daños son casi insignificantes. Temperaturas inferiores a 5°C pueden erradicar las poblaciones de la mayoría de insectos, aunque sorprendentemente algunas especies son resistentes. (Postcosecha, 2017).

Una enfermedad muy extendida a nivel mundial es la fusariosis de la espiga, perjudicial para el trigo y otros cereales, ya que disminuye el rendimiento y la calidad proteica del grano (Liddell, 2003).

1.7 Métodos para la extracción de proteínas

1.7.1 Osborne

Las proteínas de la harina de trigo pueden clasificarse con base en: 1. Solubilidad y 2. Funcionalidad. Esta clasificación fue desarrollada por Osborne en 1924 y consiste en una serie de extracciones consecutivas con: agua, solución de sal diluida, solución de alcohol y solución de ácidos o álcalis diluidos. Usando esta secuencia de separación, las proteínas se pueden clasificar en albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas respectivamente. La tabla 4 muestra las proteínas presentes en las diferentes fracciones, además su papel biológico y funcional (Goesaert *et al.*, 2005).

Tabla 4. Proteínas presentes en las fracciones de Osborne.

Fracción Osborne	Comportamiento en solubilidad	Composición	Papel biológico	Papel funcional
Albuminas	Extraíbles en agua	Proteínas no del gluten (principalmente monoméricas)	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Globulinas	Extraíbles en sales diluidas	Proteínas no del gluten (principalmente monoméricas)	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Gliadinas	Extraíbles en soluciones de alcohol	Proteínas del gluten (principalmente gliadinas monoméricas)	Proteínas de almacenamiento de las semilla tipo prolaminas	Viscosidad a la masa/extensibilidad
Gluteninas	Extraíbles en ácido acético diluido	Proteínas del gluten (principalmente polímeros de glutenina de alto peso molecular)	Proteínas de almacenamiento de la semilla tipo prolaminas	Elasticidad a la masa/ tenacidad
Residuo	Sin extraer	Proteínas del gluten y proteínas no del gluten (trincinas)	Proteínas de almacenamiento de la semilla tipo prolamina y tipo globulina	Variable

Fuente: Goesaert et al (2005).

1.7.1.2 Precipitación con sulfato de amonio

Al obtener el extracto crudo se debe tener en cuenta que las proteínas de interés se encuentran en solución acuosa a una baja salinidad. Al incrementar la concentración de sales en la solución incorporando lentamente sulfato de amonio, entre 20-95% de saturación, la proteína comienza a ceder intercambios iónicos con los iones amonio y sulfato, y sustituye los sitios de intercambio que compartía con el agua y pasado un tiempo de esta manera, la proteína disminuye su solubilidad y precipita. Por lo general las moléculas de mayor peso molecular se precipitan primero, esta nueva solución se centrifuga y el precipitado que contiene las proteínas se recupera (CONCYTEG, 2017).

1.7.2 Técnicas para la identificación y cuantificación de proteínas

1.7.2.1 Lowry

Cuando a un péptido o proteína en solución básica se le hace reaccionar con cobre se forma un compuesto colorido por coordinación entre los nitrógenos del péptido con el ion metálico. En el método de Lowry, el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) se añade para incrementar la cantidad de color desarrollado el cual transfiere los electrones al complejo fosfomolibdato/ fosfotungstato, reacción que produce una coloración azul que se lee a 750 nm.

La determinación de proteínas con el método de Lowry tiene varias ventajas: es un ensayo 10 a 20 veces más sensible que la medición de la absorción ultravioleta de las proteínas (280 nm), es varias veces más sensible que la detección con ninhidrina y 100 veces más sensible que la reacción de Biuret. Sin embargo, hay algunas desventajas del método como son que el color varía dependiendo de la proteína que se determina y que hay varios reactivos usados en la obtención de proteínas que interfieren con la reacción.

Este es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot C$

Este método consta de dos etapas (Figura 9):

1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

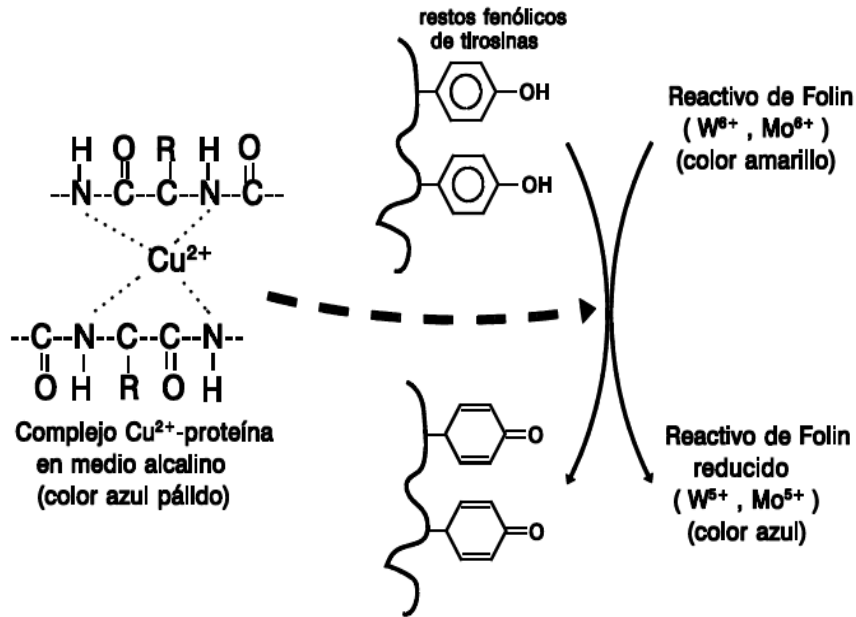


Figura 9. Reacción entre las proteínas y el reactivo de Folin. Fuente: Jorrín, (2006).

1.7.2.2 Biuret

La reacción del Biuret, es una reacción coloreada producida por compuestos químicos como el biuret ($\text{NH}_2\text{-CONH-NH}_2$), cuando son tratados con sales de cobre en medio alcalino. La reacción fué primeramente observada por Wiedemann en 1848, sin embargo, fue Schiff a finales de siglo pasado, el pionero en el estudio del mecanismo químico de dichas reacciones.

Este método, se fundamenta en la capacidad que presentan los “enlaces peptídicos” (...-CO-NH-...) de las proteínas y de los péptidos, para formar complejos con el ión Cu^{2+} , en medio alcalino, de color rosa-violeta. La intensidad de la coloración es proporcional al número de enlaces peptídicos, y por tanto a la cantidad de proteína presente en la muestra analizada.

El nombre de la reacción procede del compuesto coloreado formado por la condensación de dos moléculas de urea con eliminación de amoníaco (UCM, 2014).

Si una solución fuertemente alcalina de sulfato cúprico (CuSO₄) se añade a una solución de proteína se forma un complejo entre el ion cúprico y los enlaces peptídicos, con aparición de una coloración violeta-púrpura, que presenta un máximo de absorción a 540 nm.

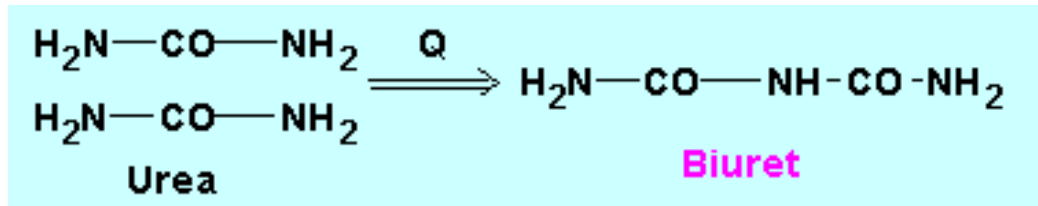


Figura 10. Reacción de Biuret. Fuente: Maugeri, 2002.

1.7.2.3 Método de Bradford

Este método involucra la unión del colorante Azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, provocando un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm y se monitorea midiendo el incremento de absorción a 595 nm. El ensayo es muy reproducible y rápido, puede ser empleado para procesar un gran número de muestras y es adaptable a la automatización (García y Vázquez, 2001).



Figura 11. El colorante Coomassie Brilliant Blue forma complejos con las proteínas Fuente: Maugeri, 2002.

1.7.3 Técnicas utilizadas en el análisis de proteínas

1.7.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular

La cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC, del inglés, Size Exclusion-HPLC) es una técnica muy empleada actualmente para medir las proporciones relativas de las principales proteínas del endospermo del grano de trigo y de otros cereales (Labuschagne *et al.*, 2004; Larroque *et al.*, 2000).

Estas determinaciones son importantes porque la relación entre las proteínas del gluten y la distribución del tamaño de las proteínas poliméricas afecta los atributos de calidad. Los resultados obtenidos con esta técnica han sido ampliamente correlacionados con la calidad panadera (Larroque *et al.*, 2000).

1.7.3.2 Espectrofotometría

La espectrofotometría estudia los fenómenos de interacción de la luz con la materia. En general, cuando una lámpara ilumina cualquier objeto, pueden suceder algunos fenómenos: La luz puede ser emitida, reflejada, transmitida o absorbida. Desde que sabemos que la energía no puede ser destruida, la cantidad total de luz debe ser igual al 100%; por lo tanto, cuando un objeto es iluminado, se puede medir cuánta radiación ha sido reflejada o transmitida y podemos decir entonces cuánta fue absorbida, cuál es la cantidad que ha interactuado con el objeto (Arenas y López, 2004). El espectrofotómetro es un instrumento ampliamente utilizado en el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas biológicas. Esto quiere decir que este instrumento nos ayuda a determinar cuáles sustancias (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, entre otras), están presentes en una disolución y en qué cantidad. Los espectrofotómetros pueden emitir radiaciones de diferentes longitudes de onda tanto en el ultravioleta como en el visible.

Muchas sustancias absorben radiación a diferente longitud de onda (puede ser en el espectro visible o en el ultravioleta), por tanto, cuando determinamos a qué longitud de onda absorbe una sustancia desconocida, podemos tener idea de qué tipo de molécula se trata (Sánchez, 2013).

1.8 Electroforesis

La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año 1937. *Raymond y Weintraub* en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) (García, 2001).

1.8.1 Tipos de electroforesis

Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación:

- i) Electroforesis capilar.
- ii) Electroforesis en papel.
- iii) Electroforesis en gel de agarosa.
- iv) Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- v) Isoelectroenfoque.
- vi) Electroforesis bidimensional (Westermeyer, 2001)

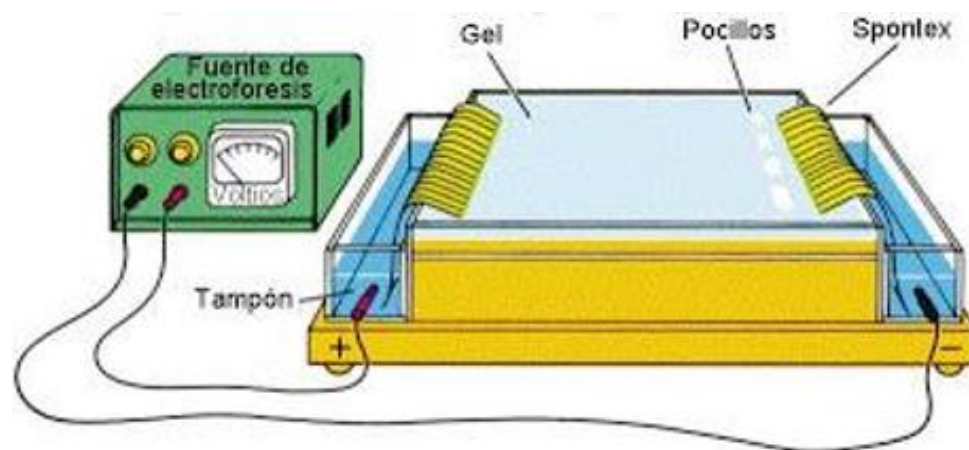


Figura 12. Equipo electroforético. La cubeta tiene en sus extremos los reservorios para el tampón de electroforesis. Fuente: Morales, (2006).

