



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE HORDEÍNAS EN SEMILLA Y MALTA DE DIFERENTES  
VARIETADES DE CEBADA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

Marisol Salgado Albarrán



MÉXICO, D.F.

Año 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor:** Marina Gavilanes Ruiz  
**VOCAL:**                           **Profesor:** José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio  
**SECRETARIO:**               **Profesor:** Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
**1er. SUPLENTE:**           **Profesor:** Martha Patricia Coello Coutiño  
**2° SUPLENTE:**               **Profesor:** Norma Angélica Camacho de la Rosa

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Laboratorio 103, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E,  
Facultad de Química, UNAM.

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

## **SUSTENTANTE (S):**

---

Marisol Salgado Albarrán

# CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I .....	3
1 Generalidades sobre la planta de cebada .....	3
2 Variedades de cebada .....	4
2.1 Variedades mexicanas de cebada .....	6
2.1.1 Variedad HV2005-19 .....	7
1.1.1 Variedad HV2005-04 .....	7
2.1.2 Variedad HV2007-23 .....	7
2.1.3 Variedad HV2008-11 .....	8
2.1.4 Variedad HV2007-18 .....	9
3 La producción de malta y cerveza .....	9
3.1 Malteo .....	10
3.1.1 Selección, limpieza y remojo .....	10
3.1.2 Germinación .....	11
3.1.3 Secado y eliminación de raicillas .....	12
3.2 La producción de cerveza .....	13
3.3 Problemas comunes durante la fabricación de malta y cerveza .....	14
4 Proteínas de almacenamiento de la semilla .....	15
4.1 La superfamilia de prolaminas en cereales .....	16
4.1.1 Hordeínas .....	17
4.1.2 Estructura .....	21
4.1.3 Biogénesis .....	22
4.1.4 Movilización durante la germinación .....	23
5 Hordeínas como marcadores moleculares relacionados con calidad de la malta y la cerveza .....	24

CAPÍTULO II .....	30
1 Material vegetal .....	30
2 Extracción de hordeínas .....	31
6 Preparación de la muestra para electroforesis .....	31
7 Análisis de patrones de hordeínas.....	31
8 Identificación por espectrometría de masas .....	32
CAPÍTULO III .....	34
1 Patrones de hordeínas de semilla seca .....	34
1.1 Condiciones de campo.....	35
1.2 Condiciones de invernadero.....	36
2 Patrones de hordeínas de malta .....	39
3 Identificación por espectrometría de masas .....	43
CONCLUSIONES.....	51
PERSPECTIVAS.....	52
ANEXOS .....	53
1 Parámetros de calidad de la malta .....	53
2 Proteínas identificadas por EM .....	57
3 Digestión in sílico de hordeínas .....	60
Bibliografía .....	70

## INTRODUCCIÓN

La cebada (*Hordeum vulgare*) es un antiguo e importante cereal originario de medio oriente. Mundialmente su grano se destina tanto a la producción de alimentos de consumo humano y animal (70%) como para malteo y producción de cerveza (30%).

En contraste, el 80% de la producción en México está dirigida a la elaboración de malta y cerveza. Además, nuestro país es actualmente uno de los exportadores de cerveza más importantes del mundo; de ahí que el cultivo de este cereal es de gran importancia económica.

Existen diferentes variedades de cebada, las cuales fueron seleccionadas por su capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales y prácticas de cultivo de los agricultores, así como por su desempeño durante el proceso de malteo y fabricación de cerveza. En México se utilizan principalmente cinco variedades: HV2005-04, HV2005-19, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11; la primera es la preferida para la producción de malta.

Durante la producción de malta, las características de la semilla inicial son determinantes para establecer las condiciones con las que se obtendrá dicho producto. La industria maltera cuenta con pruebas para evaluar la malta; no obstante, dichas pruebas no permiten predecir la calidad de la malta de forma confiable. Igualmente, no se cuenta con métodos bioquímicos que distingan la variedad de cebada que es proporcionada inicialmente por los agricultores.

A pesar de estas problemáticas, la industria maltera está comprometida a proveer malta de la calidad necesaria para la producción de cerveza. Dado que se procesan cantidades de materia prima en el orden de toneladas, la industria se ve en la necesidad de hacer una mayor inversión de recursos para alcanzar una calidad similar entre lotes de semillas con características diferentes.

De esta forma, el presente trabajo analiza a un grupo de proteínas que tienen potencial para ser utilizados como marcadores moleculares en cebada, lo que

podría contribuir a resolver los problemas descritos. Esto se realiza mediante el análisis de una familia de proteínas conocidas como *hordeínas*, abundantes en semilla de cebada.

Las hordeínas son proteínas de almacenamiento en semilla altamente polimórficas y, en estudios anteriores realizados con otras variedades, se han propuesto como marcadores moleculares que permiten diferenciar entre éstas. Sin embargo, en variedades mexicanas de cebada no se conoce esta información.

Dicho lo anterior, se plantea como hipótesis que los patrones electroforéticos de hordeínas de las variedades mexicanas son distintos entre sí.

El objetivo principal de este proyecto es analizar y comparar los patrones de acumulación de hordeínas en semilla seca y malta de diferentes variedades mexicanas de cebada mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS PAGE). Esto es con el fin de identificar bandas diferenciales que tengan potencial de ser utilizadas como marcadores moleculares que permitan, además de otros propósitos, distinguir entre dichas variedades.

En suma, el presente trabajo aborda esta problemática iniciando con los antecedentes relacionados con el problema en estudio, enseguida se describe la metodología utilizada para obtener los patrones electroforéticos de hordeínas, y finalmente se muestran los resultados obtenidos, su discusión y las perspectivas que surgen de los resultados.

