

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROTEINAS DE HARINAS DE DISTINTAS VARIEDADES DE TRIGO CON DIFERENTES POTENCIALES DE PANIFICACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A

ELSA CONCEPCION MUÑOZ LOZANO

MEXICO, D. F.

1972

6

3

8



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.

A DIOS

A mis padres:

CARLOS y VICTORINA

A mis hermanos:

ROSALBA, CARLOS, AMALIA,
ANGEL y ARCELIA

*"Símbolo de los
valores más sólidos
de mi vida"*

*Con la más pura expresión de mi
caríño y agradecimiento.*

A la memoria de mi abuelita

AMALIA

A MIS FAMILIARES

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS

"Al recuerdo imborrable de mis años de estudiante, mis mejores años; transcurridos sobre la base de la confianza - en la amistad y solidaridad humanas"

Con el deseo de que mi vida sea una manifestación de los valores que en ellos conocí, la culminación de los esfuerzos depositados, y la realización de los ideales que ahí germinaron

Durante la realización de esta tesis, conté con la colaboración de innumerables personas, a las cuales deseo hacer patente mi agradecimiento; muy especialmente a la Prof. Q.F.B. y M.C. Angela Sotelo López y al Dr. Víctor Aleman Aleman, de quienes recibí el más intenso estímulo, orientación y ayuda - ilimitada.

Vaya pues, desde aquí, mi eterno reconocimiento.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Prof.	ENRIQUE GARCIA GALEANO
VOCAL:	Prof.	NINFA GUERRERO
SECRETARIO:	Prof.	ANGELA SOTELO LOPEZ
1er. SUPLENTE:	Prof.	ENRIQUE FUENTES CACERES
2do. SUPLENTE:	Prof.	MARIO LOPEZ LIRA

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:

"HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO", DEPARTAMENTO DE NUTRICION II Y "CENTRO MEDICO NACIONAL", DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA, DIVISION DE NUTRICION, I.M.S.S.

SUSTENTANTE:	ELSA CONCEPCION MUÑOZ LOZANO
ASESOR:	Q.F.B. Y M.C. ANGELA SOTELO LOPEZ
SUPERVISOR TECNICO:	DRA. MARGARITA ESCOBEDO G.

C O N T E N I D O

CAPITULO		PAG.
I	INTRODUCCION	1 - 2
II	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	3 - 16
III	MATERIAL Y METODOS	17 - 27
IV	RESULTADOS Y DISCUSION	28 - 62
V	CONCLUSIONES	63 - 66
VI	BIBLIOGRAFIA	67 - 70

I INTRODUCCION

Estudios realizados en el Hospital Infantil de México parecen indicar que la intolerancia que presentan los niños celíacos, hacia el gluten de las harinas de trigo comunmente usadas para la fabricación de pan - (5), no se manifiesta cuando a estos mismos se les proporcionan alimentos elaborados con una harina de trigo de la variedad llamada "Barrigón Bajío" o "Barba Negra", diferente en calidad y usos a las primeras.

Fue así como se inició el estudio de esta variedad de trigo, así como de otras con propiedades similares o diferentes, pero enfocando la perspectiva del trabajo hacia el aspecto comparativo de las proteínas que constituyen las harinas.

En el presente trabajo se utilizan las técnicas de Cromatografía en Columna de Sephadex G-200 y Electroforesis en Gel de Acrilamida, con el fin de obtener datos que podrían conducir a un mejor entendimiento de las interrelaciones entre las diferentes proteínas que constituyen las harinas, sus propiedades y su influencia sobre las características y diferencias en la calidad y uso de cada una de ellas.

II ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

GENERALIDADES (19)

Origen del Trigo. El trigo es una planta gramínea del grupo de los cereales, debe su nombre al latín *Triticum* y es llamada científicamente *Triticum vulgare*. Se originó en el Sudeste de Asia y Noroeste de África; desde la Meseta de Anatolia hasta los contrafuertes del Himalaya, en cuanto se refiere a los trigos suaves; los trigos duros, según opiniones autorizadas provienen de las regiones de la Cuenca del Mar Mediterráneo o de las llanuras de Etiopía. Es decir, que su origen se encontraría probablemente en Egipto, en Palestina y en Hysa, en las orillas del Jordán, donde crecía diseminado, hasta que se comenzó a cultivar en los Bakires de Persia, en China, Babilonia, Sicilia y en la India, pero parece ser que Egipto fué el primero que lo cultivó.

Clasificación. Varias especies de trigo fueron agrupadas por Hackel como sigue:

<u>Género</u>	<u>Especie</u>
<i>Triticum</i>	<i>vulgare</i>
<i>Triticum</i>	<i>durum</i>
<i>Triticum</i>	<i>compactum</i>
<i>Triticum</i>	<i>turgidum</i>
<i>Triticum</i>	<i>decocum</i>
<i>Triticum</i>	<i>spelta</i>
<i>Triticum</i>	<i>polonicum</i>
<i>Triticum</i>	<i>monococum</i>

Industrialmente se clasifican según su textura en la molturación

en: duros, semiduros o blandos.

Constituyentes. El grano del trigo se encuentra constituido en su mayor parte por el gluten que contiene el núcleo (80-85%) del grano, dependiendo, por lo tanto, de éste su clasificación. Dicho núcleo contiene minúsculos granos de almidón rodeados de las sustancias proteicas que lo integran; el pericarpio (14-18%) del grano y el germen (1-2%) de la masa total del grano.

Cultivo. Los requerimientos o factores necesarios para que el trigo pueda adaptarse a cualquier medio son los siguientes:

1. Patrimonio genético.
2. Medio Ambiente.
3. Cuidados al cultivo.

Ocupa un lugar preponderante el factor patrimonio genético, y es en México el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), quien se ha preocupado principalmente del cumplimiento de estos factores para el desarrollo de nuevas variedades.

Composición Química. La composición química del grano varía según su especie, lugar de siembra, humedad, nutrientes, época de cosecha, conservación y otros factores; pero en términos generales, su composición es la siguiente: agua, 12%; carbohidratos, 70%; proteínas, 12%; lípidos, 1.5%; sales minerales, 1.5% y celulosa, 3%. Contiene además una proporción pequeña de vitaminas E, C y del complejo B; así como algunos fermentos que influyen en la alimentación humana y en la conservación del cereal.

Criterio de calidad. En la química de los cereales se usa el término "calidad" para describir la adaptación de una harina de trigo para producir productos finales tales como: pan, pastas, pasteles, macarrones, cereales, etc., o sea que está íntimamente ligada al uso final que se le dé, y sus características que presentan en la panificación dependen de varios factores, incluyendo la variedad del trigo, desarrollo y condiciones bajo las cuales creció, proceso usado para moler la harina, la composición química y estructura de los componentes del trigo.

Se acepta en general que el valor de una harina de trigo para un proceso particular, depende del contenido de proteína y de las propiedades reológicas del gluten (19, 20).

Para determinar la calidad de las harinas, relacionadas principalmente a la proteína del "gluten", las masas respectivas se someten a varias pruebas físicas y de comportamiento, entre las que se encuentran el alveograma, mixograma, pruebas de elasticidad y extensibilidad, la prueba de Pelshenke y pruebas de panificación para medir el volumen del pan. Según el resultado de estas pruebas y en base a su habilidad para la manufactura de productos finales, los trigos comunes o vulgares se clasifican en 2 grupos: duros o fuertes y suaves o débiles. Las harinas de los trigos fuertes, contienen relativamente un alto porcentaje de proteínas que forman un gluten elástico y fuerte de buenas propiedades de retención de gas y que producen pan de excelentes propiedades. Las harinas suaves o débiles tienen un relativo bajo contenido de proteína y forman un gluten débil, poco elástico y de pobres propiedades de panificación produciendo masas de calidad inferior.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS, S. A. G.
LABORATORIO DE FARINOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE CEREALES

CLASIFICACION DE LAS VARIEDADES DE TRIGO CON BASE EN LA CALIDAD DEL GLUTEN
SEGUN REQUERIMIENTOS DE LA INDUSTRIA DE LA PANIFICACION. 1970.

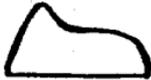
Grupo 1 FUERTES F	Grupo 2 MEDIO FUERTES M	Grupo 3 SUAVES S	Grupo 4 TENACES T	Grupo 5 CRISTALINOS C
FORMA DEL ALVEOGRAMA: 	FORMA DEL ALVEOGRAMA: 	FORMA DEL ALVEOGRAMA: 	FORMA DEL ALVEOGRAMA: 	FORMA DEL ALVEOGRAMA: 
SONORA F 63 SONORA F 64 MAYO F 64 INIA F 66 TOBARI F 66 NOROESTE F 66 JARAL F 66 CIANO F 67 AZTECA F 67	NADADORES M 63 NORTEÑO M 67 BAJIO M 67	NAINARI S 60 L. ROJO S 64	PENJAMO T 62 SIETE CERROS T 66	OVIACHIC C 65 JORI C 69
Gluten fuerte, elástico. Para la industria mecanizada de la panificación. mejorador de trigos suaves.	Gluten medio fuerte, elástico. Para la industria del pan hecho a mano. Mejorador de trigos suaves.	Gluten suave, extensible. Para la industria galletera, tortillas, buñuelos, etc.	Gluten corto, tenaz, para la industria pastelería, donas y galletas.	Gluten tenaz, corto, para la industria de las pastas y macarrones.

TABLA 1

En la tabla 1 puede verse la forma como el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, clasificó a las variedades de trigo, en el año de 1970.

AVANCES LOGRADOS EN EL ESTUDIO DE LAS PROTEINAS DE TRIGO.

Como se ha visto, las características o propiedades de las harinas de trigo están íntimamente ligadas a la fracción proteica llamada gluten, por lo cual es necesario hacer énfasis en el estudio de esta proteína.

Cuando la harina de trigo se humedece y mezcla, las proteínas insolubles en agua se hidratan y forman el gluten, una masa compleja y coherente que es el armazón de la totalidad de la masa que se forma y que además es responsable de la retención del gas que se produce durante la fermentación (1).

El gluten fue la primera proteína aislada de una planta (Beccari, 1728), y fue Osborne (1907), quien sentó las bases para clasificarla según su solubilidad en prolaminas, solubles en soluciones acuosas de etanol al 70%, y glutelinas, insolubles en alcohol, pero solubles en soluciones alcalinas o soluciones de muy alto o bajo pH y baja fuerza iónica. Estas fracciones han sido llamadas gliadina y glutenina, respectivamente, cada una constituyen aprox. el 45% de las proteínas totales del trigo (1,23).

Además del gluten, las harinas de trigo contienen proteínas solubles llamadas albúminas y globulinas. Las primeras son solubles en agua y las segundas en soluciones salinas, y comprenden, cada una aproximadamen

te el 6% de las proteínas totales del trigo (2).

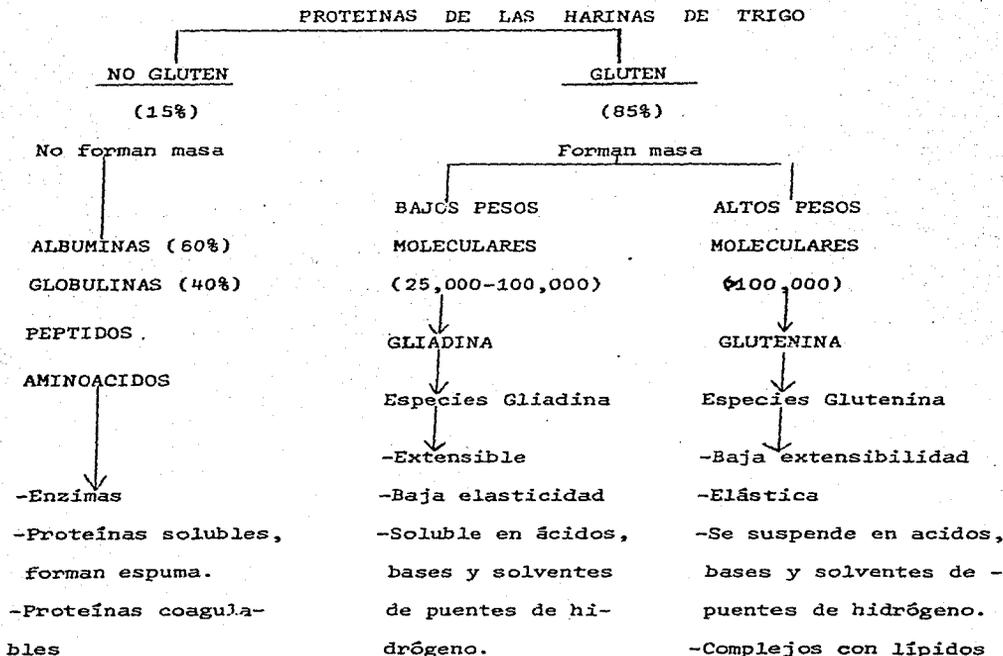


Fig. 1. Representación esquemática de las principales fracciones de proteínas de las harinas de trigo.