1.8.1.2 Fundamento de la electroforesis

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética.

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas (García HM, 2000).

1.8.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. La técnica permite separar moléculas cargadas y explota diferencias en movilidad cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico. La electroforesis se lleva a cabo sobre un soporte inerte, generalmente sobre geles de poliacrilamida (PAGE). En la electroforesis desnaturante (SDS-PAGE), como su propio nombre indica, se utilizan agentes desnaturantes de proteínas, como pueden ser: detergentes (SDS), caótopos (urea) y agentes reductores (2- mercaptoetanol, DTT). Para la visualización de las proteínas se utilizan diferentes métodos de tinción, siendo el más habitual el azul de coomassie. En la SDS-PAGE, la separación es función del tamaño (masa molecular), lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas. Para ello se compara la movilidad electroforética (R_f) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de referencia de peso molecular conocido (Maldonado, 2003).

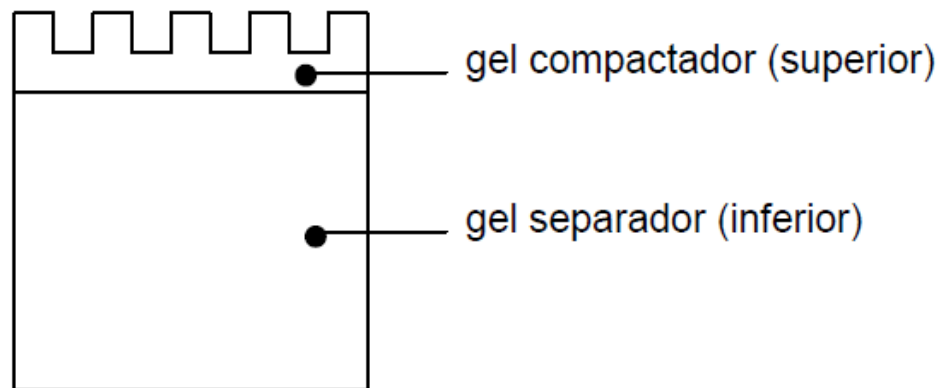


Figura 13. Partes de un gel de SDS-PAGE. Está compuesto de dos geles de distinta porosidad y pH. Fuente: Lemonte, (2002).

1.8.1.4 Formación del gel de poliacrilamida

Las placas de gel de poliacrilamida se forman por la co-polimerización de la acrilamida para lo cual se utiliza un agente entrecruzador como la N,N'-metilén bis-acrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como el TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina). La polimerización depende de la temperatura (Figura 14). Se recomienda utilizar una temperatura por encima de los 20°C para prevenir una polimerización incompleta. La polimerización se debe realizar en una atmósfera inerte ya que el oxígeno puede actuar como neutralizador de radicales libres, generados por el ion

persulfato, por lo que se deben utilizar cámaras verticales que dispongan de dos placas de vidrios sellados y de esta manera disminuir la absorción de oxígeno por los geles. Las soluciones de acrilamida se desgacifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.

Mientras que la porosidad del gel la determinan las proporciones relativas de poliacrilamida (C) y bisacrilamida (T), siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida haya en relación a la concentración de acrilamida. El porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. (Pérez, *et.al.*, 2015).

Las siguientes formulas se utilizan para determinar el tamaño de poro, a través del control de la concentración total de T y C:

$$T = [a+b/V] 100(\%)$$

$$C = [b/a+b] 100(\%)$$

Donde "a" es la masa de acrilamida en gramos, "b" es la masa de bis-acrilamida en gramos y "V" es el volumen en mL. Cuando C permanece constante y T incrementa, el tamaño del poro disminuye.

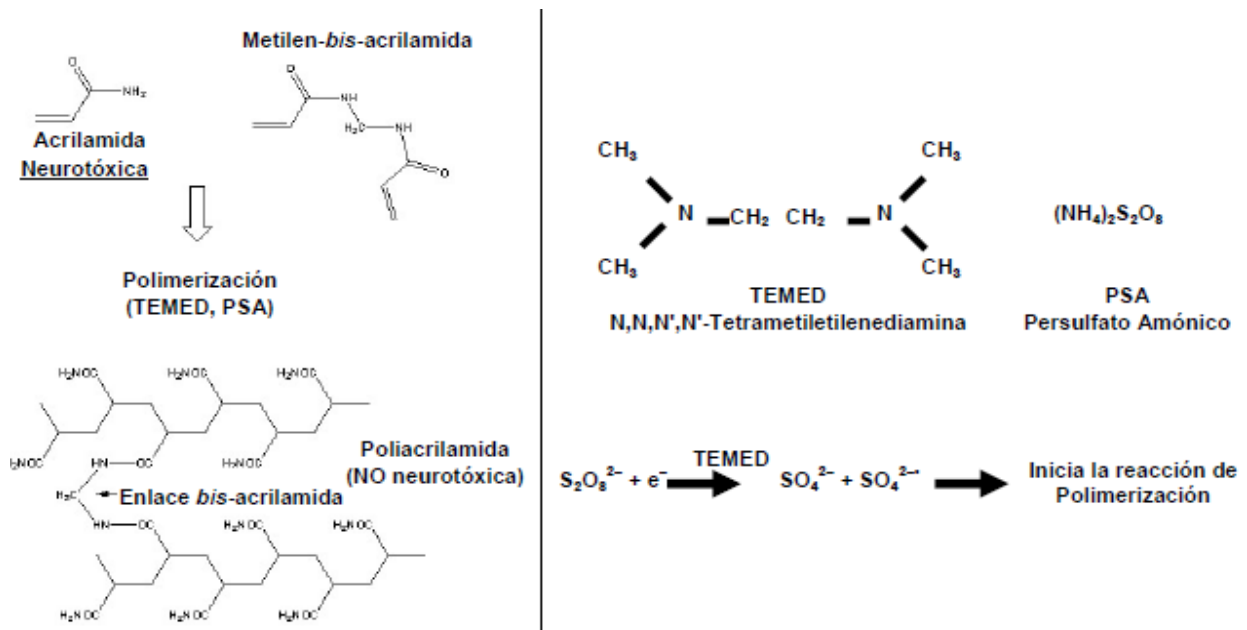


Figura 14. Reacción de polimerización de la acrilamida. Fuente: Maldonado, (2003).

1.8.1.5 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturizantes (SDS-PAGE). Las diferencias entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles y del tampón de electroforesis, así como el tratamiento de las muestras. Como su propio nombre indica, en el segundo tipo, y no en el primero, se incluyen agentes desnaturizantes: reductores, detergentes y caótopos. En el primer caso, las proteínas mantienen su estructura tridimensional y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose no sólo en función de su carga eléctrica, sino también según su tamaño y forma. Por el contrario, cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente aniónico SDS, éste se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturizándolas. Las proteínas desnaturizadas de la muestra adoptarán una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Como media, se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos (Figura 15).

La carga nativa original de la molécula está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. A diferencia de la electroforesis en condiciones nativas, en la SDS-PAGE las proteínas se separan únicamente en función de su tamaño (Maldonado - Jorriñ., 2013).

La SDS-PAGE se usa frecuentemente, para determinar el peso molecular de proteínas desconocidas mediante la comparación de su movilidad electroforética relativa (RF) con la de proteínas estándar de peso molecular conocido, y para determinar el número de subunidades de un complejo de proteínas. La SDS-PAGE es un método mucho más resolutivo que la electroforesis en condiciones nativas; sin embargo, debido a que las proteínas se desnaturizan, es imposible detectar actividad enzimática.

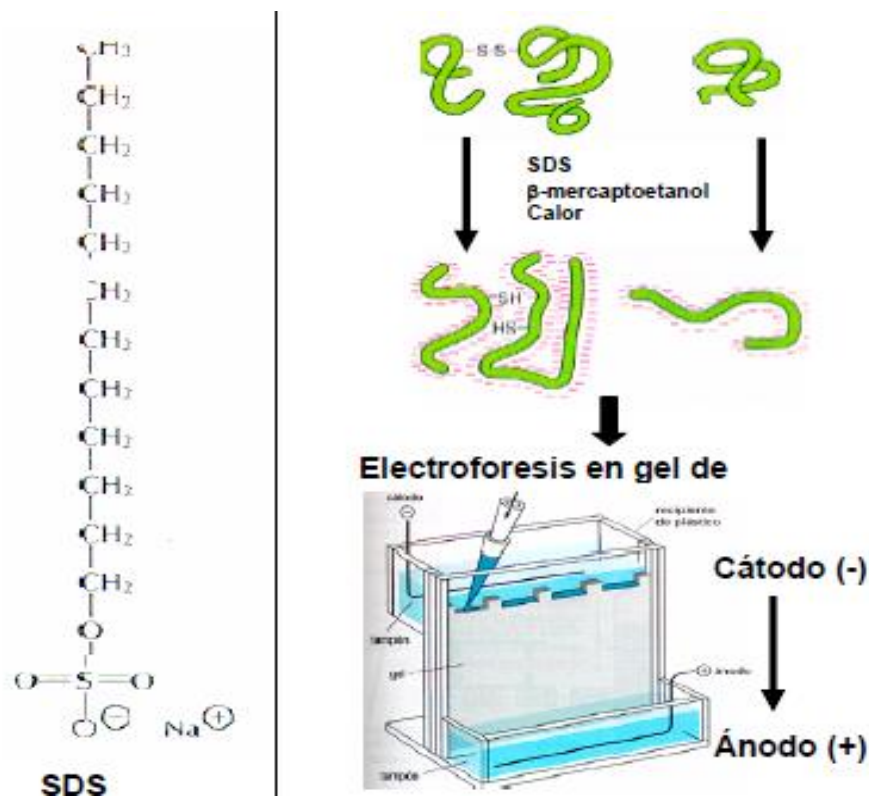


Figura 15. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida. Estructura del SDS. El tratamiento de las muestras con agentes desnaturantes provoca la desnaturación de las proteínas, pérdida de la estructura secundaria y la disociación de las subunidades. Las proteínas quedan cargadas negativamente y migran del polo negativo al positivo durante la electroforesis. Fuente: Maldonado, (2003).

Actualmente existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con base en tampones empleados:

- i) El sistema continuo de Weber y Osborn. En este sistema existe un único gel separador que emplea el mismo tampón en los tanques y en el gel.
- ii) El sistema discontinuo o de Laemmli que se llevará a cabo en la presente práctica. Consta de dos tipos de geles: un gel, llamado concentrador con un tamaño de poro no restrictivo (grande) que se forma sobre un segundo gel llamado separador. En este sistema cada uno de los geles se prepara con tampones de diferente pH y fuerza iónica, y el tampón de electroforesis es un tercer tipo de tampón. La movilidad de una proteína en el gel concentrador es intermedia entre la movilidad de los iones cloruro Cl^- del gel y la movilidad del ión glicina Gly^- del tampón de muestra. Por tanto, entre ambos frentes existe una zona de baja conductividad y gran diferencia de voltaje, de forma que las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre ambos iones. Una vez en el gel separador, el pH básico

favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de los polipéptidos concentrados, justo por detrás de los iones cloruro. A partir de este momento las proteínas migran a través del gel separador en una zona de voltaje y pH uniforme de forma que se separan en base a su tamaño. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles.