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### **1 Generalidades sobre la planta de cebada**

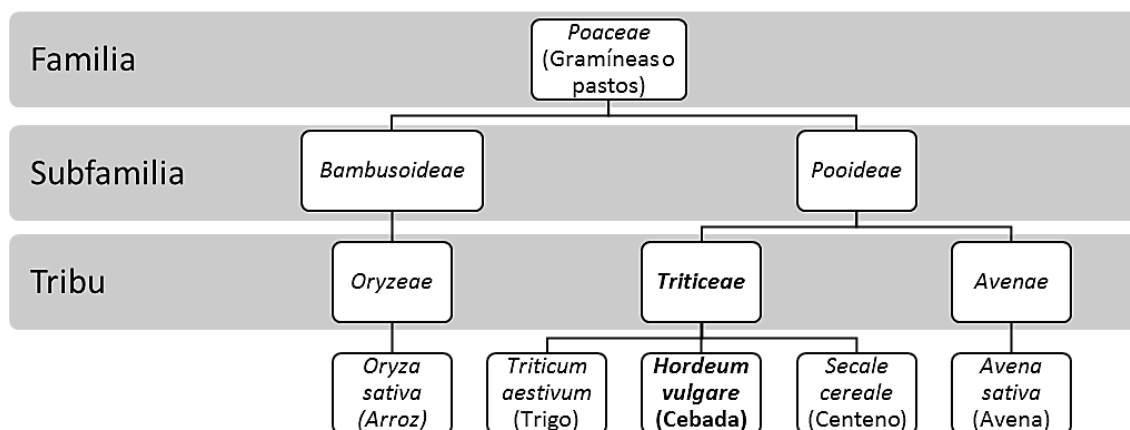
La cebada (*Hordeum vulgare*) es una planta monocotiledónea, miembro de la familia Poaceae también llamada familia de las gramíneas o pastos (Figura 1). Su semilla ha sido utilizada desde la antigüedad y actualmente está dentro de los 5 cultivos con más producción en el mundo después del maíz (*Zea mays*), el trigo (*Triticum spp.*), el arroz (*Oriza sativa*) y la soya (*Glycine max*). Asimismo, fue uno de los primeros cultivos domesticados por el hombre, junto con el trigo, el chícharo y las lentejas, datando su manejo desde hace aproximadamente 10 mil años en el Creciente Fértil (Mesopotamia y norte de Arabia) (Byung & Ullrich, 2008).

Además, la cebada fue posiblemente usada primero como producto de consumo humano y posteriormente como alimento para animales, malteo y producción de cerveza. Como resultado, actualmente se utiliza como materia prima para la producción de malta y cerveza (Byung & Ullrich, 2008).

Es también el cereal más ampliamente adaptado a diferentes ambientes, ya que crece en diversas latitudes y altitudes, así como en climas templados y de frío extremo, incluyendo los desiertos y los trópicos. Debido a esto, ha sido un modelo importante para estudiar adaptación ecológica de plantas (Byung & Ullrich, 2008; EnsemblPlants, Versión 030312v2, 2014).

Este cereal es uno de los más diversos genéticamente, por lo que también se utiliza como modelo natural para estudios genéticos y genómicos de la tribu *Triticeae*. Su genoma tiene un tamaño de 5.3 Gpb en 7 cromosomas y es uno de los genomas diploides más grandes secuenciados hasta la fecha (EnsemblPlants, Versión 030312v2, 2014).





**Figura 1.** Taxonomía de la familia de las Gramíneas. Tomado de Byung & Ullrich, 2008.

Finalmente, la cebada es una planta anual de la cual existen distintas variedades, entre los que destacan aquellas que son sembradas en otoño (cebada de invierno) y otras que son plantadas en primavera (cebada de primavera), cuyos granos pueden estar ordenados en dos o seis hileras (Briggs, *et al.*, 2004).

## **2 Variedades de cebada**

Como ya se mencionó en la sección anterior, existe un gran número de variedades de cebada; sin embargo, es indispensable comprender, en primer lugar, el término *variedad*. Por esta razón, en este apartado se hará una breve revisión sobre su definición y se mostrarán a detalle las características de una canadiense y cinco mexicanas.

El término *especie* es una conocida unidad de la clasificación botánica del reino vegetal; sin embargo, dentro de una especie puede haber muchos tipos diferentes de plantas. Los agricultores y los productores necesitan plantas con características particulares adaptable a su entorno y a prácticas de cultivo. Por lo tanto, una *variedad vegetal* representa a un grupo de plantas, seleccionado dentro de una especie, que muestran una serie de características comunes y constantes (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, 2010).

En el caso particular de la cebada, cada variedad tiene diferencias en la composición de su semilla (entre otras características que en este trabajo no se abordan), y de acuerdo a esto cada variedad tiene diferentes propiedades de procesamiento durante el malteo o distinta calidad para su uso final. Por ejemplo, la cebada sin cáscara requiere poco o casi ningún esfuerzo para que ésta sea removida durante el procesamiento del grano y por lo tanto, las variedades con esta característica son las más adecuadas para el consumo humano en forma de alimento. En contraste, la cebada con cáscara es preferida para malteo y producción de cerveza debido a que este tejido contribuye al sabor y ayuda en las filtraciones respectivas. No obstante, es difícil distinguir el grano de cebada adecuado para cada uso, ya que existen pocos criterios que permitan diferenciar entre variedades (Byung & Ullrich, 2008).

Algunas variedades tienen un alto rendimiento en grano y producen semillas ricas en proteínas. Mientras que otras variedades tienen poca producción de granos pero se adaptan bien a los procesos de malteo. Entre estas últimas, destaca la variedad Metcalfe (denominada HV2008-08, o simplemente 08 en este trabajo) por su desempeño durante el malteo, siendo la variedad preferida para este fin.

**Tabla 1.** Características malteras de la variedad HV2008-08 comparadas con Harrington y Manley.

<i>Variedad</i>	<i>Harrington</i>	<i>Manley</i>	<i>08</i>
<i>Proteína total (%)</i> <sup>*</sup>	11.5	11.1	11.5
<i>Extracto (%)</i> <sup>x</sup>	72.2	74.2	77.1
<i>Proteína soluble (%)</i> <sup>x</sup>	4.37	4.3	4.76
<i>Poder diastásico (°L)</i> <sup>*y</sup>	97	113	118
<i>Alfa amilasa (DU)</i> <sup>*z</sup>	51.5	51.9	54.2
<i>B-glucano (mg L<sup>-1</sup>)</i> <sup>w</sup>	488	373	255

<sup>\*</sup>Con base en semilla seca. <sup>x</sup>Con base en malta seca. <sup>y</sup>Grados Lintner. <sup>z</sup>Unidad de dextrinización. <sup>w</sup>Con base en el extracto de malta.