Tanto la glutenina como la gliadina que se encuentran presentes en el trigo casi en igual proporción, difieren en sus propiedades físicas, más notablemente en su viscoelasticidad, encontrándose que la gliadina es cohesiva, pero con baja elasticidad, mientras que la glutenina es cohesiva, fuerte y elástica (19). Algunos trabajos mencionan que el gluten es el -

principal responsable de las diferencias en la calidad de las variedades, - siendo la fracción gliadina responsable del volumen del pan, y la glutenina del tiempo y formación de la masa (20).

Es interesante hacer notar que estas dos proteínas no presentan diferencias marcadas en la composición de aminoácidos que pudieran explicar su intervención en las propiedades funcionales de la masa (1, 20, 23, - 24, 28).

T A B L A 2

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS PROTEINAS DEL TRIGO
{mM/100 g. de proteína (16 g. N)}

Aminoácidos	GLuten ¹	Gliadina ¹	Glutenina ¹	Albúminas y ² Globulinas
Alanina	30	25	24	51.0
Arginina	20	15	20	34.9
Acido Aspártico	22	20	23	47.0
Cistina	14	10	10	42.8
Acido Glutámico	290	317	278	143.9
Glicina	47	25	78	54.2
Histidina	15	15	13	22.9
Isoleucina	33	37	28	37.1
Leucina	59	62	57	58.3
Lisina	9	5	13	27.9
Metionina	12	12	12	12.9
Fenilalanina	32	38	27	15.1
Prolina	137	148	114	70.2
Serina	40	38	50	48.1
Treonina	21	18	26	33.1
Triptofano	6	5	8	13.7
Tirosina	20	16	25	18.6
Valina	45	43	41	50.8
Amonio	298	301	240	208.5

¹ Wu y Dimler, 1963 (28).

² Woychik, Boundy y Dimler, 1961 (24).

Como se muestra, las proteínas del gluten están caracterizadas - por su alto contenido de ácido glutámico (35-40% y prolina (13-23%) y cantidades relativamente pequeñas de aminoácidos básicos y triptofano. Tienen un alto contenido de residuos en forma de amidas (aproximadamente el 40% de los aminoácidos se encuentran como amidas), tales como glutamina y de aminoácidos con grandes cadenas alifáticas como leucina.

Sin embargo, los aminoácidos de las proteínas solubles en agua - (albúminas y globulinas) sí varían muchísimo en cantidad, en relación a los aminoácidos de las proteínas del gluten y aunque contienen los mismos aminoácidos, las diferencias más marcadas son en el contenido de ácidos - dicarboxílicos y básicos. Son ricas en ácido glutámico y prolina y tienen mayor contenido de triptofano y residuos ionizables, tales como arginina y lisina y aminoácidos conteniendo azufre que las gluteninas y gliadinas (23).

Por lo tanto, parece ser que las diferencias en el comportamiento tanto de solubilidad como de viscosidad entre la gliadina y la glutenina, deben buscarse por otro camino, y el método más definitivo para resolver el problema es a través de la electroforesis en comparación con la cromatografía, o en pesos moleculares y variaciones estructurales.

Durante la última década, las técnicas de electroforesis en gel de almidón y cromatografía de intercambio iónico en derivados celulósicos han sido muy usadas para la separación y caracterización de las proteínas, con lo cual se logran elucidar algunas razones de comportamiento y propiedades físicas (18).

Mediante la electroforesis se ha probado una clara indicación de

la heterogeneidad del gluten. Jones, Taylor y Senti, 1959 (11) fueron los primeros que trabajaron con soluciones amortiguadoras de bajo pH (3.1) y -baja fuerza iónica, usando la técnica de electroforesis de fase móvil. La movilidad en este sistema es una función de su carga positiva debido a su contenido de aminoácidos básicos, siendo también influenciada por el tamaño y forma de la proteína. Se encontraron cuatro componentes primarios y uno secundario en el gluten de trigo "Ponca", uno de los picos principales se resolvió en dos componentes bajo ciertas condiciones.

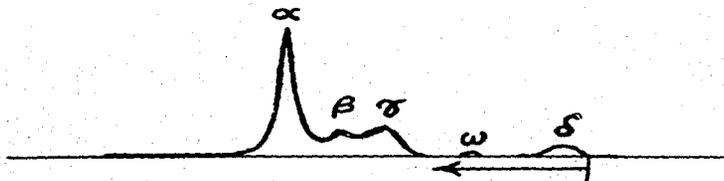


Fig. 2. Patrón electroforético (ascendente) del gluten de trigo "Ponca" en solución amortiguadora de lactato de aluminio pH 3.1.

Esto fué confirmado por la separación cromatográfica de los componentes electroforéticos usando carboxi metil celulosa (CMC), y comparación de sus propiedades de migración (9,26).

En un reporte preliminar Elton y Ewart en 1960, por medio de la electroforesis de zona usando gel de almidón como medio de soporte y solución amortiguadora de lactato de aluminio-ácido láctico pH 3.1 obtuvieron 8 componentes para el gluten de trigo (4). Sin embargo, Woychik, Boundy y Dimler en 1961, lograron una mejor resolución usando gel de almidón y solución amortiguadora de lactato de aluminio, pH 3.1 en presencia de urea, pa

ra lo cual se detectaron 9 componentes; 8 de los cuales migraron dentro del gel y que son correspondientes a la fracción gliadina y uno que permaneció en el origen y que corresponde a la glutenina (25).

De los 8 componentes de la fracción gliadina, dos han sido designados como alfa gliadinas, cuatro como beta gliadinas, uno como gamma gliadina y uno como omega gliadina; siendo los componentes de la fracción alfa los que se mueven más rápido; (los cuatro componentes beta se aislaron como un sólo pico cromatográfico y dos picos en electroforesis libre) (25).

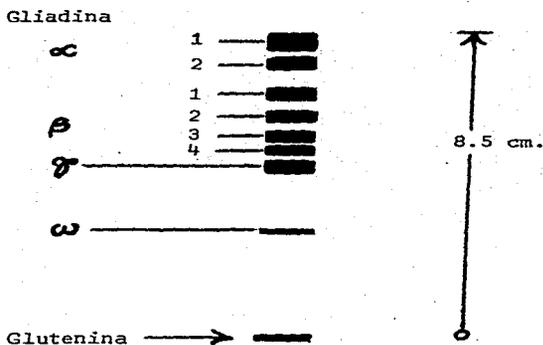


Fig. 3. Patrón electroforético del gluten de trigo "Ponca" usando gel de almidón y solución amortiguadora de lactato de aluminio más urea 3M.

Más comparaciones demuestran que el material que no penetra en el gel de almidón, pero que en electroforesis libre presenta una movilidad correspondiente al componente alfa₁ del gluten, corresponde a la fracción denominada glutenina, la más rápida en este sistema y la menos solu--

ble (25).

Existen otros trabajos (3,5) en los que se ha reportado la existencia de 20 bandas para los componentes del gluten por electroforesis en gel de almidón, sin embargo, más tarde se demostró que la mayoría pertenecían a las fracciones de proteínas solubles en agua como resultado de su incompleta extracción con pirofosfato de sodio (18), encontrándose cuando menos tres componentes clasificables como globulinas y once o más componentes clasificables como albúminas que se mueven con mayor rapidez que las proteínas del gluten (Elton y Ewart, 1962).

El uso de la electroforesis en gel de acrilamida para la separación de las proteínas del trigo ha sido muy limitado a pesar del mayor número de ventajas que ofrece esta técnica. Lee, 1963 (14); Lee y Wrigley, 1963 (15); Narayan, Vogel y Lawrence, 1965 (17); Jankiewicz y Pomeranz, 1965 (8) y Lawrence, Herrick, Hedwig y Grant, 1970 (12).

Lee, usando solución amortiguadora pH 8.6 es el que ha logrado una mejor separación de las bandas que representan los componentes del gluten, registrándose 8 picos por densitometría y 5 bandas perfectamente nítidas en las fotografías de los geles.

En los trabajos restantes (8, 12, 17) se estudió la composición de las albúminas y globulinas, principalmente, obteniéndose de 8 a 10 componentes, dependiendo del pH de la solución amortiguadora. Consecuentemente, la técnica más usada y en la que se ha logrado una mejor separación, caracterización e identificación de las proteínas del trigo, ha sido la electroforesis en gel de almidón (25).

Los métodos de separación por cromatografía también aportan informaciones valiosas sobre la composición y comportamiento de las diferentes proteínas del trigo (2, 15, 22, 26). Coates y Simmonds, 1961, fraccionaron las proteínas de dos harinas de trigo extraídas con pirofosfato de sodio y utilizando como soporte dietil aminoetil celulosa (DEAE celulosa) y carboxi metil celulosa (CM-celulosa); las dos harinas, diferentes en contenido proteico y propiedades funcionales, parecían diferir en las cantidades relativas de ciertos de los componentes presentes (2).

Más separaciones cromatográficas, usando carboxi metil celulosa y mezclas de solventes conteniendo dimetil formamida, indicaron la presencia de 11 fracciones para las proteínas de trigo, sin embargo, al hacerse la -recromatografía únicamente se encontraron cuatro diferentes entidades proteicas (22).

El uso del Sephadex (dextrana modificada) también ha permitido -resultados muy satisfactorios en el estudio y fraccionación de las proteínas. En estudios más recientes, Meredith y Wren, 1966 (16) utilizando -una columna de cromatografía con Sephadex G-200, separaron las proteínas -de harina de trigo en 4 especies moleculares; además de que lograron demostrar el tipo de asociaciones existentes en las fracciones proteicas por la acción o efecto de agentes oxidantes y reductores. La adición al extracto conteniendo las proteínas, de un disulfuro (mercaptoetanol), provocó que el primer pico, correspondiente a las gluteninas fuera enormemente disminuído, indicando que las gluteninas consisten de numerosas cadenas de polipéptidos con uniones de disulfuro. Al agregar iodoacetamida no se alteró casi nada ningún pico, lo cual indica que las proteínas no son -cambiadas notablemente por intercambio de sulfhidril disulfuro, con lo cual,

y consecuentemente no se produjeron cambios en el peso molecular como ocurrió con el mercaptoetanol. Ahora bien, la significancia de este tipo de uniones en la estructura y propiedades del gluten, ha sido demostrada (18, 20, 23, 27).

Del mismo modo, numerosos estudios muestran que los grupos iónicos y no iónicos, gobiernan las propiedades de viscoelasticidad del gluten de trigo. Cuando los grupos amida de los aminoácidos en el gluten y sus principales fracciones (glutenina y gliadina) fueron metilados, la solubilidad, viscosidad intrínseca y cohesión fueron cambiadas notablemente (18, 19, 20).

Cuando se uso óxido de deuterio en lugar de agua para la formación de la masa, la fuerza del gluten y elasticidad aumentó. Estos resultados indican que las uniones por puentes de hidrogeno también influyen en la estabilización de la estructura de la masa (20).

Sin embargo, el problema de relacionar la estructura de los componentes del trigo a sus propiedades es muy complejo, por lo que la mayoría de los estudios se han hecho por métodos de separación cromatográfica y electroforética.

III MATERIAL Y METODOS

Las harinas de trigo estudiadas, diferentes en calidad y usos - fuerón 7:3 harinas de baja calidad en la industria de la panificación provenientes de las variedades de trigo Barrigón Bajío o "Barba Negra", Triticale y Jori C69 de especie T. durum; 2 harinas de buena calidad panadera-perteneiente a los trigos hexaploides o harineros de especie T. vulgare - denominados Inia F66 y Siete Cerros T66; y dos mezclas comerciales llamadas Tres Estrellas (Lance) y Gold Medal con igualmente buenas propiedades de panificación.

En la tabla 3 se encuentran ennumeradas las diferentes variedades de trigo, cuyas harinas se utilizaron para este estudio. La clasificación está hecha de acuerdo a la calidad y características del gluten en contradas y con base en la tabla de clasificación que el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, S.A.G. (INIA) hace de las variedades de trigo según los requerimientos de la industria de la panificación.