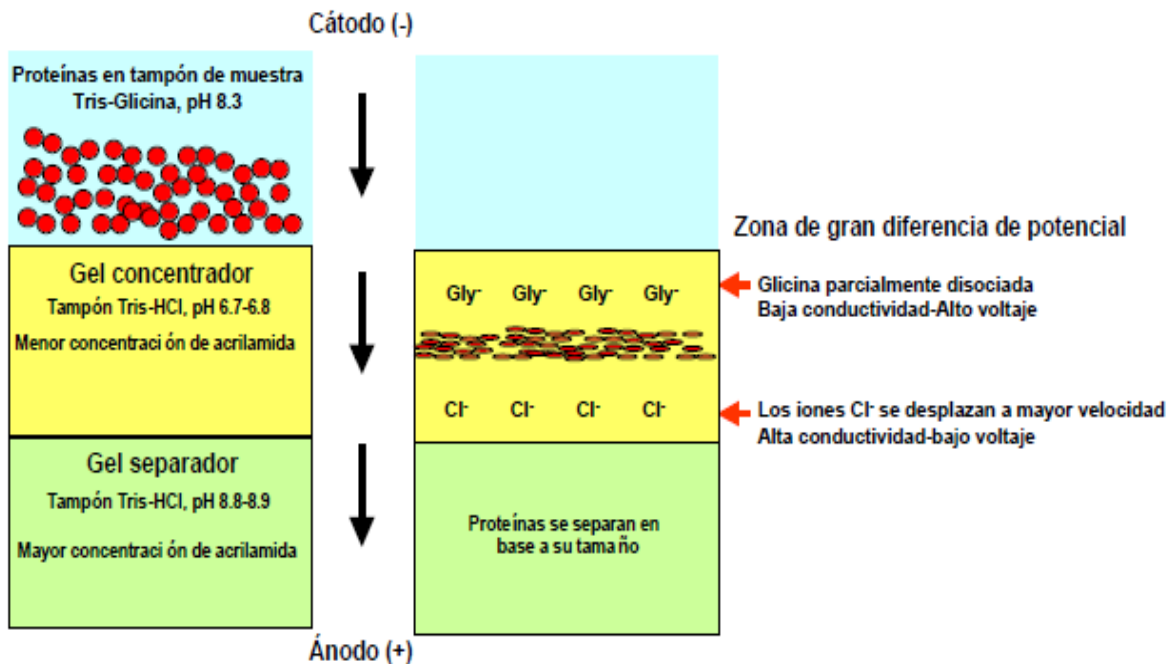


Figura 16. Sistema discontinuo. Empaquetamiento de las proteínas en el gel concentrador. Fuente: Maldonado, (2003).

1.8.1.6 Análisis del producto de la electroforesis

Esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido. Estas determinaciones poseen un margen de error de aproximadamente 10%. La determinación del PM de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM.

La movilidad electroforética relativa (Rf) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El Rf se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante (Lemonte, 2002).

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

1.8.1.7 Factores que afectan la electroforesis

La electroforesis es una técnica muy sensible y puede ser afectada por muchos errores experimentales, como los que se mencionan a continuación:

Fuerza del campo eléctrico

Es la fuerza que determina el movimiento o migración de la proteína a través del campo eléctrico. Su unidad de medición es voltios/cm y es por esta razón que la tasa de migración de una proteína puede ser alterada cambiando tanto la distancia comprendida entre los electrodos (cm) como el potencial eléctrico del sistema (voltaje).

Tiempo de corrida

La determinación del tiempo adecuado de corrida es muy importante, pues corridas muy cortas impiden que las muestras avancen el espacio necesario para su correcta separación, pero también se ha probado que tiempos de corrida cortos minimizan la dispersión de la muestra y el ensanchamiento de la banda.

Temperatura

Depende básicamente del voltaje de la electroforesis, la concentración de sales (poder de conductancia) del buffer y del pH. Un aumento en la temperatura del buffer genera el efecto "sonrisa" (efecto de deformación de las bandas en forma de sonrisa) (Yábar, 2003).

1.9 Objetivos

Objetivo general: Evaluar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) si el deterioro del grano trigo afecta las proteínas de reserva industrialmente relevantes (gluten).

Objetivos particulares:

Evaluar el deterioro del grano de trigo, provocado por un almacenamiento inadecuado (25°C y 75% humedad relativa).

Determinar el efecto que produce el deterioro del grano de trigo sobre la cantidad y calidad de sus proteínas (albuminas, globulinas, gliadinas y gluteninas).

Determinar por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) si el deterioro produce cambios en el patrón electroforético de las proteínas del gluten de trigo (gliadinas y gluteninas).

Capítulo 2. Metodología experimental

2.1 cuadro metodológico

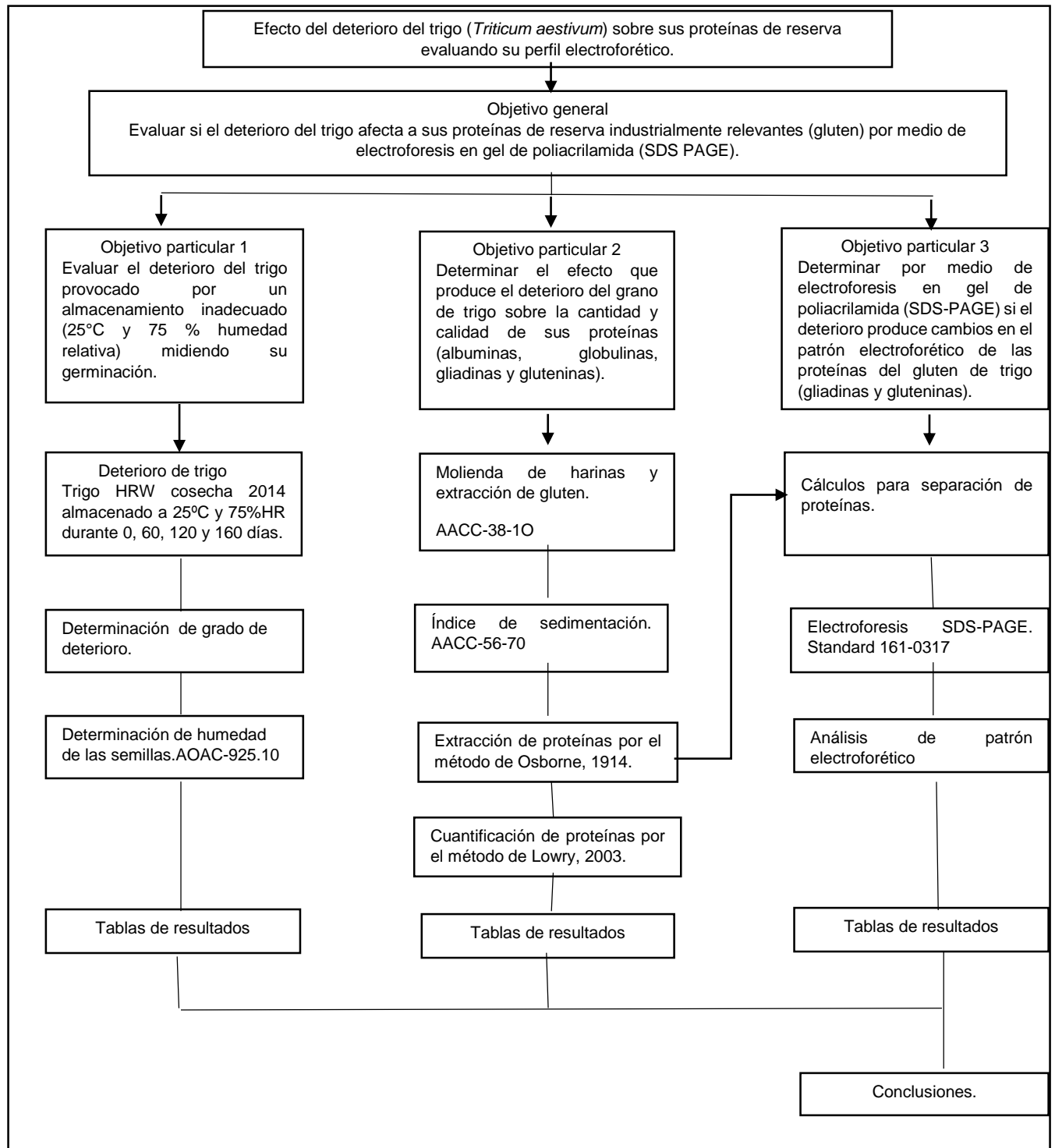


Figura 17. Cuadro metodológico

2.2 Materiales y métodos

Se trabajó con trigo HRW cosecha 2014 el cual se almacenó a 25°C y 75%HR en cajas de plástico durante 0, 60, 120 y 160 días para su deterioro, como se muestra en la figura 18, monitoreando la humedad con un higrómetro digital marca Avaly mo.VA-EDT-1-55.

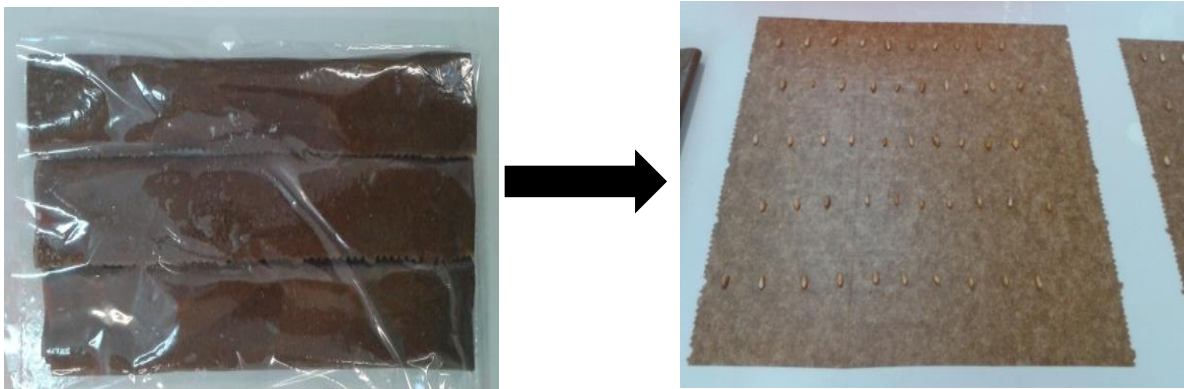


Figura 18. Trigo almacenado a 25 °C y 75% HR.