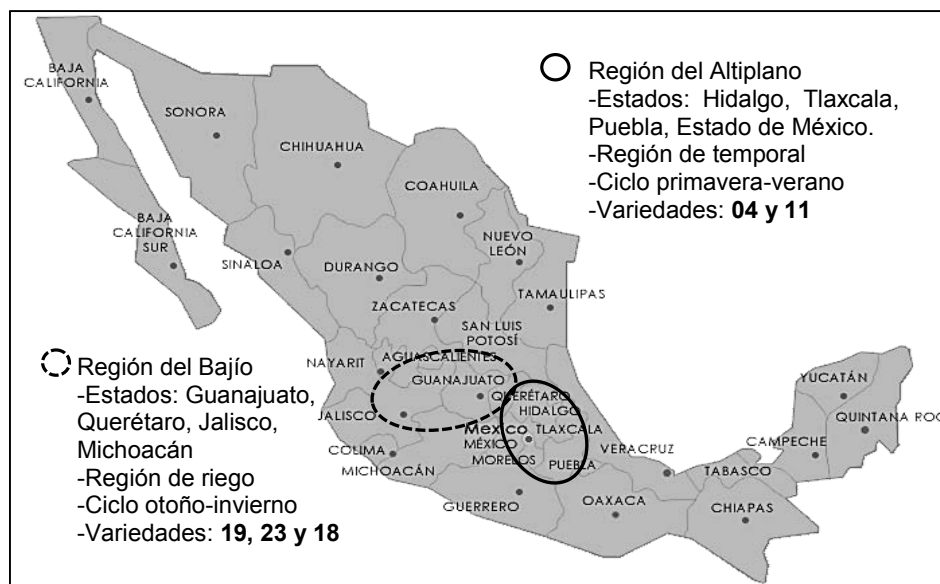
La variedad 08 es canadiense, de dos hileras y se siembra en primavera. Fue liberada comercialmente en el año 1997. Destaca por la excelente calidad de malta que se obtiene de ella, como se muestra en la Tabla 1, en la que se comparan algunos parámetros de calidad de la malta (Véase Anexo 1) obtenida de 08 y otras

dos variedades que previamente eran consideradas como buenas variedades malteras (Harrington y Manley) (Legge, *et al.*, 2002).

## 2.1 Variedades mexicanas de cebada

En México se cultivan cinco variedades de cebada sobre una superficie mayor a 300,000 hectáreas (Castillo, *et al.*, 2012). Estas variedades fueron desarrolladas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) para satisfacer la necesidad de plantas que se adaptaran a las condiciones de cultivo en México y, al mismo tiempo, cumplir con la demanda de granos de las industrias maltera y cervecera. Estas variedades son: HV2005-04, HV2005-19, HV2007-23, HV2007-18 y HV2008-11; denominadas en adelante como 04, 19, 23, 18 y 11 respectivamente.

Por otro lado, existen dos regiones principales de cultivo de cebada en México: el Bajío y el Altiplano (Figura 2). Los principales estados productores en la región del Bajío son Guanajuato, Querétaro, Michoacán y Jalisco, que cultivan las variedades 19, 23 y 18 en condiciones de riego; mientras que en la región del Altiplano, la producción se concentra en los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y el Estado de México, donde se cultivan las variedades 04 y 11 en temporal (Fernández Vera, 2013).



**Figura 2.** Mapa de la República Mexicana y las regiones importantes en la producción de cebada (Bajío y Altiplano).

A continuación se presentan algunas de las principales características de las variedades mexicanas:

### **2.1.1 Variedad HV2005-19**

Liberada en 1989 y tiene en su genealogía genes de la variedad Dwarf Good de la India. Es resistente al acame (doblez o inclinación que sufre el tallo de las plantas), al desgrane, es tolerante a la cenicilla (*Erysiphe graminis*) y a la roya de la hoja (*Puccinia hordei*). Además, es la primera variedad mexicana con tolerancia a la roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*). No tiene éxito bajo condiciones de temporal, en contraste con entornos de riego. Junto con la 04, es una de las variedades más cultivadas en México (Aguado, 2008).

### **1.1.1 Variedad HV2005-04**

Esta variedad fue liberada en 1991. Entre sus características se encuentran la tolerancia a la roya lineal amarilla, a la mancha reticular (*Helminthosporium teres*), a la escaldadura de la hoja (*Rynchosporium secalis*) y moderadamente tolerante a la roya de la hoja. Tiene un mayor potencial de rendimiento y calidad que cumple con la demanda de la agroindustria.

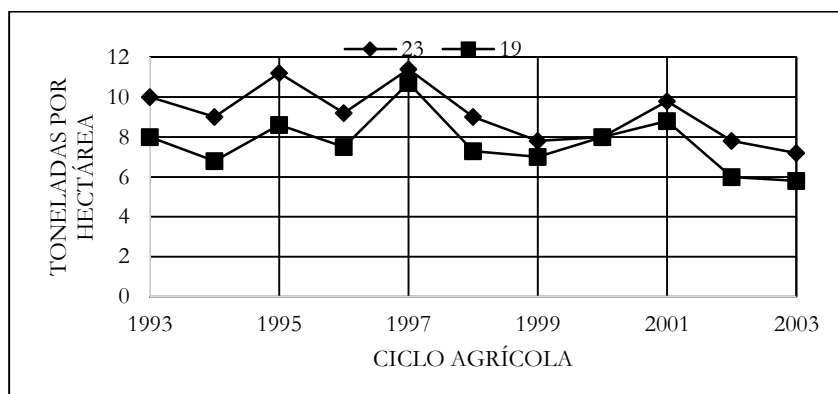
Para esta variedad, en general, las plagas no presentan un problema de importancia económica; sin embargo, la falta o exceso de agua puede provocar un ataque de pulgones.

Por el balance que guardan sus componentes químicos en el grano malteado, como extracto molienda fina, diferencia de extracto molienda fina a extracto molienda gruesa, poder diastásico, alfa amilasa y proteína soluble a proteína total, entre otras (datos no disponibles), es óptima en la elaboración de malta para la industria maltera-cervecera (SAGARPA, 2014).

### **2.1.2 Variedad HV2007-23**

Liberada comercialmente en el año 2006. Presenta tolerancia a las enfermedades comunes de la región del Bajío y posee un alto rendimiento potencial con muy buena

calidad industrial. Es tolerante a la roya lineal amarilla, a la cenicilla y moderadamente tolerante a la roya de la hoja. Tiene un rendimiento 18% mayor que la variedad 19 (Gráfico 1) (Solano, *et al.*, 2009).

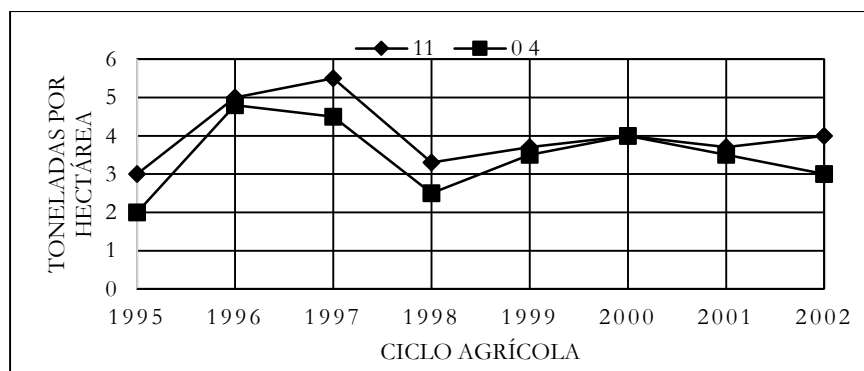


**Gráfico 1.** Rendimiento de la variedad 23 en comparación con la 19.

### 2.1.3 Variedad HV2008-11

Esta variedad fue liberada en el año 2004. Presenta tolerancia a enfermedades comunes y posee alto rendimiento potencial con excelente calidad industrial para la siembra en ambientes de producción de temporal de muy buena y buena productividad.