T A B L A 3

VARIEDAD ^a	CARACTERISTICAS	% de PRO ^b TEINA	% DE ^c HUMEDAD	U S O S
Barrigón Bajío 6 "Barba Negra"	Trigo tetraploide pertenece al grupo de los Aris Negro. Probablemente cruza entre Triticum durum y Triticum turgidum. Contiene un alto índice de carotenos. Gluten corto y tenaz de baja calidad y cantidad.	8	10.76	Para pastas y macarrones o en sustitución de los trigos cristalinos.
Triticale	Proveniente de trigo tetraploide o Triticum durum. Cruza de trigo y centeno. Contiene alto índice de carotenos. Gluten corto y tenaz de baja calidad panadera.	11.24	12.50	Para pastas y macarrones

VARIEDAD ^a	CARACTERISTICAS	% de PRO ^b TEINA	% DE ^c HUMEDAD
Jori C69 cristali- no duro	Trigo tetraploide (Tdurum). Contiene alto índice de - carotenos. Gluten corto- y tenaz de baja calidad - panadera	14.37	11.26
INIA F66	Pertenece al grupo de los Triticum vulgare (he- xaploides). Gluten fuer- te y elástico de muy bue- na calidad.	13.75	11.55
Siete Cerros T66	Pertenece a los tri- gos hexaploides (Triticum vulgare) o harineros. Es un trigo comercial fácil- mente ablandable. Gluten corto, tenaz pero de bue- na calidad en los proce- sos de la panificación.	10.90	12.28
Gold Medal	Mezcla comercial, mejora- da y elaborada con toda - su fuerza. Gluten fuerte - y elástico de buena cali- dad.	13.61	10.43
Tres Estrellas (Lance)	Mezcla comercial comunmen- te usada. Mejorada y ele- borada. Gluten medio fuer- te con más o menos buenas propiedades en la indus- tria de la panificación.	13.37	11.81
	Para pastas y macarro- nes		
	Para la in- dustria me- canizada de la panifica- ción y mejo- rador de - trigos sua- ves o débi- les.		
	Para paste- les, donas y cierto ti- po de galle- tas.		
	Para la in- dustria del pan hecho a mano.		
	Para la in- dustria pas- telera, don- nas, galle- tas, etc.		

^a Las harinas usadas, a excepción de las mezclas, fueron molidas en el Lab. de Farinología del Depto. de Cereales en Chapingo.

^b El porcentaje de proteína cruda fué determinado por el método de Kjeldahl. (N x 5.70).

^c Las humedades fueron determinadas a 60° al vacío.

CROMATOGRAFIA

Para la separación cromatográfica de las proteínas, en las diferentes harinas (tabla 3), se siguió el método y condiciones de trabajo utilizadas por O.B. Meredith y J.J. Wren (16).

1. Columna de cromatografía usada. La columna utilizada fué de una altura aproximada de 60 cm. con diámetro interno de 2.3 cm. conteniendo en la parte interior e inferior una placa porosa de vidrio y una capa de fibra de vidrio.

2. Solvente AUC. El solvente utilizado para la extracción y cromatografía de las proteínas, consistió de una solución acuosa 0.1M de ácido acético, 3M de Urea y 0.01 M de bromuro de cetil trimetil amonio "CTAB" Q.P. (Eastman Organic Chemicals).

3. Preparación del gel. Se suspendieron 6 g. de perlas de Sephadex G-200, tamaño de partícula 40- 120 μ (Pharmacia Upsala Sweden) en 380 ml. de AUC y la suspensión se dejó reposar durante 72 hrs. agitando de vez en cuando.

4. Preparación de la columna de cromatografía. La suspensión de Sephadex G-200 se vació dentro de la columna descrita antes, teniendo cuidado de que no quedaran burbujas de aire y se dejó lavar durante la noche anterior al día en que se usó por medio de una corriente continua de AUC. Una vez asentado el gel, la altura de éste se hizo de 45 cm. por medio de una pipeta y removiendo únicamente el gel de la parte superior con sumo cuidado. Una vez todo listo, la columna se conectó a un colector au-

tomático de fracciones.

5. Preparación de las soluciones de muestras tipos. Para la calibración de la columna de cromatografía se utilizó una muestra de gliadina (Sigma Chemicals Company St. Louis Missouri); una muestra de glutenina (Nutritional Biochemicals, Corp.) y una muestra de gluten de trigo (Fitte - Chemicals. Hopkin Williams Ltd-Chauweh Heath Essex England); de los cuales se prepararon soluciones, por separado, conteniendo 100 mg. de prot/10 ml. de AUC.

6. Preparación de los extractos de harina en AUC. De cada una de las variedades se preparó un extracto mezclando 4 gr de la harina de trigo correspondiente, con 69 ml. de AUC. La suspensión se homogenizó por dos minutos, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 hrs. Posteriormente se contrifugó a baja temperatura, 30 min. Cada tubo de la centrifuga contenía un sedimento, una goma insoluble, una espuma en la superficie de lípidos, y una solución clara conteniendo las proteínas que fue la que se separó para utilizarse en la cromatografía y electroforesis de las proteínas totales. Para cada corrida se preparó un extracto claro, y se guardaron o almacenaron a 2°C.

7. Aplicación de la muestra. Por medio de una pipeta, y en la parte superior del gel, se inyectó la muestra del extracto (conteniendo aproximadamente 20-25 mg. de proteína para los extractos de las harinas y de 11-14 mg. para las soluciones tipos); y se dejó correr de 30-36 hrs. con el solvente de AUC, tiempo durante el cual se colectaron alrededor de 75 fracciones, cada una de 3 ml.

Esta misma operación se repitió con cada uno de los extractos - que contenían las proteínas, tanto de las harinas como de las "muestras tí - pos"; al final de cada corrimiento se desempacó la columna y se lavó el - gel con AUC limpio para volverse a usar, o en su defecto se preparó nueva - mente.

8. Métodos Analíticos. De cada uno de los extractos se determi - nó su contenido de proteína por medida en el Ultravioleta en un US-Vis Es - pectrofotómetro Hitachi Perkin Elmer, usando como blanco el solvente de - AUC a 280 m μ y relacionando la lectura obtenida con el valor de la pen - diente de la solución de albúmina purificada (Baker's) utilizada para la - curva de calibración de proteínas, conteniendo una concentración final de 1 mg. de proteína/ml. de AUC (concentración = $\frac{\text{Abs}_{280 \text{ m}\mu}}{P}$; P = .000833).

Asimismo se hizo con cada una de las fracciones que salieron de la columna, con el fin de obtener una curva de elución de cada harina que - reflejara su composición de proteínas, así como la distribución de sus pe - sos moleculares.

Por último se juntaron las fracciones que componían cada pico en cada una de las curvas, se dializaron y liofilizaron.

9. Porcentaje de recuperación en cada una de las curvas. El - cálculo se hizo por la suma de las concentraciones de proteína en cada una de las fracciones que componían cada pico y tomando como 100% los mg. de - proteína recuperados.

10. Cálculo del % de composición en las curvas. Se determinó -

tomando en cuenta que el área bajo cada pico es proporcional a la cantidad de proteína presente.

ELECTROFORESIS

Para la separación de las proteínas por electroforesis en gel de acrilamida, se hicieron modificaciones y combinaciones de técnicas y métodos hechos con el mismo fin: Jones, R.W., Taylor, N.W., Senti, F.R. etc.

1. Aparato usado. El aparato de electroforesis utilizado fué - un Buchler Poly-Prep., con temperatura regulada y capacidad para 12 tubos; de dimensiones de 6 pulgadas de ancho por 12 de altura y equipado con una chaqueta refrigerante de agua. La fuente de poder fue modelo LKB.

2. Soluciones para preparar los geles de acrilamida (13).

Se utilizaron 6 soluciones diferentes:

Sol A

24 ml KOH 1 M.
8.6 ml de ácido acético.
2 ml de TEMED (tetrametilen diamina)
24 g de urea.
50 ml cbp. agua.

Sol B

24 ml KOH 1 M.
1.44 ml de ácido acético.
0.23 ml de TEMED
24 g de urea.
50 ml cbp. agua.

Sol C

6.65 g acrilamida.
0.1 g metil bisacrilamida (MBA)
24 g de urea.
50 ml. cbp. agua.

Sol D

2.5 g de acrilamida
0.625 g de bisacrilamida (MBA)
24 g de urea.
50 ml cbp agua.

Sol E

1.0 mg de riboflavina.
50 ml. de urea 8M.

Sol F

Persulfato de amonio al 1.2% en urea
preparado el mismo día.

3. Preparación del gel inferior. En un matraz se mezclaron 6 - partes de la solución C, y una parte de la solución A, a continuación se - hizo vacío para eliminar las burbujas de aire, y por último se agregó una - parte de la solución F. Rápidamente se llenaron todos los tubos previa - mente siliconizados y ya secos de manera que la altura de cada gel fuera - de 7.2 cm.

A continuación se añadieron con mucho cuidado unas gotitas de - agua a cada uno de ellos y después de transcurrido un tiempo se formó una - separación entre el agua y el gel indicando la solidificación o gelifica - ción de éste. Por último se eliminó el agua con la ayuda de un kleenex.

4. Preparación del gel superior. Se mezclaron 4 partes de la Sol. D, con una parte de la Sol. B y una parte de la Sol. E; más 2 partes de urea 8M.

A cada tubo conteniendo el gel inferior se le agregó la misma cantidad de esta mezcla de manera que el gel superior fuera de una altura de 0.5 cm. aprox. Para favorecer la gelificación se expuso a la acción de la luz.

5. Preparación de la solución amortiguadora. Se preparó una solución 0.025M de formiato de sodio pH 3.1-3.3, para lo cual se mezclaron 25 ml de ácido fórmico 1M más 3 ml de hidróxido de sodio 1M en un litro de solución, el pH se ajustó con una solución 1N de Na OH (7).

6. Proteínas usadas. Se trató de hacer electroforesis de las fracciones obtenidas por cromatografía, no siendo satisfactorios los resultados; por lo cual se hicieron preparaciones de "gluten" por otro método que se describe más adelante.

Se hizo electroforesis de las proteínas totales (mismos extractos preparados para la cromatografía) y del gluten de cada una de las variedades, así como de las muestras tomadas como "tipos" de glutenina, gliadina y gluten.

7. Preparación de los glútenes. La harina (aprox. 25 g) se extrajo con alcohol n-butílico para remover los lípidos, el almidón y otros componentes se eliminaron de ésta por medio de lavados sucesivos con una solución de NaCl al 1%, formándose una masa gomosa. La bola de gluten se-

dispersó en ácido acético 0.1N (20 ml por cada g de gluten) en una homogenizadora y a continuación se centrifugó a 2000 rpm 10 min., y posteriormente a 16 000 rpm durante 5 min., obteniéndose una solución clara. Para inactivar las enzimas proteolíticas, la solución se calentó a 92-93°C y por último se liofilizó (11).

Esta misma operación se repitió con cada una de las harinas de trigo.

8. Procedimientos de electroforesis. Las soluciones para electroforesis del gluten de cada una de las variedades fueron preparadas disolviendo 25 mg. del gluten liofilizado en 5 ml de la solución amortiguadora de formiato más urea 3M, en el caso de encontrarse presente una parte insoluble, se eliminó por centrifugación.

Para la electroforesis de las proteínas tipos de gluten, gliadina y glutenina se preparó una solución conteniendo 3 mg. de proteína en 1 ml. de la solución amortiguadora de formiato más urea 3M.

Para la electroforesis de las proteínas totales se utilizaron los mismos extractos que se prepararon para la separación en columna de cromatografía.

9. Aplicación de la muestra. A cada tubo se le inyectaron aproximadamente 100 µl conteniendo 300 ug. de cada una de las soluciones de gluten, y lo mismo para las muestras tipos. Para los extractos conteniendo las proteínas totales, se aplicaron 400 ug.

Los corrimientos se llevaron a cabo por 4 hrs. con una corriente de 5 mA por cada tubo, colocando el ánodo en la parte superior y el cátodo en la parte inferior. Se dejó circular la corriente de agua durante las corridas.

10. Detección de la Proteína. Al final de la electroforesis, los geles se sacaron y tñeron durante 30-60 min. en una solución de Amido Black al 1% en ácido acético al 5% y se destñeron con lavados sucesivos de una solución de ácido acético al 1% con agitación constante.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

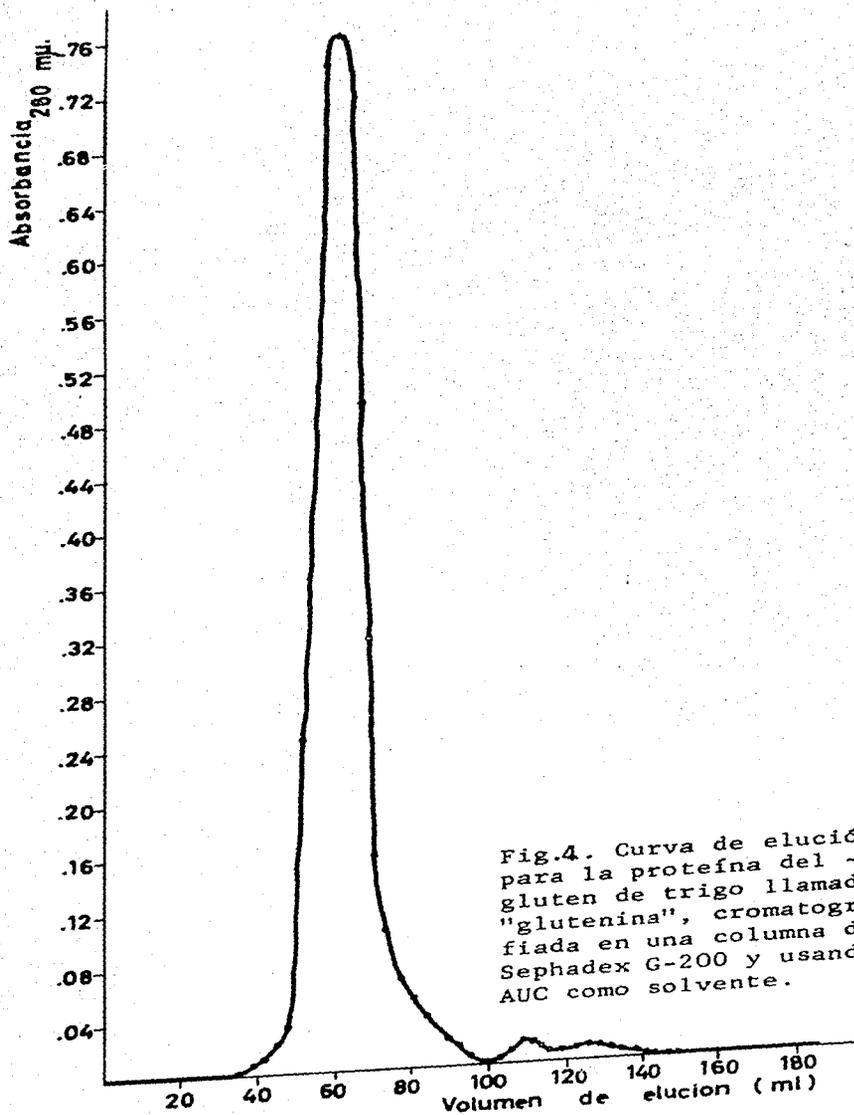


Fig.4. Curva de elución para la proteína del -- gluten de trigo llamada "glutenina", cromatografía en una columna de Sephadex G-200 y usando AUC como solvente.