2.2 Determinación de grado de deterioro por germinación

Se midió la viabilidad de las semillas por el método AOAC-936, colocando en papel para germinación húmedo marca Deponte 50 semillas previamente desinfectadas con solución de cloro al 1%. Se enrollaron e introdujeron en bolsas de plástico. Se mantuvieron durante 4 días a 25 °C. Después de este tiempo se contaron las semillas germinadas y el resultado se expresó como porcentaje de germinación (Figura 19). El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{germinación} = 2(50 - \text{No. de semillas sin germinar})$$



A

Figura 19. Prueba de germinación del grano de trigo. A (germinación de semillas), B (conteo de semillas)

B

2.3 Determinación de humedad de las semillas

Esta se determinó por secado en estufa por el método AOAC-925.10. Se calculó el contenido de humedad gracias a la pérdida de masa de la muestra por evaporación del agua debido al calentamiento en un horno marca Oster a 103°C durante 72 horas. El cálculo se realizó con la siguiente formula expresando el resultado como porcentaje de humedad:

$$\% \text{humedad} = [(w2-w3)/w1] \times 100$$

Donde:

W1= masa de la muestra en gramos

W2=masa de la muestra húmeda en gramos

W3= masa de la muestra seca en gramos

2.3.2 Conductividad

La conductividad es la medida de la capacidad de una solución para conducir corriente eléctrica, con esto podemos conocer el número de iones que salen del grano de trigo. A altas concentraciones de iones, mayor conductividad, lo cual acompaña un mayor tránsito de iones provenientes del grano, producidos por el aumento de poros en la membrana celular, y saber si el deterioro afecta la estructura del grano de trigo. Se midió la conductividad eléctrica del agua de remojo de 1.8 g de semillas inmersas en 20 mL de agua desionizada después de reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. La medición se realizó con un conductímetro marca Conmet modelo H13299 y el resultado se expresó en microsiems (μs).

2.3.3 Molienda de harinas

Se midió una masa de 100 gr de trigo por muestra, posteriormente se muelen en licuadora Waring comercial modelo Laboratory blender y se hace pasar por una malla del número 40 USA serie Tyler (Figura 20) y se mantienen en refrigeración.



A

Figura 20. Molienda del grano.
A (molienda), B (tamizaje)

B

2.3.4 Extracción de gluten

Para la extracción de gluten por el método AACC-38-10 se midió la masa de 25 gramos de harina, a la cual se le agregaron 15 mL de agua, se mezclaron y se colocó sobre tela manta de cielo, sometiendo a lavados con agua corriente hasta obtener una masa chiclosa de color blanco-amarillento que corresponde al gluten. Posteriormente se midió la masa y se secó en el horno marca Oster a 93 °C durante 24 hrs. para deshidratarla y obtener la masa neta y así conocer el porcentaje de gluten presente en la muestra.

$$\% \text{ gluten} = [(w1)/w2] \times 100$$

Donde:

W1= masa de la muestra húmeda en gramos

W2=masa de la muestra seca en gramos

2.3.5 Índice de sedimentación

Este método AACC-56-70 consiste en medir el volumen de sedimentación de las proteínas hinchadas por absorción del agua. En una probeta de 100 mL se agregaron 20 gr de harina de trigo tamizado a través de una malla 20 USA modelo Tyler, agua y solución SDS-ácido láctico marca Meyer, se agitó, se dejó reposar y se midió el volumen de sedimentación en mililitros como se muestra en la figura 21, el cual está condicionado por la cantidad y calidad de las proteínas, ya que al ser totalmente desplegadas debido a las características detergentes del SDS la que tenga mayor calidad enlazará más agua, flotará y precipitará. Esto unido al efecto del pH impuesto por el ácido láctico, acelera o frena la velocidad de sedimentación de las proteínas en función de su calidad.

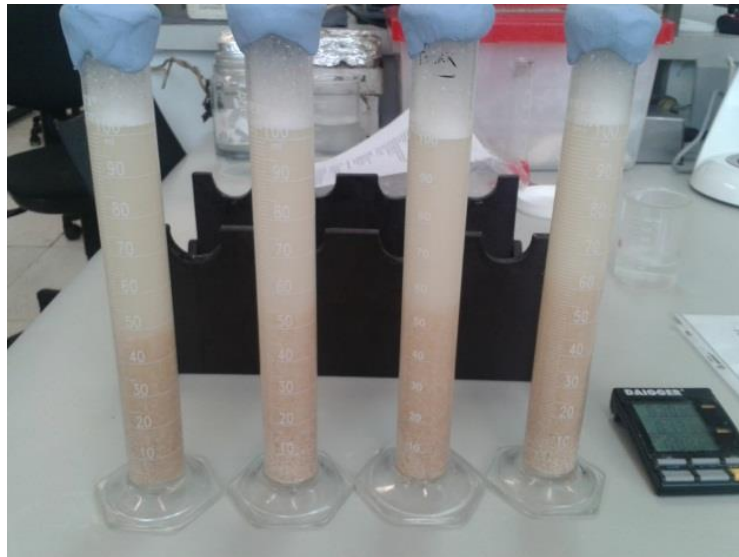


Figura 21. Medición del índice de sedimentación de harinas.

2.4 Extracción de proteínas

La extracción de las fracciones proteicas se realizó por el método de Osborne por solubilidad para obtener a las proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas y gluteninas (Figura 22). Para lo cual se midió una masa de 200 mg de harina de trigo, la cual se colocó en tubos eppendorf de 2 mL, simultáneamente se agregó 1 mL de agua desionizada, que se mezcló en vortex marca Scientific industries modelo Genie, 2 durante 5 minutos, posterior al mezclado se centrifugo a 5000 rpm/5 minutos en microcentrifuga marca Hettich zentrifugen modelo Micro 120, obteniendo la primera proteína correspondiente a albumina extrayendo 1 mL de esta fracción y dejando la pastilla en el fondo que a continuación se resuspende con 1 mL de solución tris-HCL-EDTA marca Baker a pH=7.8, mezclado y posteriormente centrifugando con las condiciones mencionadas anteriormente, obteniendo así 1 mL de globulinas solubles , posteriormente se realizó un lavado para eliminar el exceso de la solución tris-HCL-EDTA con agua desionizada mezclado y centrifugando , desechando el sobrenadante .Después del lavado se continuo con la extracción agregando 1 mL de solución de isopropanol al 50% marca Baker, se mezcló y centrifugo obteniendo 1mL de gliadinas solubles , por último se agregó 1 mL de solución de NaOH 0.1 N marca Mayer, mezclando y centrifugando para extraer 1 mL de la fracción correspondiente a gluteninas (método Osborne, 1914).

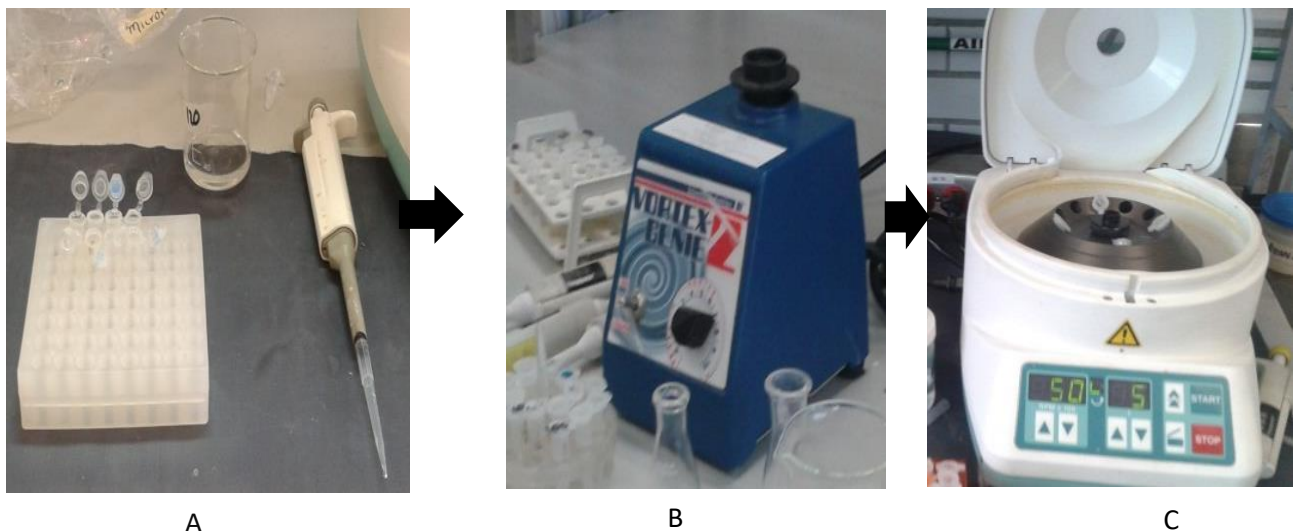


Figura 22. Extracción de proteínas por el método de Osborne. A (adición de reactivos), B (mezclado), C (centrifugado).

2.4.1 Cuantificación de proteínas

Una vez extraída la fracción proteica se procedió a cuantificar su concentración por un método espectrofotométrico utilizando la técnica de Lowry (Figura 23), en donde se forma un complejo entre las proteínas y los iones del cobre (II). El complejo se leyó a 750 nanómetros en el espectrofotómetro marca Jenway mo.genova 1709 y se realizó una curva de calibración indirecta con una solución estándar de seroalbumina bovina con un intervalo de 0 a 0.18 mg/mL de concentración, de donde se obtiene la ecuación de la recta por medio de regresión lineal entre la concentración y la absorbancia, la que servirá para conocer los miligramos de proteína por gramo de harina (método Lowry, 2003).

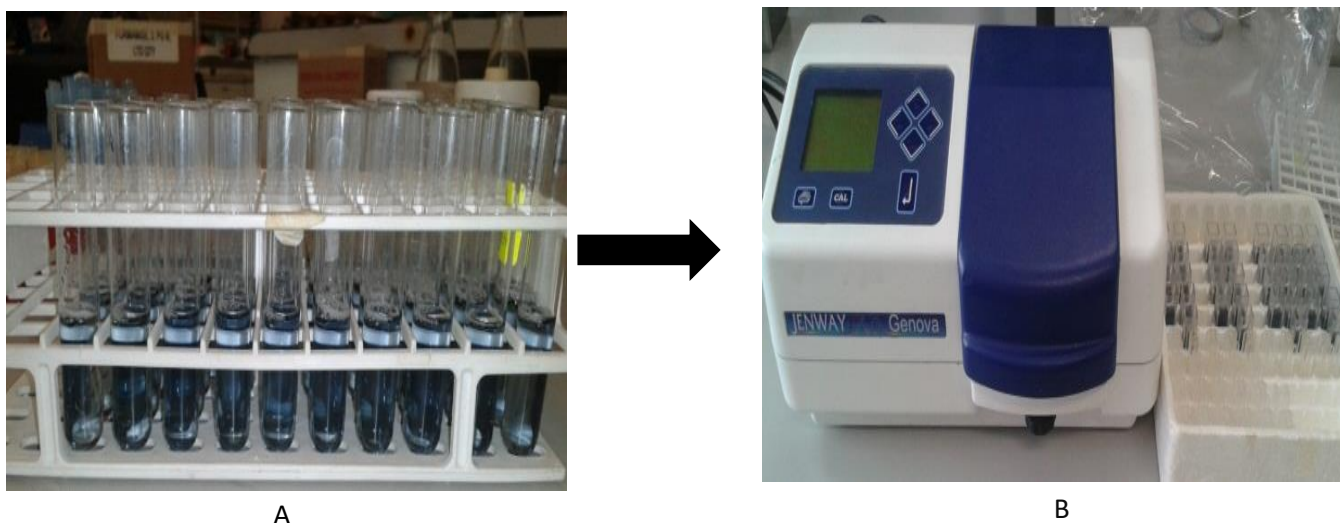


Figura 23. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.
A (complejo entre proteínas y reactivo de Lowry), B (medición de absorbancia).