Además, tiene un rendimiento experimental promedio superior en 15% respecto a HV2005-04 (Zamora, *et al.*, 2008).



**Gráfico 2.** Rendimiento de la variedad 11 en comparación con la 04.

### 2.1.4 Variedad HV2007-18

La variedad HV2007-18 tiene tolerancia a las principales enfermedades de la cebada maltera en condiciones de riego, así como moderada tolerancia a la roya de la hoja, alto potencial de rendimiento, calidad industrial y ciclo vegetativo más corto que la variedad HV2005-19. Tiene un rendimiento 12% mayor al mostrado por HV2005-19 (Zamora, *et al.*, 2010).

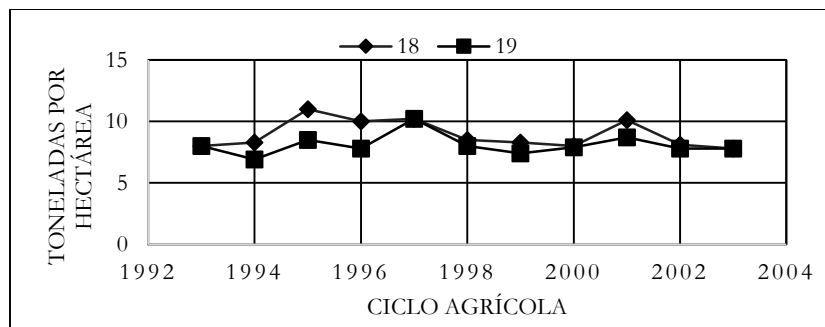


Gráfico 3. Rendimiento de la variedad 18 en comparación con 19.

## 3 La producción de malta y cerveza

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los principales usos de la cebada es en la fabricación de malta y cerveza.

La malta es el grano de cebada germinado y secado o tostado en condiciones controladas. En el mundo, aproximadamente solo un tercio de toda la producción de cebada está dirigida a la fabricación de malta. Sin embargo, en México una gran proporción de la producción se utiliza para este fin (70-80%). Además, México es uno de los países productores de cerveza más importantes. Considerando esto, conocer el proceso de elaboración de la malta y la cerveza es de vital importancia para entender los problemas a los que se debe enfrentar la industria maltera y cervecera para ofrecer un producto final de buena calidad.

A continuación se presenta una breve reseña sobre el proceso de fabricación de la malta y la cerveza, finalizando con una explicación sobre los problemas que se tienen actualmente en éste ámbito.

Para comenzar, debemos mencionar que la cerveza es una bebida alcohólica inventada por las primeras civilizaciones humanas del Medio Oriente que se obtiene a partir de la fermentación de la malta.

### 3.1 Malteo

Las maltas se obtienen a partir de cereales seleccionados, usualmente cebada, aunque pueden utilizarse igualmente el trigo, centeno y el sorgo.

El malteo consta de varias etapas (Figura 3) (Briggs, *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Etapas del proceso de elaboración de malta.

#### 3.1.1 Selección, limpieza y remojo

Primeramente, las semillas son limpiadas y almacenadas hasta que el periodo de dormancia ha terminado. Los granos deben ser de la calidad adecuada, es decir, deben cumplir o superar ciertas especificaciones. Esta evaluación incluye revisión por infestación de insectos y humedad, así como presencia de hongos patógenos (Briggs, *et al.*, 2004).

En México, los parámetros de calidad para la cebada maltera se encuentran establecidos en la NMX-FF-043-SCFI-2003 de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, en dicha norma se hace referencia a propiedades físicas que la cebada debe cumplir.

Posteriormente el grano es hidratado por inmersión en agua. La temperatura en este paso debe estar controlada ya que a altas temperaturas la absorción de agua es más rápida pero el crecimiento microbiano es acelerado y el grano puede dañarse; por lo tanto, la mejor temperatura es baja, cerca de 12°C.

Conforme el grano se hidrata, éste aumenta de 1.3 a 1.4 veces su volumen original. Asimismo, enzimas microbianas ya presentes en la superficie del grano comienzan a degradar las capas superficiales de éste.

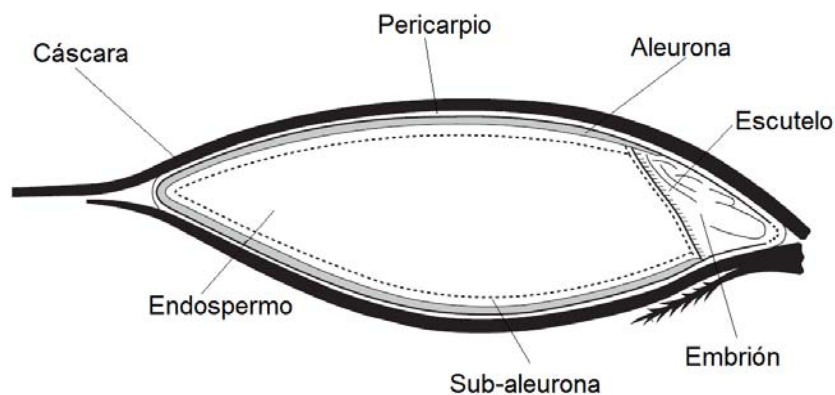
El comienzo de la germinación es identificado por la aparición de pequeñas raíces blancas que sobresalen de la base de cada grano. En este punto, el grano es transferido a un contenedor para germinación (Briggs, *et al.*, 2004).

### 3.1.2 Germinación

El grano es germinado en un grado limitado en una atmósfera a temperatura y humedad controladas. Durante la germinación, crecen las pequeñas raíces y, de forma menos evidente, el coleóptilo crece entre la cáscara. La proporción del largo del coleóptilo respecto al largo de la semilla es una guía para el seguimiento del proceso de la germinación en el malteo.