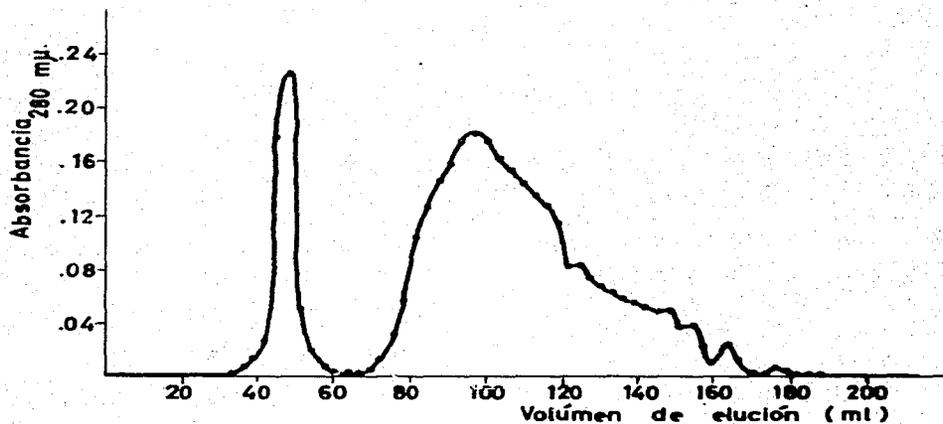


Fig. 5. Curva de elución para la proteína del gluten de trigo llamada "gliadina" usando como solvente AUC y cromatografiada en una columna de Sephadex G-200.

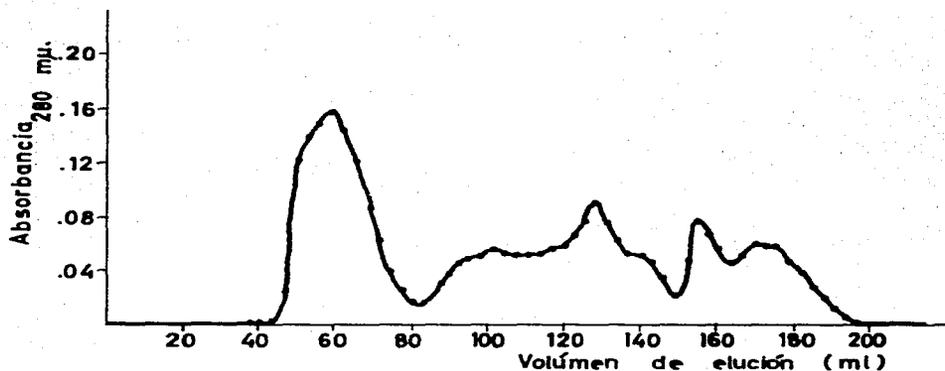


Fig. 6. Curva de elución para las proteínas del gluten de harina de trigo, cromatografiadas en una columna de Sephadex G-200 y usando AUC como solvente.

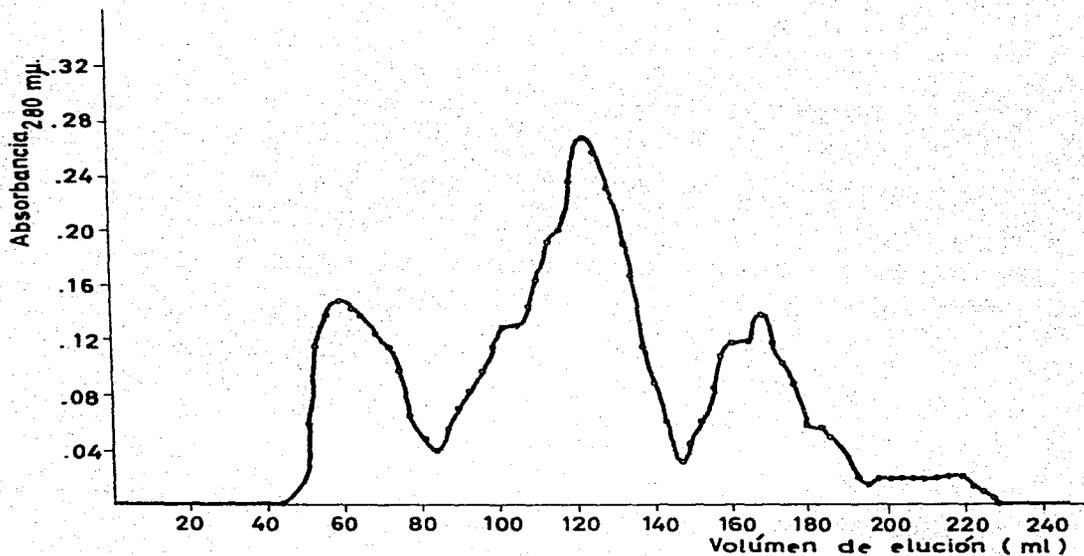


Fig.7. Curva de elución para las proteínas de la harina de trigo Barrigón Bajío ó "Barba Negra", extraídas y cromatografiadas con AUC en una columna de Sephadex G-200.

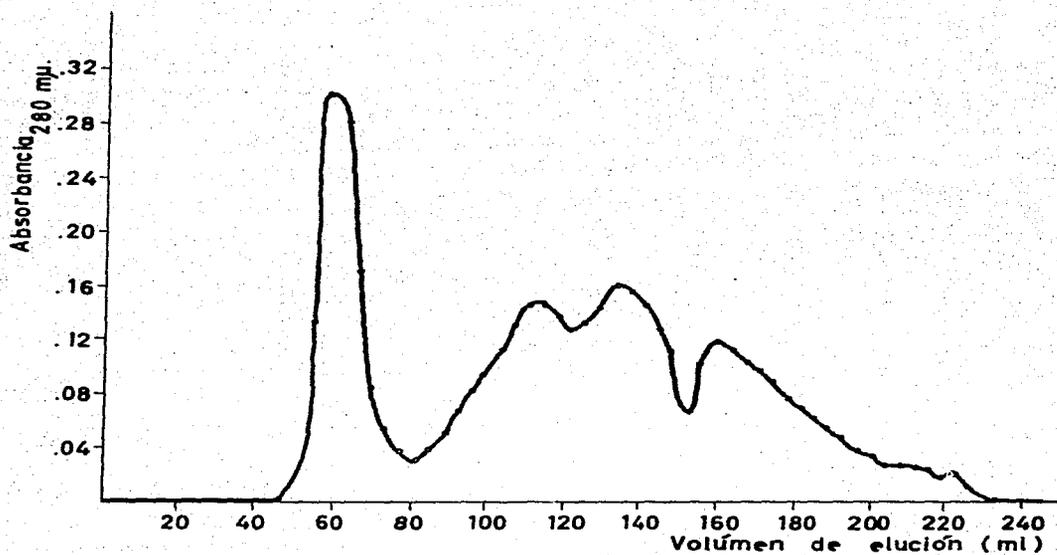


Fig. 8.- Curva de elución para las proteínas de la harina de trigo "Triticale", extraídas y cromatografiadas con AUC en una columna de Sephadex G-200.

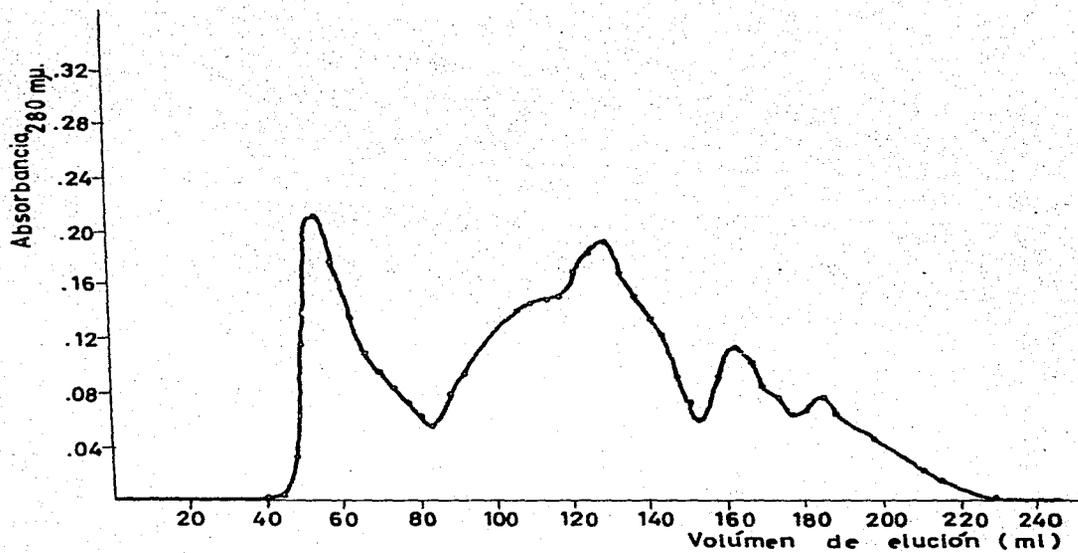


Fig. 9. Curva de elución para las proteínas de la harina de trigo "Jori" C-69, extraídas y cromatografiadas con AUC en una columna de Sephadex G-200.

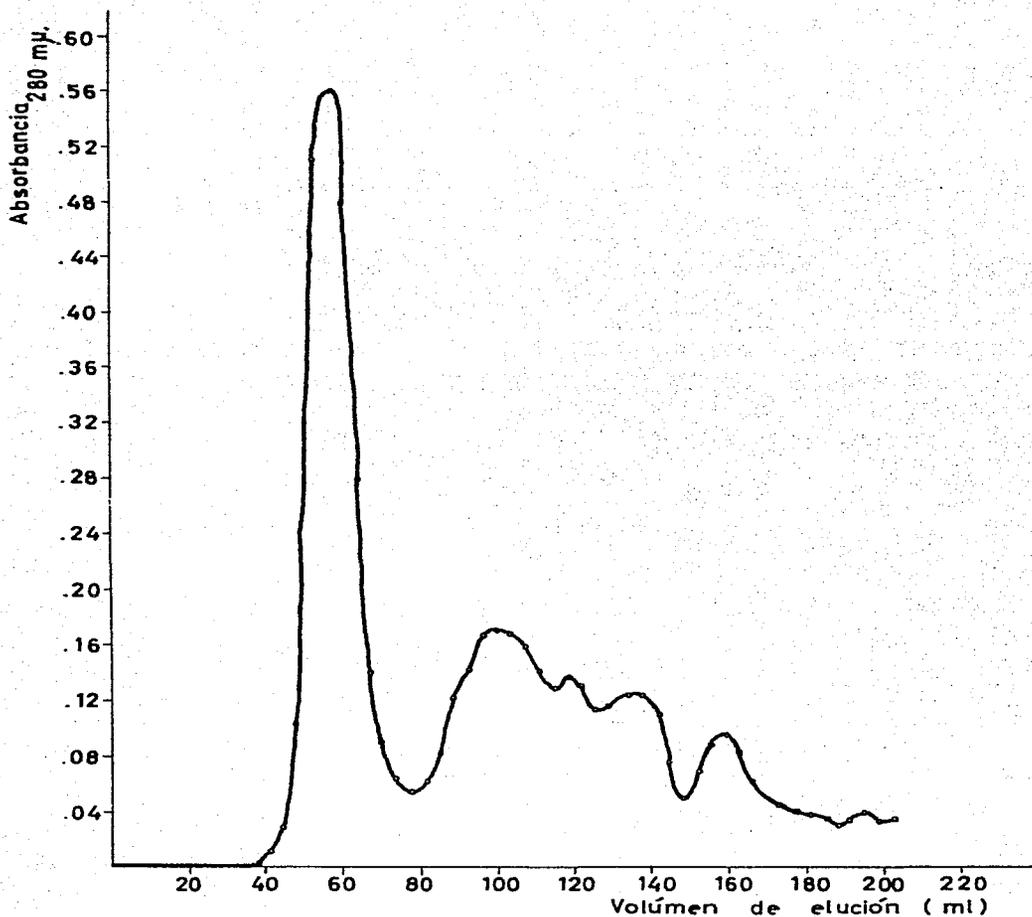


Fig.10. Curva de elución para las proteínas de la harina de trigo "Siete Cerros" T-66, extraídas y cromatografiadas con AUC en una columna de Sephadex G-200.