2.5 Perfil electroforético

Este análisis se realiza por medio de electroforesis en gel comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis'), es sin duda una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas (Figura 24). La evaluación del perfil electroforetico se realiza en geles de poliacrilamida marca Sigma al 10 %, las muestras se corren con buffer pre-teñido marca Sigma mo. SDS-PAGE Standards #161-0318, a 60 volts durante 45 minutos y a 120 volts durante 80 minutos en cámara de electroforesis marca Bio-Rat, posteriormente se tiñe con una solución de azul de coomasie maraca Sigma, para después ser analizado en el transiluminador de luz visible marca Bio-Imaging systems mo.101-0-000, midiendo las RF's para conocer el peso molecular de las proteínas fraccionadas (método standards 161-0318).

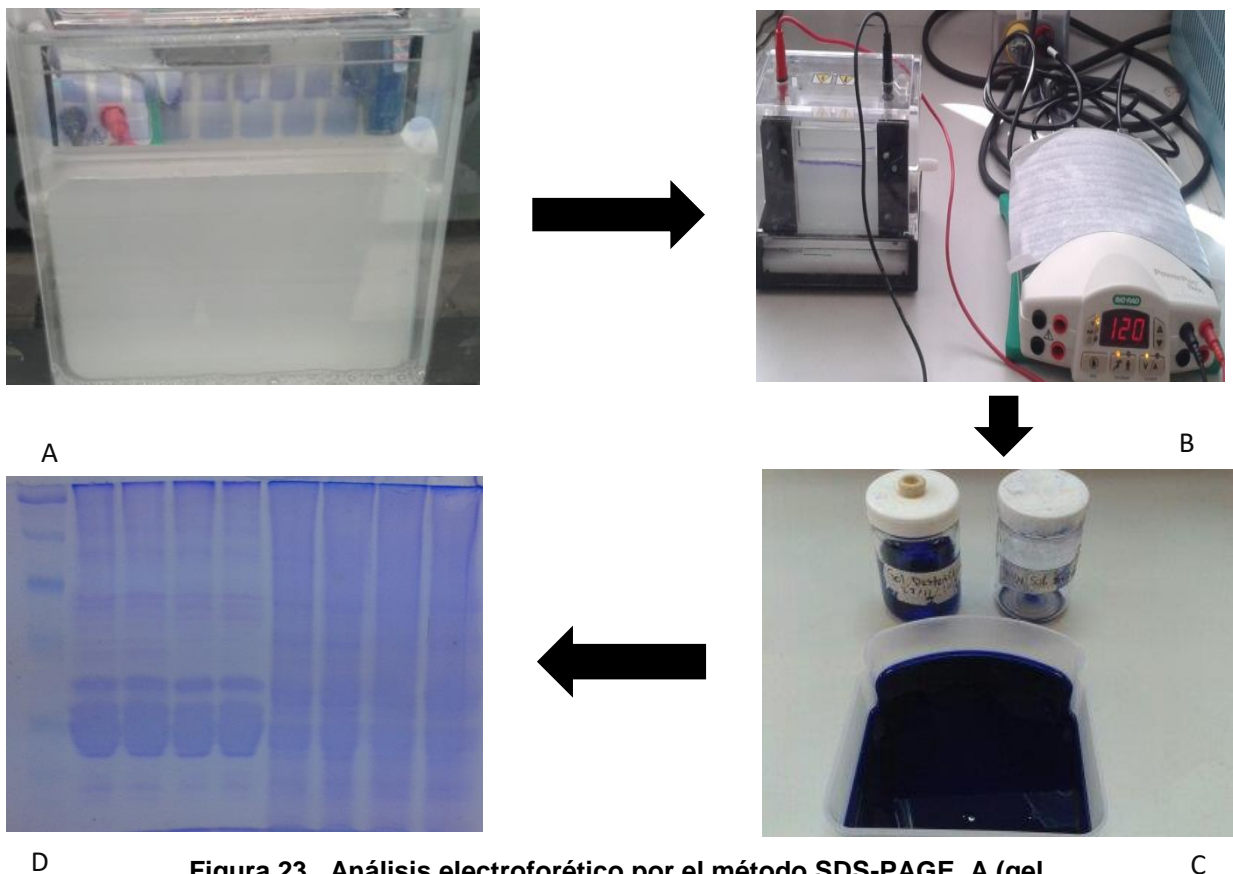


Figura 23. Análisis electroforético por el método SDS-PAGE. A (gel de poliacrilamida), B (corrimiento de muestras), C (revelado de gel), D (análisis de gel)

2.6 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico por el método de T de student ($p \leq 0.5$).

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del grado de deterioro acelerado porcentaje de germinación

Analizando el grado de deterioro se puede observar como el porcentaje de germinación va disminuyendo conforme avanzan los días de almacenamiento (Tabla 5), puesto que la calidad fisiológica de la semilla se puede conocer a través del vigor siendo la fuerza con la que la planta germina o emerge en condiciones de estrés y germinación, que es el potencial que tiene la semilla para producir plantas (Valdivia, 2001). Obtenemos como resultado la alteración fisiológica de las semillas, dejando claro que su mal almacenaje afecta su capacidad de germinación, por lo que al exponer al grano de trigo a un medio con las características de almaceno se pudo observar un deterioro gradual.

El grano de trigo está formado por tres partes principales: endospermo, salvado y germen (Serna- Saldivar, 2009). Entre el salvado y el endospermo se encuentra la capa de aleurona que cumple un papel muy importante en el desarrollo del embrión durante la germinación. El endospermo por su parte es el depósito de alimento para el embrión y constituye el 82% del peso del grano (Shewry y Halford, 2002). Por lo que el deterioro afecta de manera directa la aleurona y al endospermo, siendo estos los órganos responsables de llevar acabo la correcta germinación de la semilla (Grill y Abecassis, 2001).

3.1.2 Determinación de la conductividad de las semillas de trigo

Al exponer al grano de trigo a las condiciones de mal almacenamiento mencionadas anteriormente y observar una disminución en el grado de germinación podemos deducir que el grano sufre daños en su composición fisiológica, por lo que al determinar su conductividad se puede observar como esta va aumentando en el transcurso de los días, indicando la existencia de daño en la membrana celular (Tabla 5).

La prueba de conductividad eléctrica permite medir la lixiviación de electrolitos de tejidos vegetales siendo utilizada para semillas de algunas especies de cultivo como una prueba de rutina, permitiendo estimar la integridad de la membrana celular. La pérdida de la integridad de las membranas y la subsiguiente perdida de solutos citoplasmáticos con propiedades electrolíticas son indicativas del rápido deterioro de las semillas (Viloria y Méndez., 2011).

3.1.3 Determinación del porcentaje de humedad.

La determinación del contenido de humedad de los alimentos es una de las más importantes y ampliamente usadas en el proceso y control de los alimentos ya que indica la cantidad de agua involucrada en la composición de los mismos (Mendoza y Bautista, 2008), al observar el aumento progresivo de humedad en las semillas que van de 12.05 a 15.09% se puede deducir que las condiciones de almacenamiento dañaron sus membranas y por lo tanto existe un mayor tránsito de agua al interior de las semillas (Tabla 5).

El agua es el segundo componente cuantitativo de la harina, según la Reglamentación vigente debe de estar como máximo al 15%. La humedad que tiene el grano de trigo y consiguientemente la harina, es una característica importante particularmente en relación con la seguridad del almacenamiento de la harina, ya que si el grano no está lo suficientemente seco después de la recolección, germinará o se enmohecerá una vez almacenado. Si la recolección se produce en malas condiciones se puede secar el grano, pero si la temperatura es demasiado alta, la proteína del grano se desnaturizará de tal forma que la harina al mezclarse con agua no producirá gluten (Ferrerías., 2009).

Tabla 5. Grano de trigo con 0, 60, 120 y 160 días de deterioro y su correspondiente análisis de porcentaje de germinación, conductividad y humedad.

Muestra Grano de trigo	Germinación %	Conductividad μ S	Humedad %
Trigo control 0 días	98	343 ± 4.24 Cv=1.23	12.05 ± 0.08 Cv= 0.7
Trigo 60 días	85 ± 1.41 Cv= 1.66	451 ± 26.87 Cv=5.95	13.72 ± 0.02 Cv=0.15
Trigo 120 días	46 ± 2.82 Cv=6.14	618.5 ± 9.19 Cv= 1.18	14.25 ± 0.07 Cv= 0.49
Trigo 160 días	12 ± 2.82 Cv = 23.57	949.5 ± 27.57 Cv= 2.9	15.09 ± 0.07 Cv= 0.46

3.2 Porcentaje de gluten.

La determinación del porcentaje de gluten es uno de los aspectos más importantes a considerar en el momento de evaluar la calidad de una harina. Los resultados obtenidos al evaluar las muestras de grano deteriorado son indicativos de una posible alteración en la calidad de sus harinas, de esta forma al analizar el gluten presente en cada muestra se pudo observar como el porcentaje en la muestra húmeda va disminuyendo conforme pasa el tiempo, lo cual indica que el deterioro afecta la cantidad y calidad de proteínas de reserva en las harinas (Tabla 6). De igual manera al eliminar el agua presente en estas muestras se puede ver como disminuyen los porcentajes de gluten seco conforme transcurre el tiempo de exposición a deterioro del grano de trigo. Se puede observar como el porcentaje es más bajo en las muestras de gluten seco. Esto debido a que al aumentar la temperatura un gran número de proteínas se desnaturalizan (López, 2010).

El gluten puede ser extraído de la harina de trigo por lavado suave de la masa con exceso de agua. La mayor parte del almidón y mucha otra materia soluble son removidas por este lavado, hasta que el gluten es obtenido como una goma. La diferencia entre el peso del gluten húmedo y gluten seco, es una medida de la capacidad de enlazar agua, lo cual es también reconocida como un factor de calidad importante en el trigo (UNEY, 2005).

Tabla 6. Porcentaje de gluten obtenido de las muestras de trigo control y deterioradas.

Muestra	% gluten húmedo	% gluten seco
Trigo control	22.02 ^a	8.53 ^a
60 días de deterioro	21.46 ^a	8.26 ^a
120 días de deterioro	21.81 ^a	8.53 ^a
160 días de deterioro	20.49 ^a	7.72 ^a

*Muestras con diferente letra en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

Las propiedades del gluten son vitales para la estructura de la masa que se forma tras la hidratación y manipulación de la harina. Aunque las proteínas del gluten, glutenina y gliadina, son distintos componentes de la harina, estas proteínas interaccionan para formar el gluten durante la formación de la masa. Ningún componente por separado tiene la

capacidad para formar una masa con estructura elástica y cohesión satisfactoria por lo que se requiere de la combinación de ellas.

La formación de complejos debida a la hidratación y a la manipulación física de la harina da la formación del gluten. Estos complejos implican la rotura de algunos enlaces disulfuro y formación de nuevos enlaces, por lo tanto existe disgregación e interacciones proteína-proteína que al final forman gluten (UNEY, 2005).

3.3 Sedimentación con SDS

El índice de sedimentación se mantiene estable hasta los 120 días de deterioro, sin embargo al llegar a 160 días se observa una disminución en el índice, lo cual quiere decir que a mayor tiempo de mal almacenamiento de la semilla de trigo la calidad en la harina se ve afectada (Tabla 7). A pesar de mostrar una disminución en la muestra con 160 días, no existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Así mismo esta determinación nos da información sobre la calidad y la cantidad de las proteínas basándose en la diferente velocidad de hidratación de las proteínas del gluten. El rango de valores que se obtuvieron del volumen de sedimentación va de 37mL a 42 mL, donde los valores altos indican una mayor cantidad y calidad de proteína y por lo tanto una mayor fuerza para panificación (Carcea y col., 2006).