Asimismo, muchas enzimas hidrolíticas aumentan en cantidad, algunas de estas catalizan la modificación física del endospermo (Figura 4). En las etapas iniciales de la germinación, estas enzimas son liberadas del escutelo. Sin embargo, posteriormente el embrión libera giberelinas ( $GA_1$  y  $GA_3$ , ácido giberélico). Estas hormonas difunden a lo largo del grano y estimulan la síntesis de enzimas en la aleurona y su liberación hacia el endospermo. Conforme la germinación progresa, el endospermo es parcialmente degradado o modificado y su dureza disminuye.

Las etapas de la modificación del endospermo son la degradación progresiva de las paredes celulares, que involucra la liberación de  $\beta$ -glucanos, seguido por la degradación parcial de proteínas dentro de la célula y el rompimiento de los gránulos de almidón.



**Figura 4.** Esquema de la composición del grano de cebada.



Una vez que las enzimas han sido producidas en la aleurona, la modificación del endospermo ocurre rápidamente, particularmente cerca de la aleurona. En malta obtenida adecuadamente, sólo una pequeña proporción de los granos están sin modificar y contienen poco endospermo no degradado. Los productos de degradación del endospermo, tales como azúcares, aminoácidos, etc., junto con compuestos de la capa de aleurona (fosfatos, iones metálicos, etc.), difunden a través del endospermo y son el soporte del metabolismo de los tejidos vivos.

El crecimiento del embrión es mantenido inicialmente por sus propias reservas y posteriormente por moléculas solubles provenientes del endospermo.

Los procesos que ocurren durante la germinación están regulados mediante el control de la humedad, la composición del grano y la temperatura (Briggs, *et al.*, 2004).

### **3.1.3 Secado y eliminación de raicillas**

Cuando la germinación está suficientemente avanzada, ésta se detiene mediante el secado en un horno.

La temperatura aumenta progresivamente produciendo el secado de la malta. Muchas maltas pálidas son “curadas” o “cocidas” a 80°C, pero algunas están listas a más de 105°C.

Para las maltas pálidas se considera alta la cantidad de enzimas que mantienen su actividad después de estas condiciones. En maltas oscuras, el secado es con altas temperaturas y la cantidad de enzimas que sobreviven es menor. En casos extremos, maltas especiales son tostadas y no contienen enzimas activas.

Después del secado, la malta es enfriada y agitada para romper las pequeñas raíces, que posteriormente son separadas junto con el polvo producido. Las maltas pálidas son almacenadas por 4-6 semanas antes de usarlas. Las maltas tostadas son utilizadas rápidamente para evitar que los aromas especiales o sabores sean modificados (Briggs, *et al.*, 2004).

### 3.2 La producción de cerveza

La producción de cerveza es un proceso complejo que se lleva a cabo mediante diferentes pasos (Figura 5).

Primero, la malta muchas veces es premezclada con adjuntos particulares (preparaciones de cereales que modifican características de la malta y de la cerveza producida) y es molida para crear el “grist”. El “grist” es mezclado con agua y macerado en condiciones de temperatura controlada. La mezcla resultante es almacenada por un periodo de “conversión”.

Un macerado debe ser mantenido a una temperatura específica, durante tiempos predeterminados, para permitir que las enzimas “conviertan” (degraden) el almidón y dextrinas a azúcares solubles, así como la ruptura parcial de proteínas y la degradación de ácidos nucleicos y otras sustancias. El objetivo es obtener una pasta que produzca un adecuado “mosto dulce”, un líquido rico en compuestos solubles de la malta y cualquier adjunto que se le haya añadido.

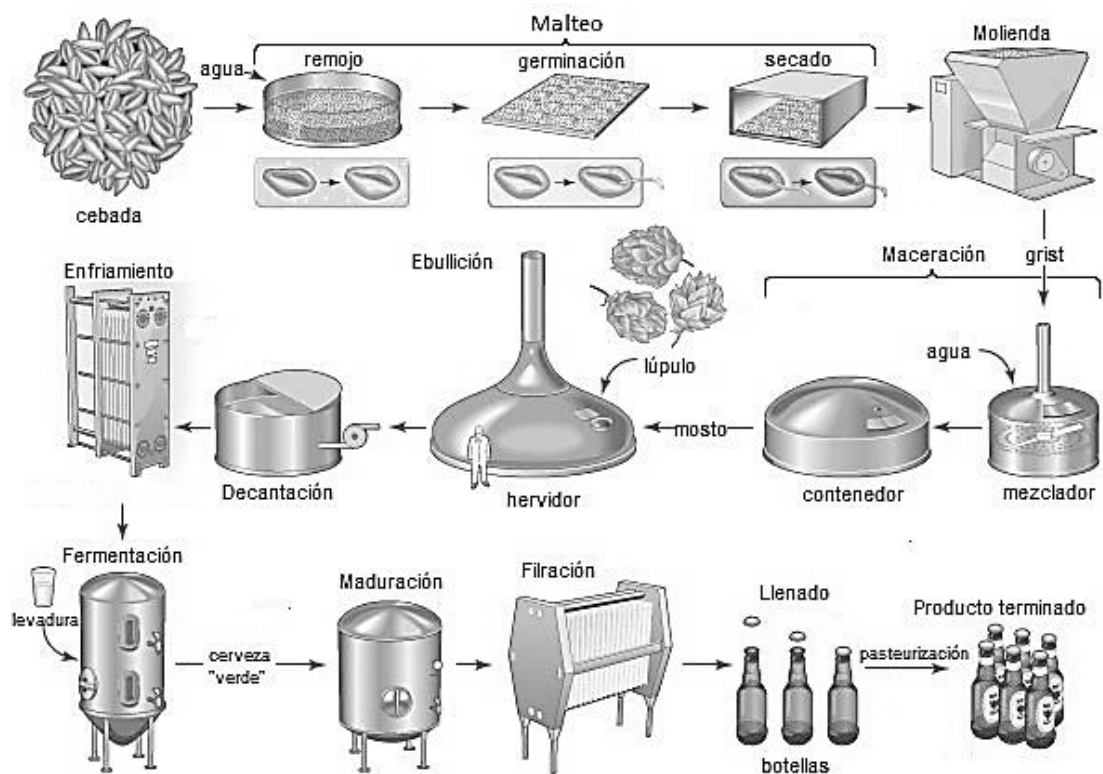


Figura 5. Proceso de elaboración de la cerveza.

Al final del macerado, el mosto dulce es separado de los sólidos no disueltos y los granos consumidos. El mosto obtenido es claro y translúcido. Posteriormente es transportado a un contenedor para ser hervido con el lúpulo usualmente de 1-2 horas. El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta trepadora que posee aceites esenciales y resinas llamados en conjunto *lupulina*. Durante la ebullición, un gran número de cambios ocurren en el mosto, entre los cuales el más evidente es la precipitación de proteínas, obtención de un sabor amargo, aroma a lúpulo y la destrucción de microorganismos. La evaporación del mosto reduce su volumen y por lo tanto lo concentra. También son removidas sustancias volátiles con aroma o sabor indeseables.