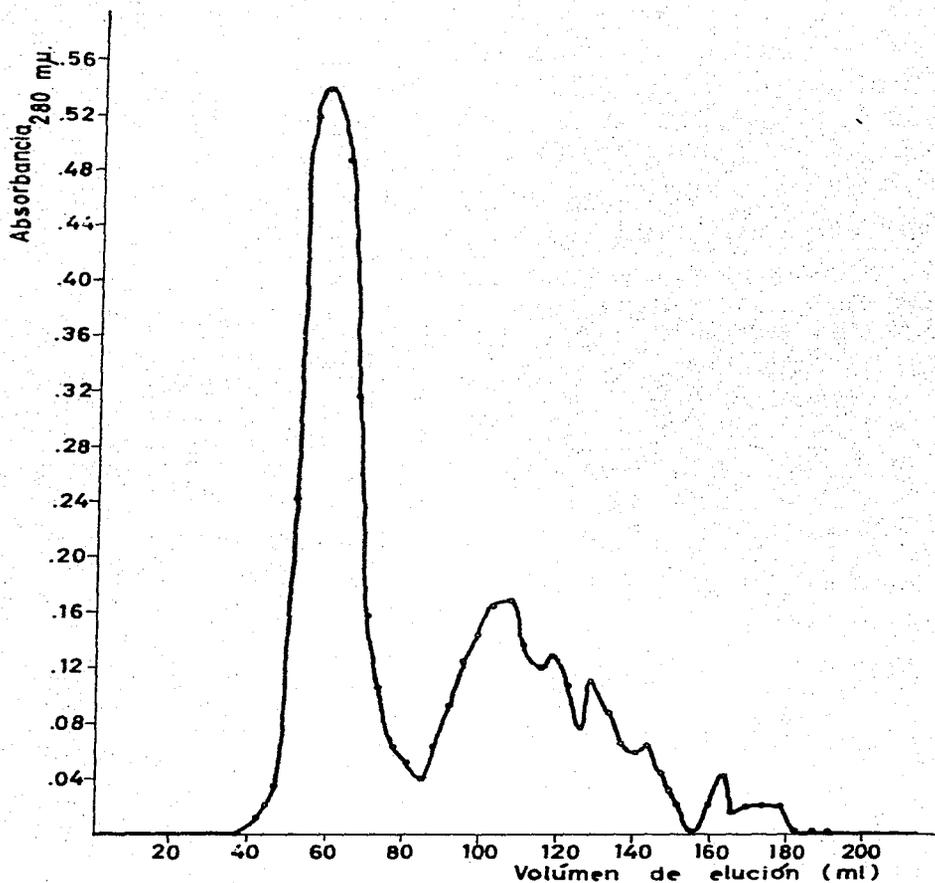


Fig.11. Curva de elución para las proteínas de la harina de trigo "Inia" F-66, extraídas y cromatografiadas con AUC en una columna de Sephadex G-200.

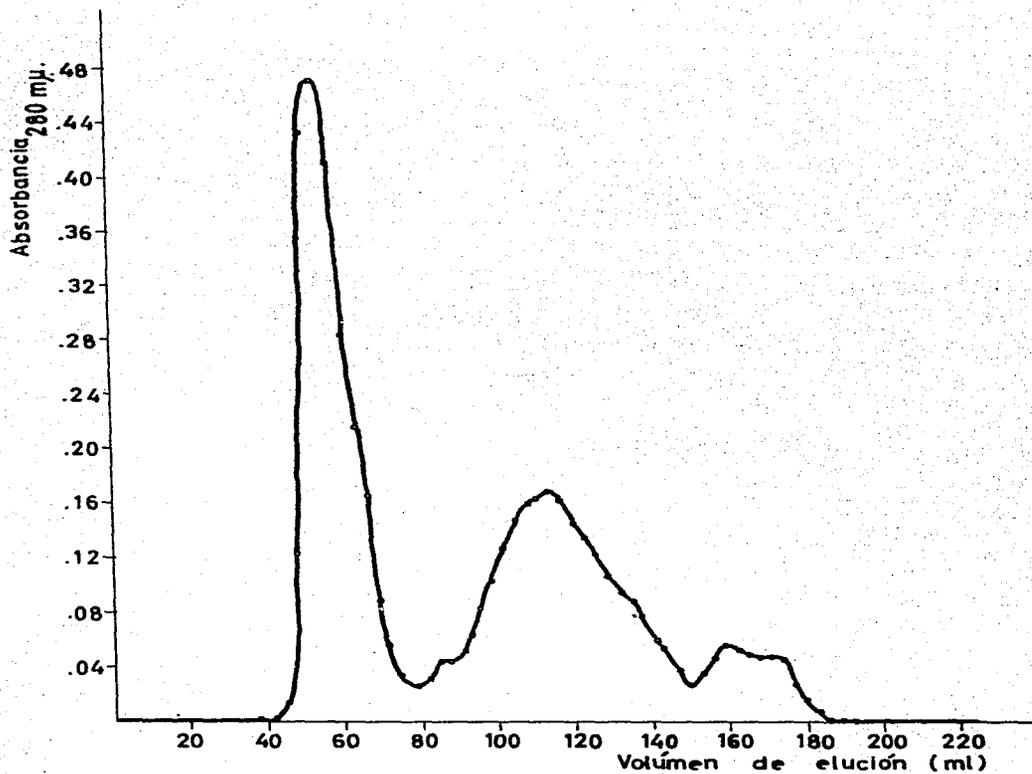


Fig.12. Curva de elución para las proteínas de la harina de trigo "Gold Medal" extraídas y cromatografiadas con AUC en una columna de Sephadex G-200.

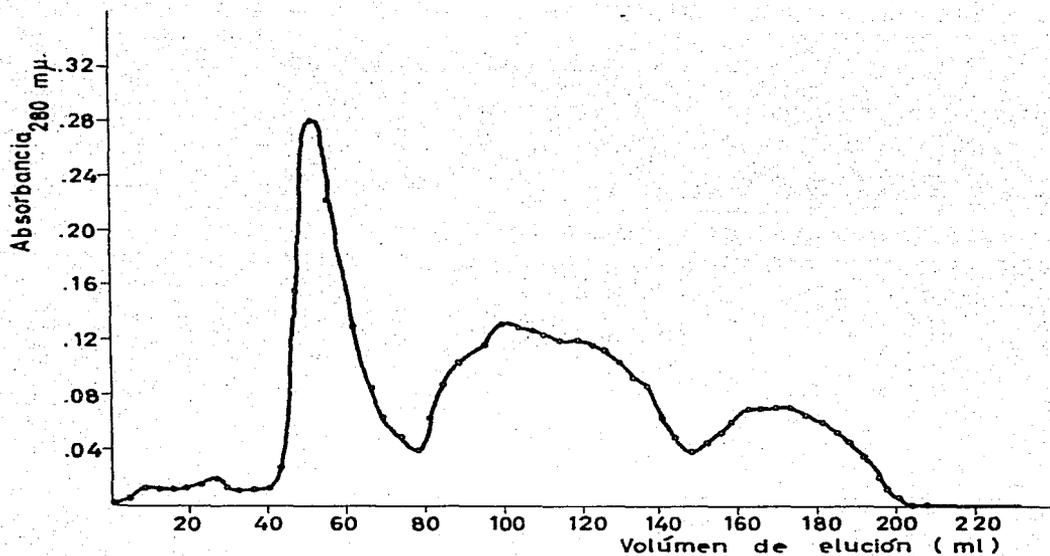


Fig. 13 . Curva de elución para las proteínas de la harina de trigo "Tres Estrellas", extraídas y cromatografiadas con AUC en una columna de Sephadex G-200.

SEPARACION CROMATOGRAFICA

Los perfiles obtenidos para las proteínas de las siete muestras - de harinas presentadas en la tabla 3, así como de las muestras de proteínas tomadas como "tipos", se muestran en las Figs. 4-13 (separación cromatográfica usando una columna de Sephadex G-200 y solvente de AUC).

Calibración de la columna. Al ser cromatografiadas por separadas las soluciones proteicas de las muestras de glutenina, gliadina y gluten - (Figs.4-6), con el fin de determinar los rangos de volumen al que eluyen o salen de la columna al ser arrastradas por el solvente de AUC, se obtuvo - una curva o patrón característico para cada una de ellas.

La Fig. 4 representa el perfil y el volumen de elución para la - glutenina que se obtuvo casi totalmente pura como puede observarse; mien- - tras que en la curva correspondiente a la gliadina (Fig. 5), se formaron 2 picos, uno mayor que representa el 85% - 90% del total de la proteína y - otro menor (10% - 15%), que se consideró ser impureza de glutenina basándo- nos en su baja concentración y en comparación con el pico formado por esta última proteína en la Fig. 4. Taylor, N.W., Jones, R.W., Babcock, G.E., y - Dimler, R.J. (9) también hacen mención al hecho de que la glutenina puede - obtenerse relativamente pura, mientras que la gliadina se ha encontrado con- taminada con restos de glutenina, lo cual está de acuerdo con los resulta- dos aquí obtenidos.

Cuando se hizo la separación de las proteínas en la muestra toma- da como "tipo" de gluten de trigo (Fig. 6), se observaron varios picos, - dos de los cuales se formaron casi al mismo rango de los formados en las -

Figs. 4 y 5, facilitándose por lo tanto, la caracterización o identificación de éstos.

Como ya se ha mencionado, el gluten de trigo únicamente está formado por las proteínas denominadas glutenina y gliadina, con lo cual surge la duda de la pureza del gluten usado que seguramente se encontraba contaminado con fracciones de proteínas "solubles", tales como albúminas y globulinas (3er. y 4o. picos).

La existencia de estas fracciones que no forman parte del gluten se debió, probablemente, al método usado para la obtención de éste, basándonos además en los reportes de otros trabajos (9,10, 18,26), en que se han separado por cromatografía, e identificado las proteínas de glutenes de harinas y también se han encontrado fracciones de proteínas hidrosolubles que se consideran no ser proteínas del gluten por su "naturaleza", ya que difieren de las "verdaderas proteínas del gluten" en solubilidad, movilidad electroforética, propiedades físicas (carentes de elasticidad y cohesividad), y composición de aminoácidos. Con respecto a esto, se consideraron ser albúminas y/o globulinas que se encuentran presentes como resultado de un atrapamiento físico o interacción con los componentes del gluten.

De la observación de estos hechos (Fig. 4-6), pudo comprobarse que la glutenina de peso molecular mayor eluye o sale primero de la columna, siguiéndole la gliadina y finalmente las albúminas de menor peso molecular (10).

Cromatografía de los extractos. - Una vez calibrada la columna se procedió a la separación de las soluciones conteniendo las proteínas tota-

les en AUC de las diferentes variedades de harinas de trigo enlistadas en la tabla 3, obteniéndose varias curvas de elución (Figs. 7 - 13), que dan una imagen completa y cuantitativa de la composición y distribución de las proteínas en cada una de ellas.

Al examinarse estas curvas, pudo notarse la formación de tres picos principales que representan las diferentes proteínas presentes en cada una de ellas y que mantuvieron una gran correspondencia con los picos respectivos formados en todas ellas y con los formados en las soluciones de proteínas tomadas como "tipos", por lo cual la identificación de éstos se hizo, en primer lugar, en comparación directa con los picos formados en la calibración de la columna, y en segundo lugar, con base en los reportes de Meredith y Wren (16), cuyo método de separación cromatográfica se siguió en este trabajo.

De la observación de todas las curvas (Figs. 4 - 13), y por conveniencia, aunque no es estrictamente riguroso, se usaron las siguientes designaciones para las partes de las curvas:

Entre un mínimo aproximado de 48 ml hasta 80 ml., pico de la glutenina.

Entre un mínimo aproximado de 80 ml hasta 150 ml., pico gliadina.

Entre un mínimo aproximado de 150 ml en adelante otras proteínas tales como albúminas y/o globulinas.

TABLA 4

PORCENTAJE DE RECUPERACION DE LA MUESTRA
AGREGADA A LA COLUMNA DE SEPHADEX G-200.

MUESTRA	mg. de PROTEINAS AGREGADOS	mg. de PROTEINAS ^a QUE SALIERON	% DE RECUPERACION
Glutenina	14.07	13.68	97.26
Gliadina	12.82	11.98	93.44
Gluten	11.02	10.81	98.09
Barrigón Bajo ó "Barba Negra"	22.85	21.85	95.62
Triticale	22.48	20.98	93.33
Jori C69	22.20	22.59	101.75
Siete Cerros T 66	25.31	25.41	100.39
Inia F66	25.51	23.00	90.16
Gold Medal	22.16	19.36	89.60
Tres Estrellas	20.00	18.96	94.78

^aDeterminado por la suma de concentraciones de las fracciones que emergieron de la columna.