Tabla 7. Determinación del índice de sedimentación a partir de harina de trigo control y deteriorado.

Muestra : harina de trigo	Índice de sedimentación (ml)
Trigo control	42 ^a
69 días de deterioro	42 ^a
120 días de deterioro	42 ^a
160 días de deterioro	37 ^a

* medidas con diferente letra en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

La capacidad de sedimentación de las proteínas con SDS está condicionada por su calidad y concentración, así la muestra de mayor calidad enlazara más agua, flotara y precipitará, pero esta técnica también sugiere la capacidad de las proteínas para enlazar moléculas de agua y al disminuir el índice de sedimentación disminuye la capacidad de enlazar agua ya que la literatura afirma la probabilidad de que las proteínas de gluten forman enlaces muy fuertes que el SDS no las puede desplegar del todo y por lo tanto la cantidad de agua enlazada es poca.

Estudios previos han demostrado que el deterioro del grano disminuye la calidad de la harina para la elaboración de pan, puesto que el volumen y masa del producto final va en declive en relación a los días que el grano estuvo expuesto a las condiciones de humedad y temperatura mencionadas. Estas alteraciones producidas tienen relación directa con los resultados obtenidos a partir de las pruebas de porcentaje de gluten y sedimentación con SDS ya que ambas evalúan la calidad de la harina.

3.4 Cuantificación de proteínas a partir de harina de trigo.

Se realizó un análisis espectrofotométrico a las harinas para cuantificar la concentración proteica presente en las muestras. Se puede observar en la tabla número 7 correspondiente al análisis de harinas, que el contenido de proteínas de los cuatro grupos: albuminas no se observó diferencia significativa, globulinas mostro diferencia en 60 y 160 días, gliadinas en 60 días y gluteninas en 120 días. De igual forma el contenido de proteínas totales mostro una diferencia significativa entre los días de deterioro.

Con base en el análisis se establece que el mal almacenamiento tiene como consecuencia el deterioro, afectando de diversas maneras la calidad del grano y por supuesto a todos sus derivados, sin embargo uno de los factores más importantes para determinar el uso de la materia prima es el contenido de proteína. Es un factor importante que determina el uso final del trigo, esa misma proporción de las proteínas del gluten determina su calidad (Faergestad et al., 2000, Tronsmo et al., 2002).

Tabla 7. Cuantificación de proteínas a partir de harina de trigo control y deteriorado.

Harina de trigo	Albuminas mg/gr de harina	Globulinas mg/gr de harina	Gliadinas mg/gr de harina	Gluteninas mg/gr de harina	Proteínas totales mg/gr de harina
Control	7.64 ^a	2.41 ^a	7.23 ^a	11.35 ^a	28.63 ^a
60 días de deterioro	6.75 ^a	2.81 ^b	6.38 ^b	11.54 ^a	27.47 ^b
120 días de deterioro	6.43 ^a	2.32 ^a	7.08 ^a	12.89 ^b	28.72 ^a
160 días de deterioro	6.70 ^a	2.09 ^b	7.17 ^a	12.09 ^a	28.05 ^b

*Medidas con diferente letra en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.5$).

3.4.1 Cuantificación de proteínas a partir de gluten húmedo.

En el análisis de harinas se observó diferencia significativa entre el contenido proteico de la muestra control y las muestras expuestas a deterioro, a excepción de las albuminas, sin embargo en el análisis del gluten húmedo se puede observar una disminución en la concentración proteica del grupo de las gliadinas y de las gluteninas, así mismo una disminución en el contenido de proteínas totales, mostrando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) (Tabla 9).

En el análisis del gluten no se encuentran las proteínas de grupo de las albuminas y globulinas, esto es debido a que en la extracción del gluten se eliminan a todas las proteínas solubles.

Las gluteninas y gliadinas forman el gluten que, junto con los lípidos y el agua, son los responsables de las propiedades de visco elasticidad y cohesividad de la masa panadera. El gluten por su alto contenidos en prolina (14% del total de aminoácidos) no posee una conformación helicoidal, favoreciendo que los grupos amida de la glutamina (37 % del total de los aminoácidos) formen puentes de hidrogeno intra e inter moleculares, sumando a esto el gluten también es rico en cisteína que permite la formación de puentes disulfuro los cuales se forman durante el amasado (Wieser, 2007).

Tabla 9. Cuantificación de proteínas a partir de gluten húmedo control y deteriorado.

Gluten húmedo	Albuminas mg/gr de gluten	Globulinas mg/gr de gluten	Gliadinas mg/gr de gluten	Gluteninas mg/gr de gluten	Proteínas totales mg/gr de gluten
Control	0	0	7.13 ^a	80.40 ^a	87.53 ^a
60 días de deterioro	0	0	4.85 ^a	58.61 ^b	63.45 ^b
120 días de deterioro	0	0	3.76 ^b	73.24 ^a	77.00 ^a
160 días de deterioro	0	0	4.91 ^a	68.25 ^a	73.16 ^a

*Medidas con diferente letra en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.5$).

3.4.2 Cuantificación de proteínas a partir de gluten seco

En el análisis del gluten seco se observa una disminución en la concentración proteica de gliadinas y glutenina que tiene como consecuencia una disminución en el número de proteínas totales, en comparación con la muestra control. Así mismo podemos ver la existencia de diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en las muestras con 120 días de deterioro (Tabla 10).

Podemos observar como la concentración proteica de gluten seco es mucho menor que la concentración en gluten húmedo, esto puede deberse a que durante la extracción del gluten húmedo existe movimiento mecánico, el cual promueve la formación de enlaces como puentes de hidrogeno y enlaces disulfuro, que al momento de someterse a altas temperaturas para su deshidratación estas se rompen, degradando cadenas peptídicas y dejando solo los enlaces más fuertes. Por esta razón es que la cantidad de gluten seco es menor.

Debido a que la calidad panadera está asociada con la presencia de grandes agregados proteicos, es esencial estimar el rango de tamaño de estos agregados y determinar las proporciones de las proteínas del gluten presentes en la harina o en el grano.

Tabla 10. Cuantificación de proteínas a partir de gluten seco control y deteriorado

Gluten seco	Albuminas mg/gr de gluten	Globulinas mg/gr de gluten	Gliadinas mg/gr de gluten	Gluteninas mg/gr de gluten	Proteínas totales mg/gr de gluten
Control	0	0	1.47 ^a	23.88 ^a	25.35 ^a
60 días de deterioro	0	0	0.85 ^a	21.61 ^a	22.46 ^a
120 días de deterioro	0	0	0.65 ^b	20.40 ^b	21.05 ^b
160 días de deterioro	0	0	1.06 ^a	23.33 ^a	24.39 ^a

*Medidas con diferente letra en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.5$).

3.5 Perfiles electroforéticos

3.5.1 Evaluación de harinas: albúminas y globulinas

La caracterización del perfil electroforético de las proteínas de los grupos albuminas y globulinas no mostraron variación alguna manteniendo el mismo bandeo tanto en la muestra control así como en las muestras deterioradas, por lo tanto se puede observar que el deterioro no afecta a estas proteínas a nivel estructural (Figura 25). En este proyecto solo se analizaron aquellas proteínas que sufren modificaciones en su bandeo electroforético, por lo cual no se calculó el peso molecular del grupo de albuminas y globulinas (Tabla 11).

Existen diferentes criterios que han sido utilizados para clasificar las proteínas del trigo, basados en su solubilidad, similitud química o similitud genética. Desde el punto de vista funcional, las proteínas del trigo son divididas en dos clases principales: proteínas monoméricas y proteínas poliméricas, donde las últimas consisten de polipeptidos individuales unidos por enlaces disulfuro (Gianibelli et al., 2001; Rhazi et al., 2003). Tanto las albuminas como las globulinas no forman parte de las proteínas de almacenamiento del grano de trigo si no que ambas son estructurales y de función metabólica para la planta de

trigo, así mismo no pueden interaccionar entre ellas puesto que su función no depende del movimiento mecánico.

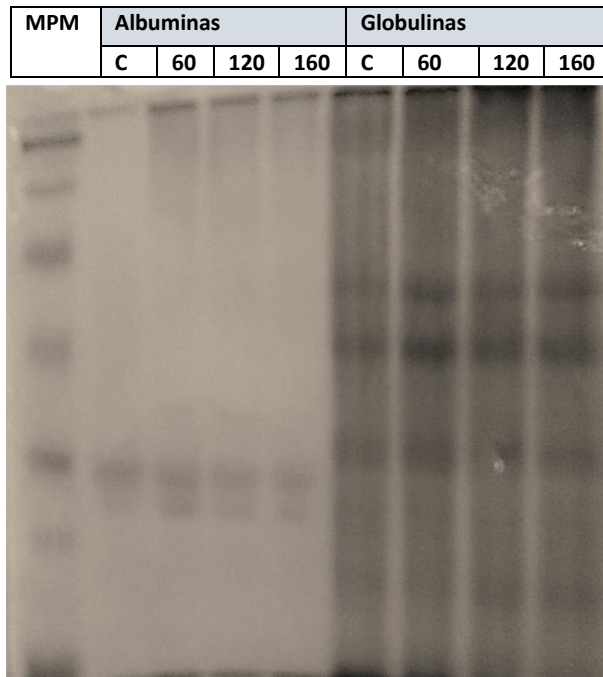


Figura 25. Gel correspondiente a las muestras obtenidas de la harina de trigo. Albuminas y globulinas, la subunidades de estas proteínas no sufren cambios estructurales tras someter el grano de trigo a deterioro. MPM (marcador de peso molecular), C (control), 60, 120,160(días de deterioro).

Tabla 11. Análisis de proteínas en harinas. Identificación de modificaciones estructurales por medio del peso molecular (Da.) de las subunidades proteicas de albuminas y globulinas.

Proteína	Albumina (Daltons)	Globulinas (Daltons)
Banda	Sin cambios	Sin cambios

3.5.2 Evaluación de harinas: gliadinas y gluteninas

El análisis de las proteínas pertenecientes al gluten muestra en mayor número modificaciones en el perfil electroforético de las gliadinas puesto que su cantidad de bandas va desapareciendo conforme aumenta el tiempo de exposición del grano a deterioro (Figura 26). En la tabla 12 se muestra como las subunidades A, B, C y D de gliadinas van desapareciendo gradualmente, mientras que en las gluteninas se observa la aparición de la banda A. Dadas las condiciones de almacenamiento del trigo, sus proteínas disminuyen tanto en calidad como en cantidad, así mismo puede incitar a la degradación de sus componentes proteicos. En general las proteínas que poseen enlaces disulfuro en su estructura no se digieren, y aquellas que son digeridas producen mezclas de péptidos muy complejas (Morales, 2006). Por esta razón se puede observar la pérdida y aparición de bandas en el grupo de gliadinas y gluteninas correspondientemente.