El mosto es decantado para obtener una solución clara, posteriormente es enfriado para frenar un oscurecimiento continuo y cambios de sabor. Durante el enfriamiento, una segunda separación de sólidos ocurre en el mosto.

Posteriormente es inoculado con levadura. Durante la fermentación se degradan los azúcares del mosto y se produce etanol, dióxido de carbono y calor.

Una vez que se ha completado la fermentación, la cerveza es mantenida por un periodo de maduración, durante el cual el sabor de la cerveza se define. Después, la mayoría de las cervezas son filtradas o centrifugadas para remover levaduras residuales. Las cervezas completamente translúcidas son carbonatadas y se transfieren a botellas, latas, etc. (Briggs, *et al.*, 2004).

### **3.3 Problemas comunes durante la fabricación de malta y cerveza**

Cuando la cervecería adquiere la malta, requiere también que ésta sea de excelente calidad y de precio moderado. Se espera que el rendimiento del extracto sea bueno y que la producción de cerveza marche adecuadamente.

Las maltas tienen propiedades diferentes y son usadas para producir diferentes tipos de cerveza. Para esto, existen pruebas a las que es sometida la malta para conocer sus características. Los cerveceros necesitan decidir qué conjunto de pruebas definen de mejor forma la malta con la cual hacer una cerveza en particular. Sin embargo, los análisis disponibles no predicen de forma confiable el desempeño de una malta (Véase Anexo 1).

Además, cabe mencionar que la calidad de la malta que se obtiene a partir de cada variedad de cebada es distinta.

Maltas baratas y obtenidas inadecuadamente son frecuentemente poco modificadas y/o no homogéneas y aumentan los costos de la producción de cerveza, ya que se necesita mayor inversión de tiempo y energía en la etapa de maceración o cantidades excesivas de adjuntos. Por ejemplo: deficiencias en la obtención de un extracto esperado en la cervecería, la necesidad de un programa de maceración más largo, separación lenta del mosto que prolonga la fase de decantación interrumpiendo el protocolo de producción, exceso de precipitados en la ebullición, velocidades de filtración lentos de la cerveza que necesitan filtros adicionales, etc. Por lo tanto, existe la necesidad de utilizar estabilizadores extras para la cerveza o la adición de enzimas al macerado. Todos estos problemas interrumpen el esquema de producción y aumentan los costos (Briggs, *et al.*, 2004).

Finalmente, es importante recalcar que las maltas provienen de mezclas de granos que difieren en sus propiedades, esta heterogeneidad se ve reflejada en la malta y también contribuye a algunos problemas en su producción (Briggs, *et al.*, 2004).

#### **4 Proteínas de almacenamiento de la semilla**

En primer lugar hay que mencionar que la calidad de la malta depende en gran parte de la variedad de cebada utilizada y por lo tanto de la composición de la semilla. Entre los factores más importantes se encuentran la cantidad y actividad de enzimas que degradan el almidón ( $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas) y aquellas que degradan proteínas o  $\beta$ -glucanos. Algunas enzimas se sintetizan *de novo* durante la germinación y otras se encuentran previamente en el grano de forma inactiva (zimógeno). Sin embargo, existe una gran familia de proteínas de almacenamiento, llamadas hordeínas (o prolaminas, en cereales), de las que se ha estudiado ampliamente su influencia en algunas características de la malta y la cerveza.

Existen tres tipos de proteínas de almacenamiento: albúminas, globulinas y prolaminas. Las albúminas y las globulinas están ampliamente distribuidas entre las

plantas con flor, pero las prolaminas están limitadas a los cereales (Colgrave, *et al.*, 2012).

Este apartado se enfocará en las prolaminas de cereales, en el que se mostrarán algunas de sus características y función en la semilla.

Estas proteínas de almacenamiento son una reserva de aminoácidos presente en la semilla que se utiliza durante el desarrollo embrionario de una planta. Por su abundancia e importancia económica, las proteínas de almacenamiento de semillas fueron de las primeras proteínas en ser caracterizadas.

A pesar de un alto grado de variación en sus estructuras, todas las proteínas de almacenamiento tienen algunas propiedades en común. Primeramente, son sintetizadas en altos niveles en tejidos específicos y en ciertas etapas del desarrollo. De hecho, su síntesis es regulada por la nutrición, y actúan como una fuente de nitrógeno. Además, contienen cisteína y metionina, y por lo tanto se requiere azufre en cantidades adecuadas para su síntesis (Shewry, *et al.*, 1995).

Muchos cereales tienen grupos separados de proteínas de almacenamiento, algunas de las cuales son ricas en aminoácidos con azufre y otras que son pobres en estos aminoácidos. La presencia de estos grupos permite a la planta mantener altos niveles de proteína sin importar variaciones en la disponibilidad de azufre.

Una segunda propiedad en común es su presencia en depósitos llamados cuerpos proteicos (CP).

Finalmente, todas las proteínas de almacenamiento tienen polimorfismos entre genotipos de una misma especie, que surgen de la presencia de familias multigénicas y en algunos casos, procesamiento proteolítico y glicosilación (Shewry, *et al.*, 1995).

#### **4.1 La superfamilia de prolaminas en cereales**

Las prolaminas, llamadas así por su alto contenido del aminoácido prolina, son una superfamilia que corresponde al 50% del nitrógeno total en semillas, y están presentes en la mayoría de las semillas de cereales, a excepción del arroz y la avena, en las que predominan las globulinas (Shewry, *et al.*, 1995; Kumamaru, *et al.*, 2007).

También, son tradicionalmente conocidas como un grupo capaz de solubilizarse en mezclas alcohol/agua (usualmente 60-70% [v/v] etanol o 50% [v/v] propan-1-ol) y tener un alto nivel de glutamina y prolina. Están compuestas por una mezcla de componentes polimórficos cuyo tamaño va desde 30kDa hasta 100kDa aproximadamente y se clasifican en tres grupos (Shewry & Tatham, 1990):

- Ricas en Azufre
- Pobres en Azufre
- Alto Peso Molecular

Además, a las prolaminas se les nombra de forma distinta dependiendo del cereal del que se trate. Por ejemplo, las prolaminas de cebada se llaman hordeínas; las de trigo, gliadinas y las de centeno, secalinas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Relación de las proteínas de superfamilia de prolaminas en diferentes cereales.