TABLA 5

PORCENTAJE DE COMPOSICION DE LOS PICOS QUE
 REPRESENTAN A LAS PROTEINAS EN LAS DIFERENTES
 HARINAS DE TRIGO.^a

Variedad	% Glutenina	% Gliadina	% Proteínas "salubres" ^b
Barrigón Bajío o "Barba Negra"	22.44	52.85	24.72
Triticale	25.49	50.81	23.69
Jori C69	27.01	50.00	22.99
Tres Estrellas	34.25	47.27	18.48
Siete Cerros T66	44.00	41.70	14.30
Gold Medal	46.66	44.49	8.85
Inia F66	57.35	39.86	2.79

^aTomando en cuenta que el área bajo cada pico es proporcional a la cantidad de proteína presente,

^bTales como albúminas y/o globulinas

TABLA 6

RELACION CUANTITATIVA ENTRE LOS PICOS QUE REPRESENTAN A LAS PROTEINAS DEL GLUTEN DE LAS DIFERENTES VARIEDADES DE HARINAS DE TRIGO.

VARIEDAD	RELACION GLITENINA—GLIADINA
Barrigón Bajo ó "Barba Negra"	1 : 2.36
Triticale	1 : 1.99
Jori C 69	1 : 1.85
Tres Estrellas	1 : 1.38
Siete Cerros T66	1.05 : 1
Gold Medal	1.05 : 1
Inia F66	1.4 : 1

Es interesante hacer notar que la denominación de cada uno de los picos, así como los rangos en el volumen de elución, son comparables con las investigaciones hechas a priori por Meredith y Wren, en 1966 (16), los cuales separaron las proteínas de una muestra de harina de trigo en cuatro especies moleculares, utilizando una columna de cromatografía con Sephadex-G-200 y solvente de AUC, bajo las mismas condiciones usadas en este trabajo y previamente calibrada con 15 proteínas diferentes con pesos moleculares conocidos de 15000 a 130000. Los picos obtenidos por ellos y perfectamente identificados, correspondían en orden a las gluteninas, gliadinas, albúminas y no proteínas. Los rangos de elución establecidos por ellos fueron altamente reproducibles en este trabajo comprobándose así la identidad en la denominación.

El porcentaje de recuperación en la mayoría de las curvas fué cuantitativo (tabla 4), con los límites del error experimental, afirmándose por lo tanto la efectividad del método de separación y del solvente de AUC usados para la extracción y cromatografía de las proteínas.

Como puede notarse, los perfiles de proteína en todas las curvas (Figs. 7-13), son relativamente similares, sobretodo en las variedades "panificables" (Fig. 7-9), aunque de un modo estricto cada variedad, aún siendo de la misma especie tiene un patrón de proteína característico.

De la observación de las gráficas y de las tablas 5 y 6, que muestran el porcentaje de composición en cada uno de los picos y la relación cuantitativa entre éstos, se desprende que las tres primeras harinas procedentes de trigos tetraploides (T. durum), de las variedades Barrigón Bajío o "Barba Negra", Triticale y Jori C69, de baja calidad de gluten y diferen-

tes en contenido proteico, pero similares en propiedades y usos, presentan una relación muy estrecha en el porcentaje de composición de cada uno de los picos respectivos.

En todas ellas, la fracción gliadina se encontró presente en mucho mayor proporción, casi el doble, que la fracción glutenina. Se encontraron además cantidades considerables de albúmina o proteínas que no forman parte del gluten.

El análisis de las curvas obtenidas en la separación cromatográfica de las proteínas de las harinas de trigos hexaploides (*T. vulgare*) (Figs. 10 y 11), nos muestra algunas diferencias, aunque no marcadas, en la relación cuantitativa entre los picos que representan las proteínas del gluten. Aunque estas diferencias podrían explicarse por el hecho de que la variedad Inia F66 es un trigo fuerte, a diferencia de la variedad Siete Cerros T66 - que, aunque de la misma especie, es un trigo suave o débil de calidad inferior al primero.

En las dos harinas, altas en contenido proteico se mantuvo una relación glutenina-gliadina más pareja (aproximadamente 1 : 1), que en el caso de las harinas provenientes de los trigos tetraploides. El porcentaje de composición del último pico correspondiente a las proteínas hidrosolubles fue mayor en la variedad Siete Cerros T66. La variedad Inia F66 estuvo compuesta casi en su totalidad por las proteínas del gluten.

Estas dos últimas variedades son comparables con las mezclas elaboradas "Gold Medal" y "Tres Estrellas" por sus propiedades funcionales y características del gluten. Aunque la primera es de gluten un poco más fuer

te y de mejor calidad que la segunda, tienen casi el mismo contenido proteico, y la relación glutenina-gliadina también fué más pareja (aproximadamente 1:1), como en el caso de las harinas de los trigos hexaploides o harineros. El pico de las proteínas hidrosolubles fué menor para la curva de elución de la harina "Gold Medal" que es más comparable o parecida por la fuerza y características del gluten a la harina de trigo Inia F66.

Al ser comparados los perfiles de proteína de las mezclas comerciales (Figs. 12-13) y de los trigos hexaploides (Figs. 10 y 11), con las harinas de trigo provenientes de trigos tetraploides (Figs. 7 - 9), se encuentran diferencias más marcadas, y por lo tanto, más significativas en la relación gliadina-glutenina (tabla 6). La presencia de la fracción correspondiente a las proteínas hidrosolubles albúminas y/o globulinas no fué característica, ya que por ejemplo, las variedades Inia y Siete Cerros (hexaploides *T. vulgare*), difieren bastante en el contenido de esta fracción; aunque de cualquier modo, puede decirse que las variedades de trigos no "panificables" (*T. durum*), presentaron un mayor contenido de proteínas hidrosolubles (tabla 5).

Y. Pomeranz, K.F. Finney y R.C. Hosney (20) realizando estudios de fraccionación por ultracentrifugación y diferencias en solubilidad de los componentes de las harinas de trigo, y subsecuente reconstitución de estas, encontraron que la glutenina era fuerte, cohesiva y elástica, propiedades que imparten buenas características a la totalidad de la masa, lo cual pudo comprobarse por el método de separación aquí usado, ya que al observar la tabla 5 puede verse como a medida que aumentan la fuerza y viscoelasticidad del gluten (propiedades establecidas en la tabla 3). se observa también un aumento "proporcionado" y progresivo en el porcentaje de composición re-

lativo de glutenina en la mayoría de las muestras.

El porcentaje de humedad y el contenido total de proteína (tabla-3), tampoco puede relacionarse de una manera definitiva con el tipo y calidad de las harinas, ya que tanto en los trigos de baja calidad (tetraploides, T.durum) de gluten, como en los harineros o hexaploides, encontramos rangos parecidos en el contenido de proteína y humedad.

Por ejemplo, para la variedad Jori C69 encontramos el más alto contenido de proteína (14.37%) y sin embargo, se utiliza para hacer pastas y macarrones, lo cual contradice algunos reportes (20) en los que se menciona que el principal factor responsable de las variaciones en el volumen del pan es el contenido de proteína.

Indudablemente que muchos factores, incluyendo los genéticos (tetraploide, hexaploide, etc.), también tienen influencia sobre la composición y funcionalidad de los diferentes tipos de harinas de trigo, dadas las diferencias encontradas entre los trigos tetraploides y hexaploides, (Y.Pomeranz, 1970).

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, las diferencias en la calidad y potenciales de panificación de las harinas de trigo son una consecuencia de las relaciones cuantitativas entre las proteínas, principalmente las que forman el gluten, encontrándose que a mayor desproporción de estas proteínas, se producen harinas de menor calidad panadera.

Estos datos coinciden con otros trabajos anteriores en los que, aunque no se siguió el mismo procedimiento ni se dan valores en la relación

del porcentaje de composición, si se hace mención al hecho de que las diferencias en la calidad del gluten; y consecuentemente de las harinas de trigo, pueden ser atribuidas a las variaciones en la cantidad, ya sea de gliadina o glutenina, o las diferencias en el radio de una u otra (1, 2, 15).

Así pues, debemos aceptar, por los resultados aquí presentados y los establecidos a priori, que las proteínas del gluten juegan un papel importantísimo en el concepto "calidad" de las diferentes variedades de trigo, en cuanto a panificación se refiere.

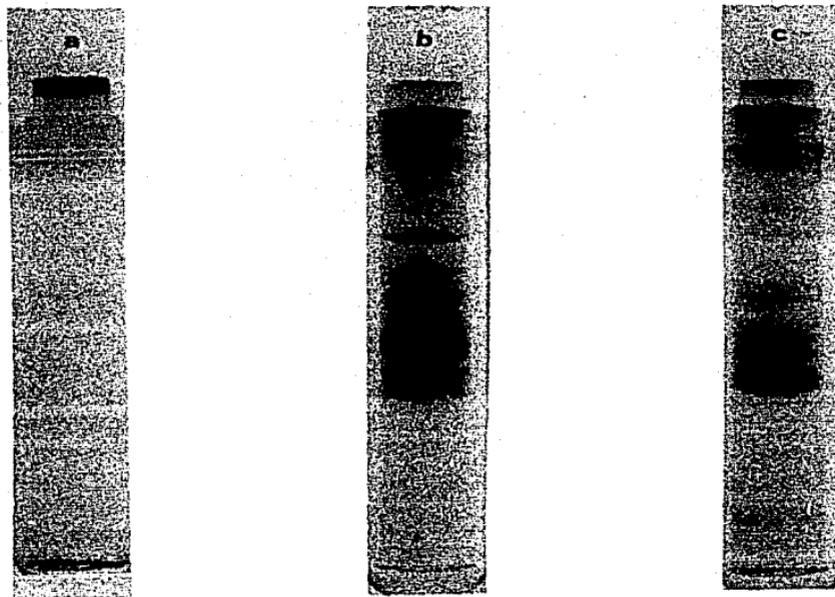


Fig.14. Fotografías obtenidas de la electroforesis en gel de acrilamida de las --
proteínas del trigo llamadas "glutenina" (a); "gliadina" (b); y "gluten"
(c). Solución amortiguadora de formiato de sodio pH 3.1-3.3; t= 4hrs. -
i= 5mA.

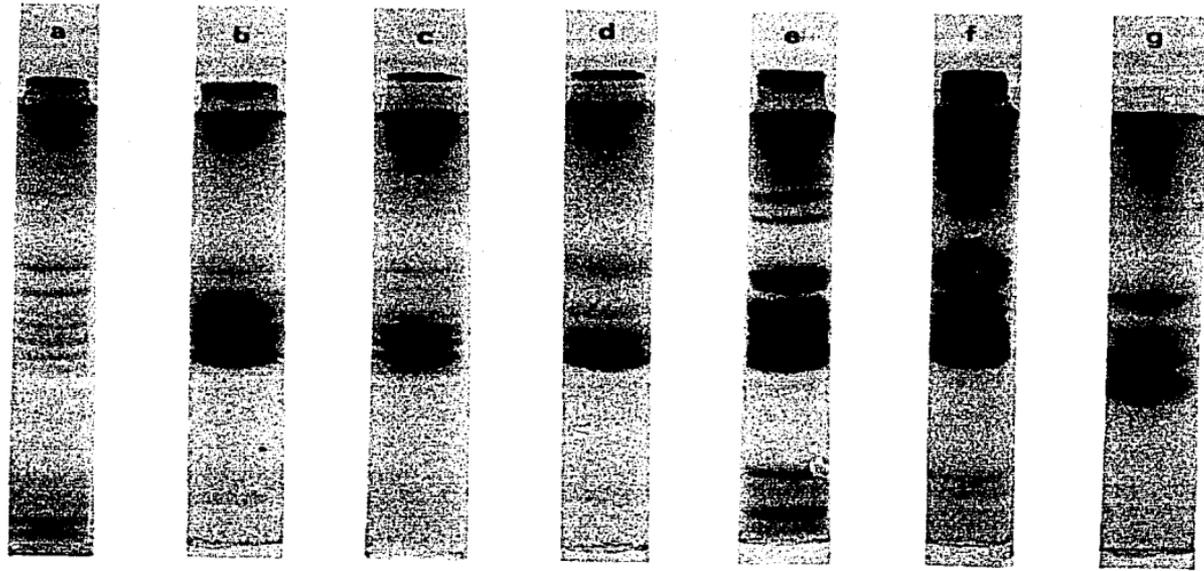


Fig. 15. Fotografías obtenidas de la electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas del gluten de las harinas de trigo Barrigón Bajío ó "Barba -- Negra" (a); Triticale (b); Jori C-69 (c); Siete Cerros T-66 (d); Inia - F-66(e); Gold Medal (f) y Tres Estrellas(g). Solución amortiguadora de formiato de sodio pH 3.1-3.3 ; t= 4hrs. ; i= 5mA.