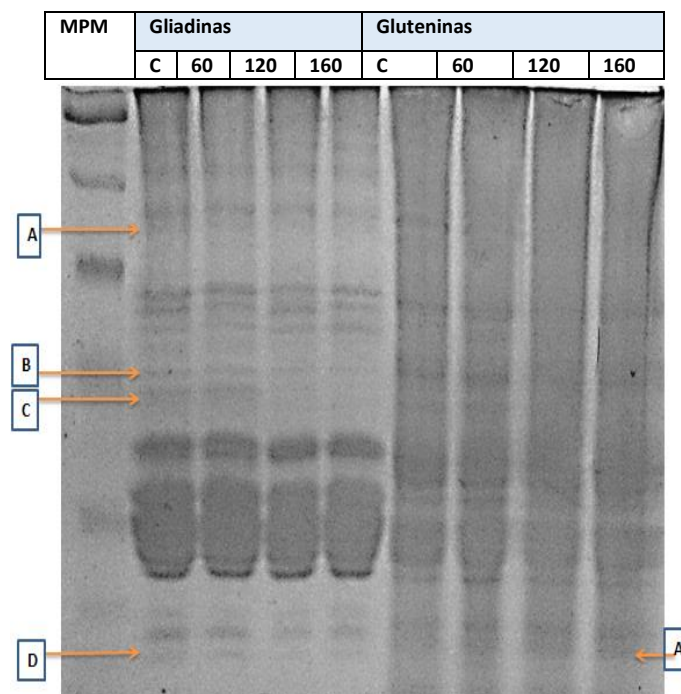


Figura 26. Gel correspondiente a las muestras obtenidas de la harina de trigo. Gliadinas y Gluteninas, se puede observar la existencia de modificaciones estructurales en las subunidades de estas proteínas tras someter el grano de trigo a deterioro. MPM (marcador de peso molecular), las letras A-D indican bandas modificadas, C (control), 60,120, 160(días de deterioro).

Tabla 12. Análisis de proteínas en harinas. Identificación de modificaciones estructurales por medio del peso molecular (Da.) de las subunidades proteicas de Gliadinas y Gluteninas.

Proteína Banda	Gliadinas (Daltons)	Gluteninas (Daltons)
A	109,647.810	14,757.085
B	65,623.928	
C	48,752.849	
D	14,190.575	

3.5.3 Evaluación de Gluten húmedo: gliadinas y gluteninas

El bandeo electroforético de las gliadinas y gluteninas extraídas a partir de gluten húmedo que se observa en la figura 27 tuvo diferente comportamiento al bandeo de las mismas proteínas extraídas de la harina ya que en gluten húmedo se observa un mayor número de bandas modificadas.

El mezclado es la primera etapa en panificación y durante ella ocurren cambios importantes en las propiedades reológicas de la mezcla. Las partículas de harina se hidratan y se desarrolla el gluten. Las cadenas poliméricas de las gluteninas están primero orientadas en forma completamente aleatorias unas con otras. Sin embargo, existe una interacción entre ellas a través de enlaces no covalentes débiles (Hevia, 2002).

Durante el mezclado existe mayor interacción entre estas proteínas, por lo que las subunidades de gliadinas separadas posiblemente por la degradación debido al proceso de deterioro, se unen a las cadenas poliméricas de las gluteninas, formando así nuevas bandas y a la vez cadenas más largas como en el caso de las subunidades A y B de la tabla número 13.

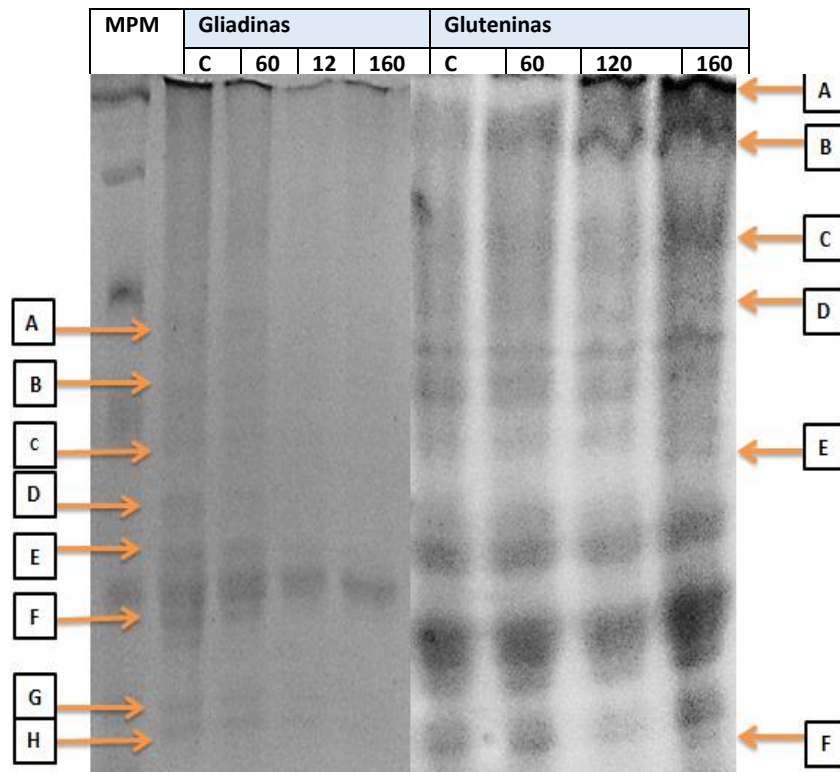


Figura 27. Gel correspondiente a las muestras obtenidas a partir de gluten húmedo. Gliadinas y Gluteninas, se puede observar la existencia de modificaciones estructurales en las subunidades de estas proteínas tras someter el grano de trigo a deterioro. MPM (marcador de peso molecular), las letras A-H indican bandas modificadas de gliadinas y A-F bandas modificadas de gluteninas, C (control), 60, 120, 160(días de deterioro).

Tabla 13. Análisis de proteínas en Gluten húmedo. Identificación de modificaciones estructurales por medio del peso molecular (Da.) de las subunidades proteicas de Gliadinas y Gluteninas.

Proteína \ Banda	Gliadinas (Daltons)	Gluteninas (Daltons)
A	76,383.578	201,372.425
B	61,052.014	167,109.061
C	46,881.338	110,917.481
D	36,192.618	82,224.264
E	32,284.941	46,881.338
F	23,067.471	14,757.065
G	15,885.467	
H	14,190.575	

En la extracción de proteínas a partir de gluten húmedo se puede observar como las subunidades correspondientes a gliadinas van desapareciendo gradualmente, mientras en el perfil electroforético de las gluteninas nuevas subunidades se van formando.

3.5.4 Evaluación de gluten seco: gliadinas y gluteninas

En la extracción proteica a partir de gluten seco se puede observar una disminución en el número de bandas tanto de gliadinas como de gluteninas, sin embargo se puede apreciar como las subunidades A y B de gliadinas van desapareciendo gradualmente, mientras que en las gluteninas se observa la aparición de las bandas A y B (Figura 28). En la tabla número 14 se muestra el peso molecular de las subunidades de gliadinas y gluteninas que mostraron modificación.

Con este resultado podemos concluir que la degradación y el movimiento mecánico en el momento de la extracción del gluten, favorece la formación de diferentes tipos de enlaces, que al momento de someterse al secado solo los enlaces más fuertes son los que siguen presentes en el gluten seco.

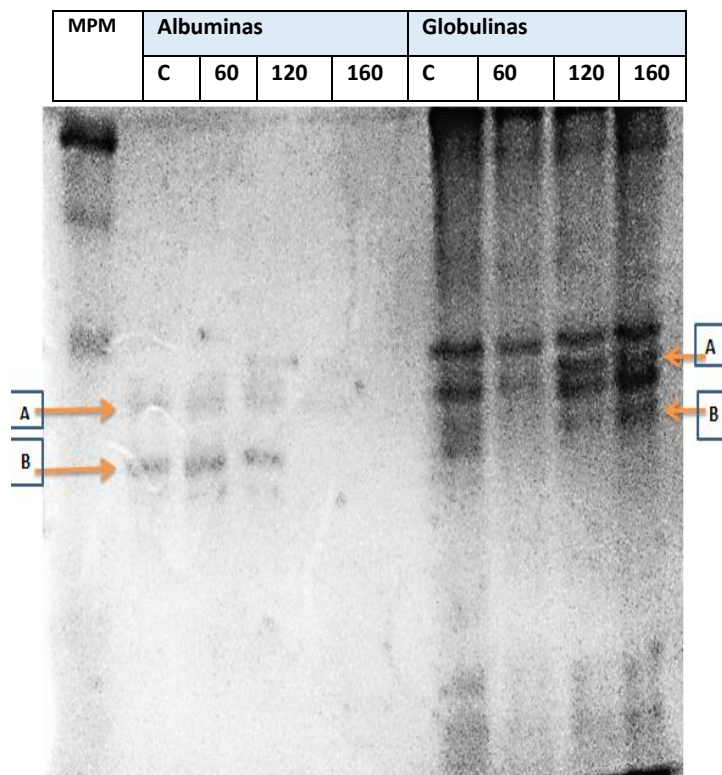


Figura 28. Gel correspondiente a las muestras obtenidas a partir de gluten seco. Gliadinas y Gluteninas, se puede observar la existencia de modificaciones estructurales en las subunidades de estas proteínas tras someter el grano de trigo a deterioro. MPM (marcador de peso molecular), las letras A-B indican bandas modificadas, C (control), 60, 120, 160 (días de deterioro).

Tabla 14. Análisis de proteínas en Gluten seco. Identificación de modificaciones estructurales por medio del peso molecular (Da.) de las subunidades proteicas de Gliadinas y Gluteninas.

Banda \ Proteína	Gliadinas (Daltons)	Gluteninas (Daltons)
A	52,480.746	70,794.578
B	46,881.338	63,241.185

Tanto las harinas como los dos tipos de gluten (húmedo y seco) muestran un comportamiento similar al disminuir el número de subunidades por parte del grupo de las gliadinas y la aparición de nuevas bandas por el lado de las gluteninas.

Esto puede deberse a que las condiciones de deterioro favorecieron a la degradación de las gliadinas y la separación de sus subunidades α - β - γ - ω , que al ser sometidas al movimiento mecánico durante su extracción formo enlaces disulfuro y enlaces disulfuro impares que les permite establecer puentes intercatenarios (en el caso de las ω -gliadinas) con las subunidades HMW-GS y LMW-GS de las gluteninas, por lo cual el número de bandas pertenecientes a gliadinas disminuye, mientras que el número de bandas en el perfil de gluteninas aumenta.

Los numerosos parámetros relacionados a la composición proteica que determinan la calidad panadera pueden ser una guía para seleccionar características específicas en los programas de mejoramiento de trigo (Cuniberti *et al.*, 2003).

Conclusiones

Se determinó el grado de deterioro, evaluando el porcentaje de germinación, donde se pudo observar como el grano pierde la capacidad de germinar, conforme avanzan los días de almacenamiento inadecuado, con esto podemos deducir que el grano sufre daños en su composición fisiológica, lo cual se corroboró al determinar su conductividad, mostrando un aumento gradual con relación a los días de deterioro, indicando la existencia de daño en la estructura celular del grano. El aumento progresivo de humedad en la muestra, es indicativo de que existe un mayor tránsito de agua al interior del grano. Con el aumento de la conductividad y humedad, se puede concluir que el mal almacenamiento daña la membrana celular del grano.