	<b>Cebada</b>	<b>Trigo</b>	<b>Centeno</b>
<b>Alto Peso Molecular (HMW)</b>	Hordeínas D	Glutenina de alto peso molecular	Secalinas de alto peso molecular
<b>Pobres en Azufre</b>	Hordeínas C	$\omega$ -gliadinas	$\omega$ -secalinas
<b>Ricas en Azufre</b>	Hordeínas B	Gluteninas de bajo peso molecular (LMW)	$\gamma$ -secalinas
	$\gamma$ -hordeínas	$\gamma$ -gliadinas	
	---	$\alpha$ -gliadinas	

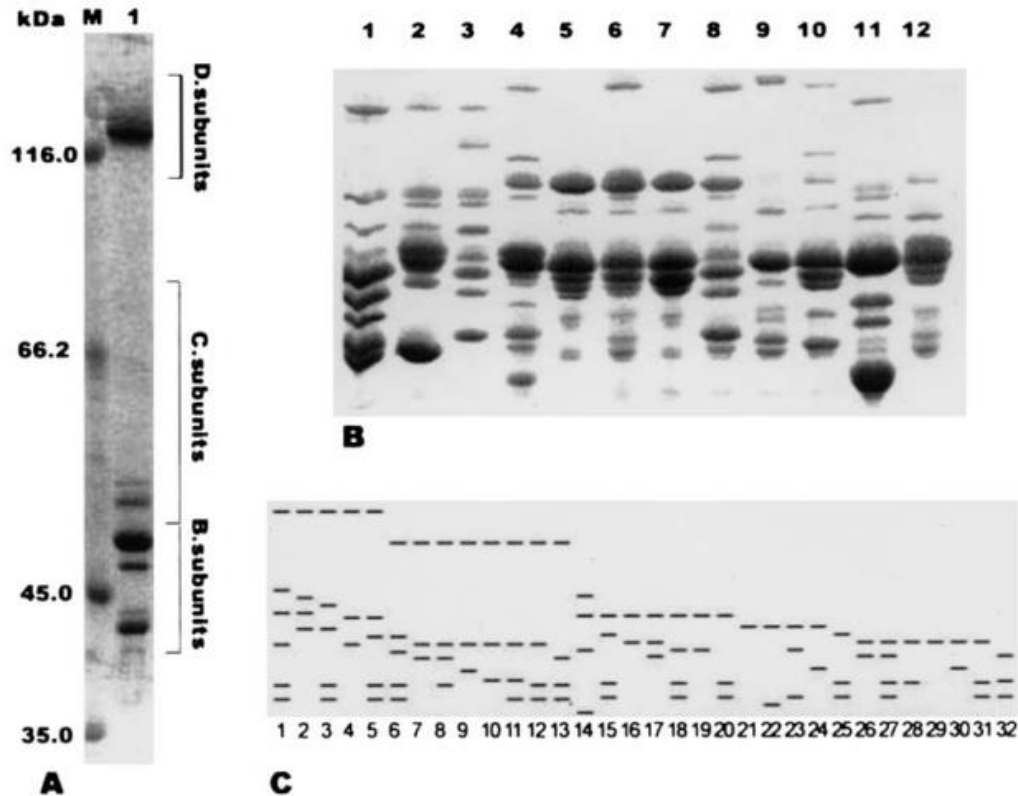
#### 4.1.1 Hordeínas

Las hordeínas, como ya se mencionó anteriormente, son las prolaminas del grano de cebada. Consisten en varias proteínas, que se clasifican en 3 grupos: hordeínas D (alto peso molecular), hordeínas C (pobres en azufre) y hordeínas B (ricas en azufre).

A pesar de ser todas solubles en mezclas alcohol-agua (como subunidades individuales), las hordeínas varían considerablemente en otras propiedades, sobresaliendo el peso molecular (PM), su punto isoeléctrico (PI) y su composición de aminoácidos (Figura 6). Por ejemplo, la proporción de los dos aminoácidos más

abundantes, glutamina y prolina, varía de 30-70% y su PM va de 30kDa a 100kDa (Shewry & Tatham, 1990).

Además, son significativamente tolerantes a mutaciones y debido a que muestran gran variación genotípica han sido utilizadas como marcadores genéticos (Shewry, *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Separación de las hordeínas B, C y D de variedades tibetanas. A) Las hordeínas B, C y D corrieron como grupos separados de distinto peso molecular en SDS-PAGE. B) Parte del gel correspondiente a las hordeínas B y C. C) Diagrama de todos los patrones encontrados para las hordeínas C. M: Marcador de peso molecular. Tomado de Yin, *et al.*, 2003.

A continuación se mostrarán las características de cada grupo de hordeínas de forma breve.

#### 4.1.1.1 Hordeínas D

Las hordeínas D son las proteínas menos abundantes en la semilla (menos del 10% del contenido total). Son codificadas por el locus *Hor3* y corresponden al grupo de mayor peso molecular, cuyo intervalo de tamaño va de aproximadamente 85-

105KDa. En general, se produce un solo polipéptido por variedad; sin embargo, en algunas se han observado dos proteínas ligeramente diferentes en su peso molecular codificadas por el mismo locus.

Respecto a su composición de aminoácidos, son ricas en lisina y glicina, característica que puede ser distintiva de estas proteínas. Asimismo, son pobres en aminoácidos cargados negativamente al igual que los demás grupos de hordeínas (Tabla 3) (Blake, *et al.*, 1984).

#### 4.1.1.2 *Hordeínas C*

Como lo muestra la Tabla 2, las prolaminas pobres en azufre de cebada se conocen como hordeínas C y se ha mapeado el locus que codifica a esta familia: *Hor1*, del cromosoma 1H. Se ha encontrado que hay de 4 a 18 péptidos en esta familia. Asimismo se identificó que el tamaño del locus corresponde a aproximadamente 105-190Kb dependiendo de la variedad (Tatham & Shewry, 2012).

A nivel de proteína, corresponden al 10-20% del total de hordeínas y su tamaño en SDS/PAGE varía de 55-70KDa (Shewry & Tatham, 1990).

Adicionalmente, la composición de aminoácidos de las hordeínas C se distingue por su alto contenido de 3 aminoácidos: glutamina (40-50mol%), prolina (20-30mol%) y fenilalanina (7-9mol%). No contienen residuos de cisteína y tienen un bajo contenido de aminoácidos cargados (Tatham & Shewry, 2012).