*a,b, c "no panificables" ; d,e,f,g "panificables".

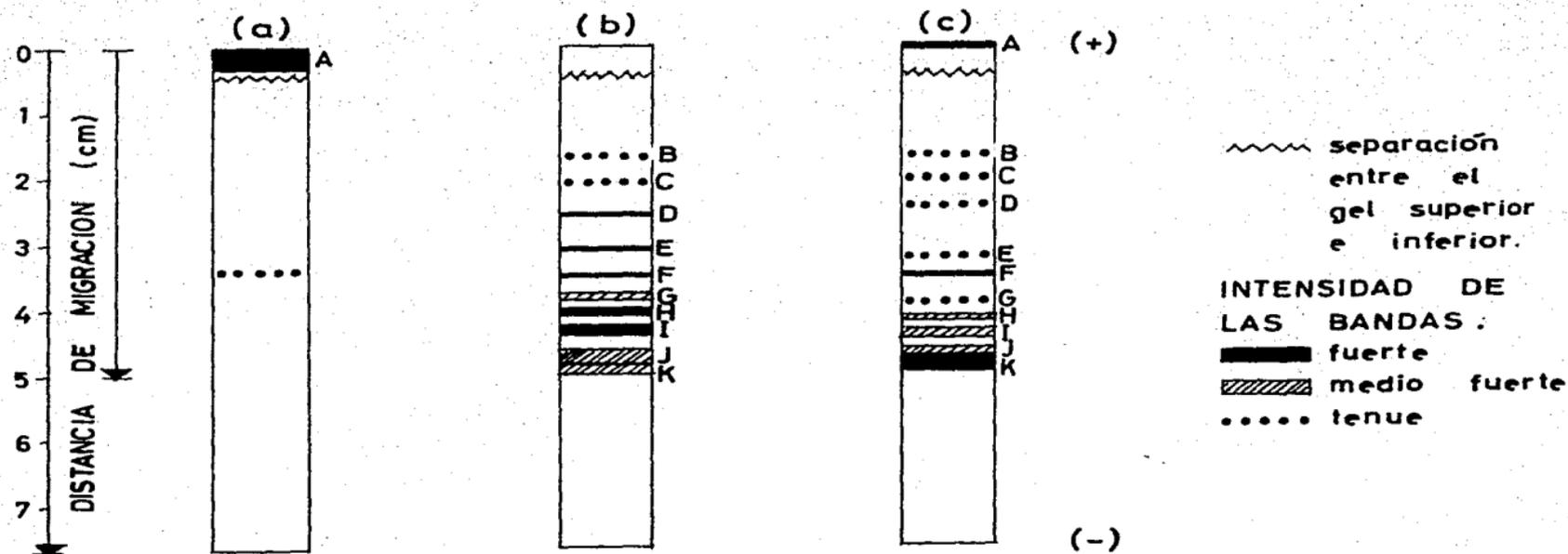


Fig. 17. Representación esquemática de las diferentes fracciones que se separaron por electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas del trigo llamadas "glutenina" (a); "gliadina" (b) y "gluten" (c).

Solución amortiguadora de formiato de sodio pH 3.1-3.3 ; t= 4hrs.; i=5mA.

*Las bandas se dibujaron por observación directa de los geles y en comparación con "los negativos" de las fotografías respectivas, con el fin de facilitar la comprensión; pues en estas últimas se pierden algunos detalles de las bandas.

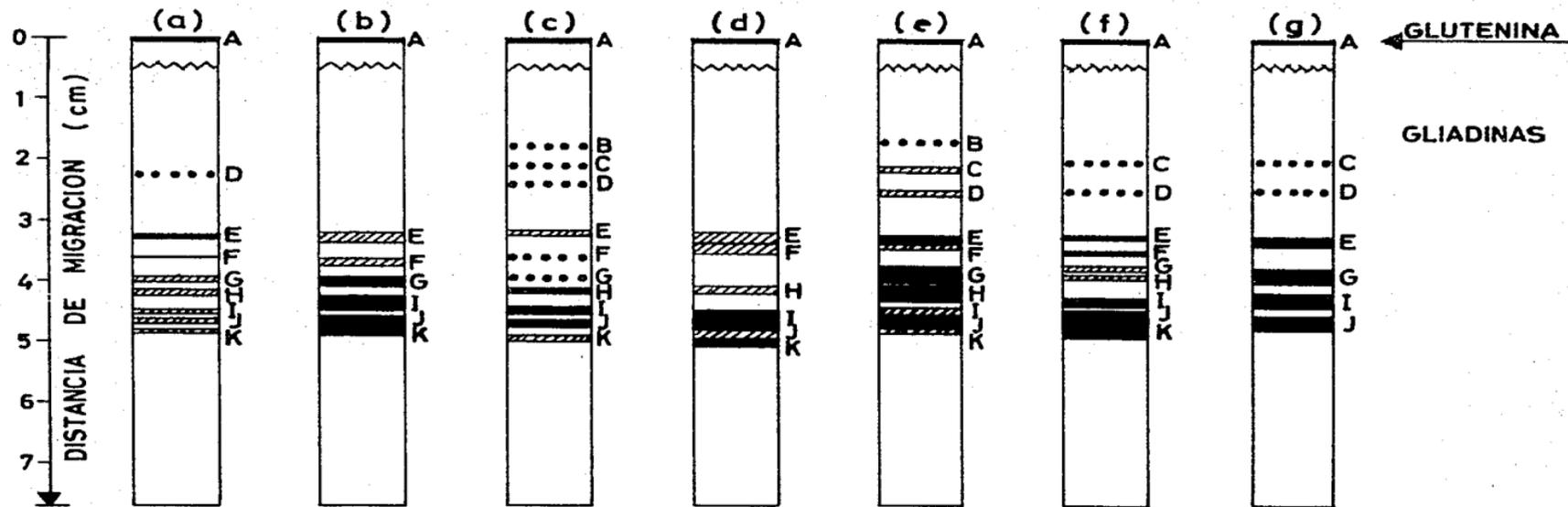


Fig. 18. Representación esquemática de las diferentes fracciones que se separaron por electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas del gluten de las harinas de trigo Barrigón Bajío ó Barba Negra(a); Triticale(b); Jori C-69 (c) ; Siete Cerros T-66 (d); Inia F-66 (e); Gold Medal(f); y Tres Estrellas(g). Solución amortiguadora de formiato de sodio pH 3.1-3.3; t=4hrs ; i= 5mA.
 * a,b,c "no panificables" d,e,f,g "panificables"

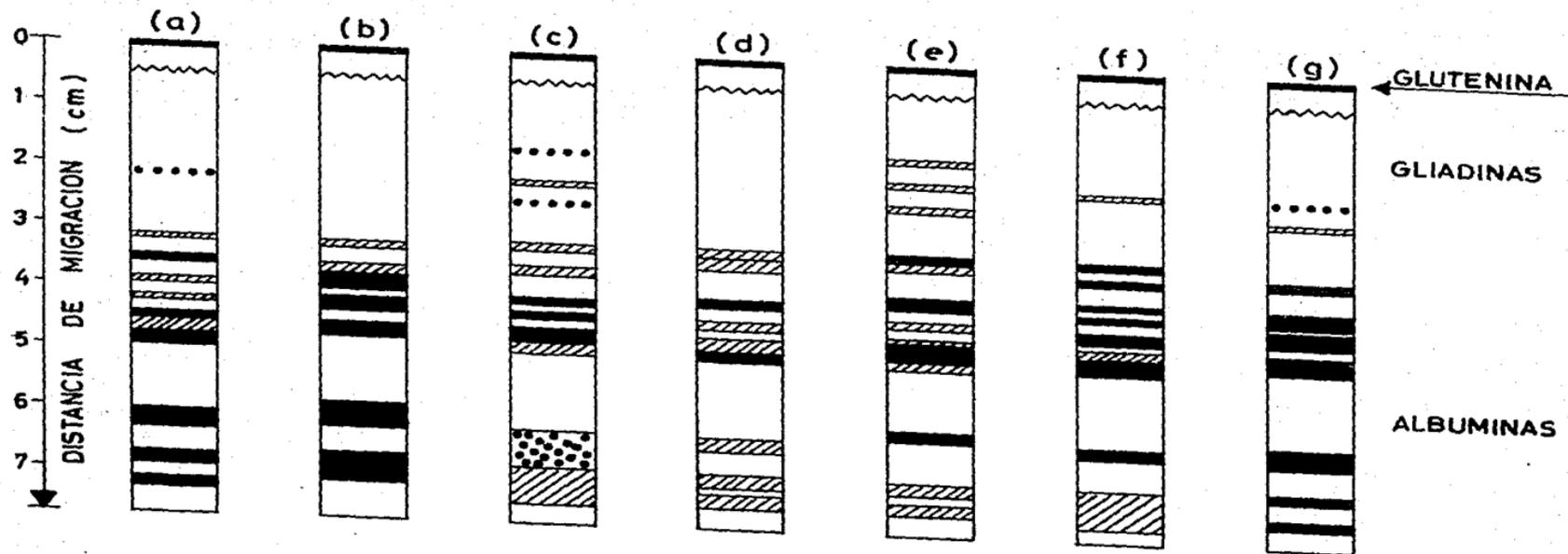


Fig.19. Representación esquemática de las diferentes fracciones que se separaron por electroforesis en gel de acrilamida de las proteínas "totales" de las harinas de trigo Barrigón Bajío ó Barba Negra(a); Triticale(b); Jori C-69 (c); - Siete Cerros T-66 (d); Inia F-66 (e); Gold Medal(f); y Tres Estrellas (g). Solución amortiguadora de formiato de sodio pH 3.1-3.3 ; t= 4 hrs; i= 5mA.
 * a,b,c "no panificables" d,e,f,g "panificables".

SEPARACION ELECTROFORETICA

Como ya se indicó bajo el capítulo de Material y Métodos, se trató de hacer electroforesis por separado de cada uno de los picos obtenidos en la cromatografía de las diferentes variedades de trigo, no lográndose resultados satisfactorios en la separación de los componentes de cada una de las fracciones. Asimismo, se intentó hacer la separación sobre Cellogel R. S. (acetato de celulosa) con soluciones amortiguadoras de fosfato de sodio-ac. fosfórico y TRIS-glicina. Igualmente se hizo electroforesis sobre membrana en la microzana con soluciones amortiguadoras de acetato de sodio-ac. clorhídrico y formiato de sodio ac. fórmico. En ningún caso se mostró resolución apreciable en los patrones electroforéticos, en ambos casos, la proteína apareció como una sola banda ancha y difusa, quedándose casi toda en el origen. Siguiendo el método descrito por Lee, J.W. en 1963 (14), para la separación por electroforesis de las proteínas del gluten de trigo, usando gel del poliacrilamida y solución amortiguadora pH 8.6 (del lado alcalino del punto isoeléctrico), también se fracasó, ya que la proteína no penetraba dentro del gel.

Posteriormente, se usó la electroforesis en gel de poliacrilamida con soluciones amortiguadoras de acetato de sodio-ac. clorhídrico y formiato de sodio-ac. fórmico pH 3.1-3.3, lográndose buena resolución en los dos casos, sólo que en el último la separación de los componentes fue más clara y la movilidad fué mayor.

Al hacerse la electroforesis de los glútenes de cada una de las variedades de trigo que aparecen en la tabla 3, así como de los extractos preparados para la cromatografía, conteniendo las proteínas totales, y de

las soluciones de proteína "tipo", se obtuvieron varios patrones electroforéticos diferentes para cada variedad.

Como puede observarse en las fotografías (Fig. 14-16), y más claramente en los diagramas de las diferentes fracciones que se separaron por electroforesis (Fig. 17-19), se obtuvieron varias bandas que representan los diferentes componentes de las proteínas que constituyen las harinas de trigo.

La designación de las bandas (A, B, C, etc.), fué convencional para mayor facilidad y comodidad en la identificación y comparación de cada una de ellas, el ancho de las bandas de una aproximación de la concentración relativa de los componentes.

Electroforesis de las muestras de proteínas tipos.

Al hacerse la electroforesis de la proteína tomada como "tipo" de "glutenina" (Fig. 14a y 17a), se observó una banda ancha en la parte superior que no alcanzó a penetrar dentro del gel, debido, tal vez, a su gran tamaño molecular (10), representada por la letra "A", además, de otra banda casi imperceptible que sí penetró y que seguramente sean "trazas" de impurezas de gliadina, con lo cual, y consecuentemente, se comprueba los trabajos anteriores en los que esta misma fracción, perfectamente identificada, tampoco penetra dentro de los geles de almidón (25) y acrilamida usados (17).

La identificación de los distintos componentes de la fracción "gliadina" (Fig. 14b y 17b); se hizo por medio de la electroforesis de la

muestra tomada como tipo, resolviéndose en 10 componentes que penetraron - dentro del gel (B, C,D,E,F,G,H,I,J,H), lo cual concuerda con los datos obtenidos de la literatura, en cuanto a que las fracciones identificadas como - componentes de la gliadina, penetran, todos ellos, dentro de los geles usados. Sin embargo, el número mayor de bandas que se reporta, utilizando gel de almidón, es de 8 (25).