La determinación del porcentaje de gluten muestra una alteración en la calidad de las harinas provenientes del trigo deteriorado, mostrando disminución del porcentaje de gluten conforme avanzan los días de deterioro. La capacidad de sedimentación está condicionada por la calidad de las proteínas, así una muestra de poca calidad enlaza menos agua, esto se observa en la harina proveniente del trigo de mayor tiempo de deterioro, concluyendo que a mayor tiempo de almacenamiento inadecuado la calidad de la harina se ve afectada. Con la cuantificación de proteínas se pudo determinar la existencia de una variación en la concentración de las proteínas presentes en las harinas de trigo deteriorado. El análisis proteico del gluten muestra la disminución de la concentración de gliadinas, gluteninas y proteínas totales, con relación al gluten de trigo sano. Este análisis corrobora que el deterioro del grano de trigo no solo afecta la calidad de la harina, sino también la cantidad de sus proteínas.

La evaluación del perfil electroforético de las proteínas extraídas de la harina, pertenecientes al grupo de las albuminas y globulinas no mostraron variación alguna, manteniendo el mismo bandeo tanto en muestra control así como en las muestras deterioradas, sin embargo las gliadinas y gluteninas muestran modificaciones en su perfil electroforético, puesto que en las gliadinas se observa la pérdida de bandas conforme aumenta el tiempo de deterioro del grano, mientras que en las gluteninas se observa la formación de nuevas bandas. El perfil electroforético del gluten húmedo y seco mostro el mismo comportamiento, ya que también se observa la pérdida de bandas correspondientes a gliadinas y la aparición de bandas de gluteninas, sin embargo el número de modificaciones en gluten húmedo es mayor, debido al movimiento mecánico que hay durante la extracción del gluten, haciendo que exista mayor interacción entre las proteínas, donde las subunidades de gliadinas

separadas por la degradación se unen a las cadenas poliméricas de las gluteninas, formando un mayor número de bandas. Con las proteínas del gluten seco el número de bandas es menor, puesto que al secar el gluten este se sometió a una temperatura de 93 °C, provocando la ruptura de cadenas poliméricas, dejando solo las subunidades con enlaces más fuertes. Concluyendo que el deterioro afecta a las proteínas de reserva, provocando la ruptura de cadenas polipeptídicas de las proteínas del gluten, induciendo a la pérdida de bandas por parte de las gliadinas y que el movimiento mecánico favorece la formación de enlaces para formar nuevas bandas en las gluteninas.

Recomendaciones

Identificar el efecto que el deterioro tiene sobre las cadenas polipeptídicas de las proteínas del gluten es un parte aguas en el estudio molecular de las proteínas de reserva del trigo y su relación con el mal almacenamiento, por lo tanto es necesario profundizar el estudio de las gliadinas y gluteninas. Cuantificar la concentración de subunidades modificadas por el deterioro es el siguiente paso para conocer el comportamiento que existe entre las subunidades de las proteínas del gluten sometidas a deterioro, así un análisis por medio de HPLC ayudara a entender el porcentaje de subunidades que se van perdiendo y formando conforme transcurre el tiempo de deterioro.

En este trabajo se demostró que el mal almacenamiento tiene repercusiones en la calidad y cantidad de proteínas obtenidas a partir de trigo (*Triticum aestivum*) HRW, del cual se extrae harina para producción de pan. Apoyado por estudios anteriores se puede deducir que el trigo HRW deteriorado no cumple con las características de una harina panadera. Por lo que es sumamente importante analizar las características reológicas de la harina de trigo deteriorado, para elaborar otro tipo de productos que no necesitan de una masa extensible si no fuerte y de esta manera no desperdiciar el trigo que ya no es útil para producir pan.

Referencias

1. Arenas S. I., López S. J, (2004), "Métodos de laboratorio: espectrofotometría de absorción". Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Altenbach, S.B, Dupont, F.M, Kothari, chan, R. (2003). Temperature, water and fertilizer influence the timing of key events during grain development in US Spring Wheat. *Journal of cereal science*. 37, 9-20.
3. Badui, S. (2013). *Química de los alimentos* (5ª. Ed). México, Pearson.
4. Bloomberg Bussines, Distribución geográfica del trigo < www.bloomberg-bussines.com/trigo> (03 de Septiembre de 2015).
5. Bottalico, A y Perrone, G (2002). "Toxigen Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small grains cereals in Europe". *European Journal of plant pathology*.
6. CANIMOLT, Morfología de la planta de trigo, :< www.canimolt.org/trigo/morfologia> (Enero 2017).
7. Carceller, J.L., and T. Aussenac. (1999). Accumulation and changes in molecular size distribution of polymeric proteins in developing grains of hexaploid wheats: role of the desiccation phase. *Aust. J. Plant Physiol*. 26:301-310.
8. CONCYTEG, (2017), "Metodología de extracción y purificación de inhibidores de proteasas en *Opuntia streptacantha*" <www.concyteg.gob.mx> (enero, 2017).
9. Cuniberti, M.B. (2003). "Factores que inciden en la expresión de la calidad". Información técnica INTA Rafaela. Miscelánea N°4 pág 1-6.
10. D'Ovidio R., Masci S. (2004), The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal cereal sci*. 39:321-339.
11. Erdman, A.R (2004). *Insecticides*. En R. C., Dart, *Medical toxicology* (3ª. Ed.). Philadelphia.
12. Espi Plaza A. (2013) tesis doctoral universidad politécnica de Madrid. "Estudio molecular de gluteinas de alto y bajo peso molecular en *triticum aestivum* ssp. Y su relación con la calidad panadera".
13. FAO, "Lista de control de los problemas y las soluciones según la etapa de crecimiento" Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <www.fao.org> AMIS, Market Monitor (Julio 2015).
14. Ferreras Charro R. (2009), "Análisis reológico de las diferentes fracciones de harina obtenidas en la molienda del grano de trigo". Escuela politécnica superior de Zamora.
15. Gaido, Z.A. y Dubois, M.E., (2008). "Influencia Del estrés térmico en La calidad panadera Del trigo: progenies con diferentes niveles de sensibilidad". *Agriscientia*, Vol. XXV (2):89-96
16. García HM, (2000). "Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem". [Tesis de Maestría.] Facultad de Biología UH.
17. García A. H, Vázquez D. R (1999), "Cuantificación de proteínas: una revisión," Instituto de biotecnología UNAM.

- 18.** Gianibelli, M.C., Larroque, O.R., MacRitchie, F. y Wrigley, C.W. (2001). Review: Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem.* 78:635-646.
- 19.** Gómez-Pallares, M., Leon, A.E. y Rosell, C.M. (2007). Trigo, de tales granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica (Capítulo 1, pag. 17-72). Córdoba, Argentina.
- 20.** Goesaert, H., Bris, K., Veraberbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K. and Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 12-30
- 21.** Hames BD, Ricwood D (2002): "Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach", 3ª ed. Oxford University Press.
- 22.** Hosney, Carl (1991) Principles of Cereal Science and Technology y American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota. ISBN 84-200-0700-X.
- 23.** Juárez Z.N (2014), "El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento". Universidad de las Américas Puebla.
- 24.** Labuschagne, M.T., E. Koen, and T. Dessalegn. 2004. Use of size-exclusion high-performance liquid chromatography for wheat quality prediction in Ethiopia. *Cereal Chem.* 81:533-537.
- 25.** Larroque, O.R., M.C. Gianibelli, M. Gomez Sanchez, and F. Macritchie. (2000). Procedure for obtaining stable protein extracts of cereal flour and whole meal for size-exclusion HPLC analysis. *Cereal Chem.* 77:448450.
- 26.** Lenonte B., (2002), "Electroforesis en gel de poliacrilamida, Inmunología general: manual de laboratorio".
- 27.** Liddell, C. M. (2003), "systematics of Fusarium species and allies associated with Fusarium head blight". En K.J.
- 28.** López B., (2010), Estructura de las proteínas. Estabilidad conformacional y adaptabilidad, desnaturalización de las proteínas. cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA
- 29.** Magan, N, Hope, R, Cairns, V y Aldred, D (2003). "Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain". *European journal of plant pathology*.
- 30.** Magaña, (2005) Revisión bibliográfica: el trigo.
- 31.** Maldonado Alconada A., Jorin Novo J. (2005). "Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida". Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*.
- 32.** Marilín H. García Pérez. (2001), "Electroforesis en gel de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia." Laboratorios BETERÁ. Calle 102 e/ 31 y 31-B. Marianao. Ciudad de La Habana.
- 33.** Mauger D., Conforte V. (2006). Determinación de proteínas, Trabajo de laboratorio n.1

- 34.** Martínez, C. E., E. Espitia R., I. Benítez R., R. J. Peña B., A. Santacruz, V., y H. E. Villaseñor M. (2007). “Efecto de gluteninas de alto peso molecular de los genomas A y B sobre propiedades reológicas y volumen de pan en trigos harineros”. *Agrociencia* 41: 153-160.
- 35.** Menniti, A.M., Pancaldi, D., Maccaferri, M y Casalini, L. (2003). “Effect of fungicides on Fusarium head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain”. *European journal of plant pathology*.
- 36.** Morris, C. (2002). Puroindolines: The molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.*, 48, 633-647.
- 37.** Perez Chabela M., Soriano Santos J., Ponce Alquicira E., (2015). “Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta para el estudio de las proteínas miofibrilares”.
- 38.** Pubchem, Estructura molecular de la gliadina. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>> (Febrero 2017).
- 39.** Postcosecha, factores que afectan al trigo < www.postcosecha.net>, (enero 2017).
- 40.** Revista ciencias, Productos derivados del trigo <www.revistaciencias.com/publicaciones>, (diciembre 2016).
- 41.** SAGARPA (2005). Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional.
- 42.** Sánchez Nieto S., Greaves Fernández N., (2013). Material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental. Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, UNAM.
- 43.** Serna-Saldivar, SRO (2009). “Química, almacenamiento e industrialización de los cereales”. México D.F. Editorial AGT.
- 44.** Singh, N. K., K. W. Shepherd, and G. B. Cornish. (2003). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.* 14: 203-208.
- 45.** Shewry, P.R.; Haldford, N.G.; Tatham, A.S (2003). The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, v.45, p.219-302.
- 46.** Souza, E.J.; Martin, J.M.; Guttieri, M.J.; O'brien, K.M (2004). Influence of genotype, environment, and nitrogen management on spring wheat quality. *Crop Science*, v.44, p.425-432.
- 47.** Stengleins, S. A. (2009) “Fusarium poae: A pathogen that needs more attention”. *Journal of plant pathology*.
- 48.** Trucksess, M.W. (2012). “Aflatoxins. En FDA (Food and Drug Administration), Bag bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins”. United states of america: FDA.
- 49.** USDA Foreign Agricultural Service < www.usda.org> 27 de marzo del 2015).

- 50.** Veggiemeat. Estructura del grano de trigo, <www.veggiemeat.com.mx>, (noviembre 2016)
- 51.** Vilorio H., Méndez J. R., (2011), “Relación entre la conductividad eléctrica, pH del agua de remojo, germinación de semillas y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) Bajo dos condiciones experimentales”. Departamento de ciencias, unidad de estudios básicos universidad de oriente. Venezuela
- 52.** Villanueva Flores R. (2014), “El gluten del trigo y su rol en la industria de la panificación”. Universidad de Lima.
- 53.** Westermeier R. (2001): “Electrophoresis in Practise”, 3^a ed. WILEY-VCH Verlag GmbH Weinheim, Alemania.
- 54.** Yábar Varas C. (2003), “Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN, Ministerio de salud,” Instituto nacional de salud.