El patrón electroforético para la muestra tomada como "tipo" de - "gluten de trigo" (Fig. 14c y 17c), muestra la banda correspondiente a la - glutenina más 10 bandas que penetraron dentro del gel, de movilidad electroforética similar a los componentes de la gliadina; comprobándose así, la - participación de estas dos proteínas en la formación del "gluten".

Cabe hacerse notar que la relación de estas bandas a los componentes de las fracciones del gluten coinciden con los componentes encontrados en la electroforesis de las fracciones correspondientes separadas por cromatografía en otros trabajos (Jones, Babcock, Taylor y Dimler) (9).

Electroforesis de los glútenes.

El efecto de preparación del gluten de las distintas harinas de - trigo, dificultó la completa disolución de éste, en la solución amortiguadora de formiato de sodio, por lo que al hacerse las soluciones para la electroforesis, la parte insoluble se separó por centrifugación; como consecuencia de esto, y al no penetrar la fracción glutenina dentro del gel, no fué - posible hacer comparaciones cuantitativas en la relación gliadina-glutenina en las diferentes variedades como se hizo en la separación cromatográfica.

Cuando se hizo la separación electroforética de los glútenes de las diferentes variedades de trigo y comparando sus patrones (Fig. 15 y 18) con los obtenidos en la electroforesis de las proteínas tipos, se notaron las bandas (en igual o menor número) correspondientes a los componentes de la fracción gliadina más la banda perteneciente a la glutenina. En algunos patrones, la separación en la región de las bandas (E,F,G,H,I,J,K), no fué muy clara, dando la impresión de ser cuatro componentes o fracciones principales formados por mayor número de subcomponentes. Sin embargo, en algunos casos, en que la separación fué mejor, por ejemplo en la variedad "Barba Negra" y Jori (Figs. 15 y 18) se observaron 7 bandas perfectamente nítidas en esta región.

En algunos geles, se notó también la presencia de una banda que se movieron a la cabeza de los componentes del gluten, y cuya movilidad electroforética corresponde a los componentes de las fracciones de proteínas aisladas de los extractos acuosos de las harinas de trigo (Jones, Babcock, Taylor y Dimler) (9); bajo esta base fueron identificadas como albúminas y globulinas.

Se cree que estas proteínas están presentes en las preparaciones de los glútenes como resultado de un atrapamiento físico durante el lavado de la bola de gluten (11,24), sin embargo; en ciertos casos, en los que se presume que el lavado fué mejor, no se notaron estas bandas, comprobándose así su identificación.

Debería esperarse una similitud en los patrones electroforéticos entre los glútenes de los trigos tetraploides (T.durum) de baja calidad de proteína (Figs.15 y 18 a,b,c,) y entre los de los trigos hexaploides (T.vul

gare) (Figs. 15 y 18 d, e) de buenas propiedades de panificación; sin embargo, los resultados muestran diferencias marcadas aún entre los trigos de la misma especie. Lo mismo sucede con los glútenes de las mezclas comerciales estudiadas (Figs. 15 y 18 f, g). Evidentemente, las diferencias entre las diferentes especies fueron mayores.

Como puede observarse, la movilidad de las bandas fué la misma en casi todas las preparaciones de los glútenes; sin embargo, el número de éstas, así como la distribución y concentración varió en algunos casos.

El poder de resolución de la región en que se encuentran las bandas E,F,G,H,I,J,K, y de los componentes representados por las bandas B,C y D Explica las diferencias encontradas en el número de fracciones en las distintas variedades de trigo, que van desde 6 hasta 11.

Al ser comparados los patrones electroforéticos del gluten de las harinas de trigo estudiadas en este trabajo, con el patrón electroforético del gluten de trigo "Ponca" (Fig. 3), el más extensamente estudiado y en el que se ha hecho la mejor identificación de los componentes del gluten(25), se encuentran semejanzas, a pesar de los diferentes medios de soporte y soluciones amortiguadoras usados. Por ejemplo en la electroforesis del gluten del trigo "Jori" (Figs. 15 y 18 c), los siete componentes de la gliadina que se movieron más rápidamente (E,F,G,H,I,J,K), probablemente correspondan, conjuntamente a las fracciones alfa₁, alfa₂, beta₁, beta₂, beta₃, beta₄, gamma; y alguna de las bandas B,C,D que se movieron más lentamente a la fracción omega del gluten de trigo "Ponca, basándonos para ésta comparación en la observación de sus distancias de migración.

El resultado de estas comparaciones parece indicar que fué la aparición de las bandas B,C,D y no una sola, la causante de que el número mayor de componentes encontrados para la fracción gliadina fueran 10 y no 8 como se ha reportado (9, 25).

Evidentemente, la fracción que no penetró dentro de los geles, corresponde a la glutenina.

Electroforesis de las proteínas totales.

El análisis electroforético de las soluciones conteniendo las proteínas totales de las harinas de trigo (Fig. 16 y 19) muestra correspondencia e identidad con los componentes presentes en la electroforesis de los glútenes correspondientes, observándose únicamente que la separación de las bandas fué menos clara, aunque la resolución fue la misma; notándose además mayor concentración de proteína en la región correspondiente a los componentes de las fracciones hidrosolubles que se mueven a la cabeza de los componentes del gluten (25), aunque no se logró claridad en la separación. Se presume además, que algunas bandas que se movieron con mayor rapidez se salieron del gel, ya que como se ha mencionado, se han encontrado hasta 11 componentes electroforéticos para la fracción albúmina y cuando menos 3 componentes clasificables como globulinas (5).

La detección "parcial" de estas fracciones no fué significativa en la interpretación de los resultados, si se tiene en cuenta que la calidad de las harinas está relacionada principalmente a la proteína del "gluten" (20) como ya se mencionó en los antecedentes de este trabajo.

El exámen de los patrones electroforéticos muestra que cada variedad tiene un patrón característico, y que aunque algunos de los trigos de la misma especie muestran similitud, ésto no hace posible relacionar ningún tipo de patrón electroforético a la calidad y propiedades funcionales de las harinas. Por ejemplo, las variedades Inia y Siete Cerros son de la misma especie y sin embargo difieren grandemente en sus patrones electroforéticos.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran diferencias en las cantidades relativas de algunos de los componentes presentes, así como la presencia o ausencia de algunos de éstos, diferencias que tal vez podrían explicar la diversidad existente entre las harinas.

Es interesante comparar los resultados descritos en este trabajo con los otros métodos de separación electroforética, encontrándose que los resultados no son estrictamente comparables, debido a que la separación y caracterización de los componentes de las distintas fracciones proteicas que constituyen las harinas de trigo se ha hecho por electroforesis de fase móvil (2,11) y electroforesis de zona en gel de almidón (4,5,25), usando soluciones amortiguadoras de lactato de aluminio. En el caso en que se han hecho estudios con geles de acrilamida (8,12,14,15,17), el poder de resolución fué menor y la caracterización de las fracciones no ha sido bien establecida.

La solución amortiguadora de formiato de sodio-ácido fórmico no ha sido utilizado con anterioridad para el estudio de las proteínas de trigo. Así pues, debemos aceptar que el método de electroforesis usado en el

presente trabajo, usando gel de acrilamida y solución amortiguadora de formiato de sodio pH 3.1 - 3.3 dió mejores resultados en la resolución de las fracciones, dando en algunos casos hasta 11 componentes para las proteínas del gluten, 10 de los cuales penetran dentro del gel correspondientes a la fracción gliadina y uno que permanece en el origen perteneciente a la fracción glutenina.

SUGERENCIA.

Se considera que los resultados obtenidos en esta tesis, pueden servir de base a trabajos posteriores para los que se sugeriría continuar el análisis electroforético pero de la fracción glutenina por un método - que permita la entrada de sus componentes al gel; o bien, podría hacerse - el estudio clínico de niños celíacos alimentados por productos elaborados con las harinas de las diferentes variedades de trigo aquí estudiadas, para comprobar si con las demás especies de propiedades semejantes al trigo - Barrigón Bajío o "Barba Negra" tampoco se presenta el cuadro clínico característico de la intolerancia hacia el gluten de trigo; con el fin de encontrar mayores datos que puedan ser utilizados en la alimentación de estos pacientes.

V CONCLUSIONES

1. De los métodos de separación de proteínas utilizados en el presente trabajo, la cromatografía en columna de Sephadex G-200, usando como solvente una solución de ácido acético, urea y bromuro de cetil trimetil amonio (AUC), aportó mayores datos que la electroforesis para el estudio de las relaciones existentes entre las proteínas y la "calidad" de las diferentes harinas de trigo estudiadas. Sin embargo, en la electroforesis en gel de acrilamida y solución amortiguadora de formiato de sodio-ácido fórmico pH 3.1-3.3, la separación y el poder de resolución de los componentes de las proteínas fué mejor.
2. Por medio de la cromatografía lograron separarse las proteínas totales de las diferentes harinas de trigo en 3 fracciones principales; identificadas como "gluteninas", "gliadinas" y "albúminas" o "globulinas".
3. En la separación cromatográfica pudo notarse que una mayor protección en el porcentaje de composición entre las proteínas del gluten (glutenina-gliadina) da como resultado harinas con mejores características en los procesos de panificación, mientras que a mayor desproporción, se produce el caso contrario.
4. Para las harinas de las variedades de trigo Barrigón Bajfo, Triticale y Jori C-69, la relación glutenina-gliadina fué aproximadamente 1:2. para las harinas de mejor "calidad" panadera: Gold Medal, Tres Estrellas, Siete Cerros T-66, e Inia F-66, la relación fue aproximadamente 1:1 respectivamente.

5. El contenido de proteínas solubles tales como albúminas y/o globulinas fué mayor en las especies T. durum o tetraploides.
6. Pudo comprobarse que el valor de una harina de trigo depende no sólomente del contenido de proteína, sino que también de la "calidad" de la proteína.
7. Se considera que las diferencias encontradas en la relación glutenina-gliadina, pueden ser tomadas en cuenta en los procesos de mejoramiento de las harinas de trigo.
8. Por medio de la separación electroforética de las proteínas de las distintas harinas de trigo, se encontraron hasta 10 componentes para la fracción gliadina que penetraron dentro del gel de acrilamida y 1 componente para la glutenina que no alcanzó a penetrar. Para las fracciones de proteínas solubles únicamente se obtuvieron algunas bandas, cuya separación no fué clara, presumiéndose que e otras se salieron debido a su mayor movilidad electroforética.
9. No fue posible relacionar ningún tipo de patrón electroforético a determinada especie de trigo, ya que tanto en los trigos de baja calidad de gluten (Barrigón Bajío o "Barba Negra", Triticale y Jori C69), como en los de buena calidad (Inia F-66, Siete Cerros T66, Gold Medal y Tres Estrellas), se encontraron diferencias entre sí.

10. Sin embargo, por el método de electroforesis usado en este trabajo, la resolución óptima en el número de componentes que se obtuvo fue de 11, mientras que el máximo número de componentes encontrados en el gel de almidón que se reporta en la literatura para las proteínas del gluten es de 9; comprobándose así la mayor - - efectividad del método usado en el presente estudio.

VI BIBLIOGRAFIA

1. Blish, M.J. Wheat Gluten. In Advances in Protein Chemistry. 2:337-59 (1945).
2. Coats, J.H., and Simmonds, D.H. Proteins of wheat and flour. Extraction, fractionation, and chromatography of the buffer-soluble proteins of flour. Cereal Chem. 38: 256-271 (1961).
3. Coulson, C.B., and Sim. A.K. Starch-gel electrophoresis of isolated - wheat gluten. Biochem. J. 80: 46P (1961).
4. Elton, G.A.H., and Ewart, J.A.D. Starch-gel electrophoresis of wheat - proteins. Nature 187: 600 (1960).
5. Elton, G.A.H., and Ewart, J.A.D. Starch-gel electrophoresis of cereal- proteins. J. Sci. Food Agr. 13 (1): 62 (1962).
6. Gluten Enteropathy. Nutrition Reviews. 21 (10): 300-301 (1963).
7. Gordon, A.H. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch- gels. North-Holland Pub. Co. Amsterdam, London (1969).
8. Jankiewicz, M., and Pomeranz, Y. Isolation and characterization of - wheat flour proteins. I. Separation of salt and acetic acid dispersi- ble proteins by gel filtration, polyacrylamide gel electrophoresis, - and sucrose gradient ultracentrifugation. J. Sci. Food Agr. 16: 644- (1965).
9. Jones, R.W., Babcock, G.E. Taylor, N.W., and Dimler, R.J. Fractiona- tion of wheat gluten by gel filtration. Cereal Chem. 40: 409-414 - (1963).
10. Jones, R.W., Babcock, G.E., Taylor, N.W., and Senti, F.R. Molecular - weights of wheat gluten fractions. Arch. Biochem. Biophys. 94: 483--- 488 (1961).

BIBLIOTECA CENTRAL
MAY 11 1964