#### 4.1.1.3 *Hordeínas B*

Las hordeínas B, son un grupo de prolaminas ricas en azufre presente en cebada, además de las hordeínas gamma. Esta familia de proteínas es codificada por el locus *Hor2*. Son el grupo más abundante, correspondiendo del 75%-80% del total de hordeínas. En SDS/PAGE, tienen un tamaño de 36-44KDa aproximadamente y consisten de 250-300 residuos (Shewry & Tatham, 1990).

Tienen aproximadamente 8 residuos de cisteína que permiten la formación de puentes disulfuro intra o intercatenarios. A pesar de que se han reportado secuencias de esta familia de proteínas, no se conoce por completo la organización de este locus en una variedad. Se estima que existen aproximadamente 11 polipéptidos en este grupo (Anderson, 2013).



**Tabla 3.** Composición de aminoácidos de los grupos de hordeínas representado en porcentaje.

<b>Aminoácido</b>	<b>Hordeínas B<sup>1</sup></b>	<b>Hordeínas C<sup>1</sup></b>	<b>Hordeínas D<sup>2</sup></b>
<i>Ácido aspártico</i>	0.00	0.00	4.20*
<i>Ácido glutámico</i>	1.82	0.00	26.80*
<i>Alanina</i>	2.55	0.71	4.40
<i>Arginina</i>	2.55	0.80	3.00
<i>Fenilalanina</i>	4.74	8.79	2.30
<i>Glicina</i>	2.92	0.30	<b>26.90</b>
<i>Histidina</i>	1.46	1.09	2.40
<i>Isoleucina</i>	4.38	2.60	1.50
<i>Leucina</i>	8.03	3.60	4.30
<i>Lisina</i>	0.73	0.21	1.80
<i>Metionina</i>	1.09	0.21	1.40
<i>Prolina</i>	<b>19.34</b>	<b>30.60</b>	9.90
<i>Serina</i>	4.74	4.60	9.60
<i>Tirosina</i>	2.55	2.28	2.60
<i>Treonina</i>	2.19	1.00	5.20
<i>Valina</i>	6.20	1.00	2.40
<i>Asparagina</i>	0.73	1.00	*
<i>Glutamina</i>	30.29	41.22	*
<i>Cisteína</i>	<b>2.92</b>	0.00	N.D.
<i>Triptofano</i>	0.73	N.D.	N.D.

N.D.: No determinado. \*Ácido aspártico y ácido glutámico incluyen las formas ácidas y con grupo amino (glutamina y asparagina). Tomado de Shewry & Tatham, 1990 y Blake, *et al.*, 1984.

Además, están divididas en dos tipos relacionados: B1 y B3. Las hordeínas B1 difieren entre sí por sustituciones de aminoácidos y pequeñas inserciones o deleciones, mientras que las B3 difieren adicionalmente en la organización de un dominio repetitivo (Shewry & Tatham, 1990).

Finalmente, esta familia de hordeínas juega un papel importante en el desarrollo de la Enfermedad Celíaca (CD) ya que tienen epítopes que también están presentes en el gluten del trigo y que generan una respuesta autoinmune en el intestino de los seres humanos.

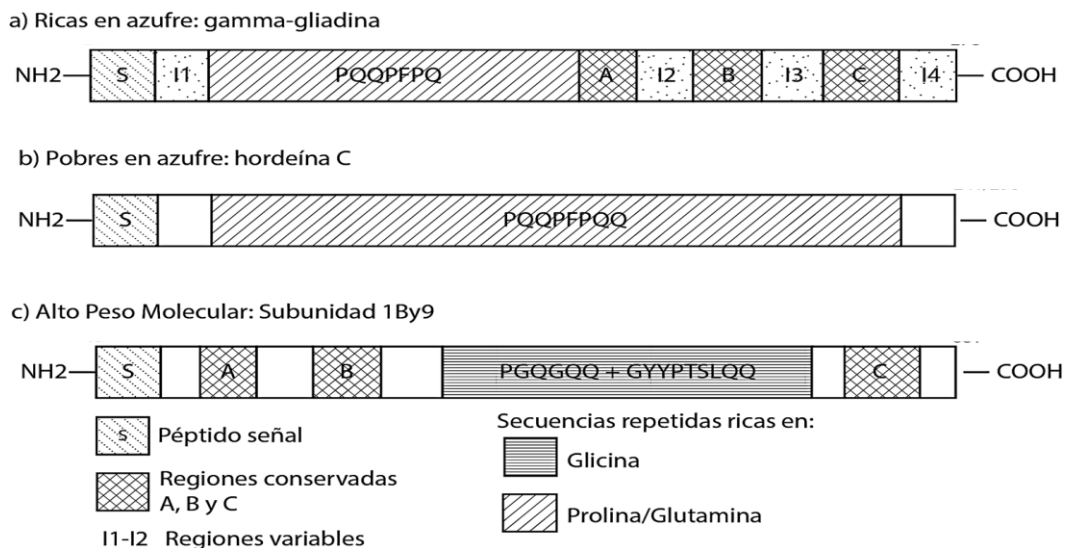
#### 4.1.1.4 *Hordeínas gamma*

Son una familia poco abundante en la semilla, al igual que las hordeínas D; presentándose en aproximadamente 5% del total de hordeínas.

Las hordeínas gamma tienen una estructura y composición similar a las B, ya que también son parte del grupo rico en azufre. Sin embargo, se caracterizan por estar presentes en forma de monómeros, es decir no forman puentes disulfuro intercatenarios, pero sí intracatenarios. En SDS/PAGE son enmascaradas frecuentemente por las hordeínas B, debido a que tienen un intervalo de tamaños similar (Shewry & Tatham, 1990).

#### 4.1.2 Estructura

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las prolaminas de la tribu *Triticeae* muestra que todas están estructuralmente relacionadas (figura 7) (Shewry & Tatham, 1990).



**Figura 7.** Estructuras esquemáticas de los grupos de proteínas pertenecientes a la superfamilia de las prolaminas en cereales. Tomado de Shewry & Tatham, 1990.

Para comenzar, los tres grupos de prolaminas consisten en al menos dos dominios, uno está basado en secuencias repetidas y el otro es no repetitivo.

Las prolaminas ricas en azufre tienen un dominio repetitivo que contiene motivos basados en el tetrapéptido Pro-Gln-Gln-Xaa. El dominio no-repetitivo está formado por tres regiones conservadas (A, B y C), las cuales varían en tamaño (20-35 residuos) y contienen una gran proporción de los residuos de cisteína. Estas regiones están separadas, a su vez, por unas más variables (I1-4).

Las prolaminas de alto peso molecular también contienen las regiones A, B y C, pero las primeras dos se encuentran en el dominio N-terminal. Asimismo, tienen una región con motivos repetidos ricos en glicina.

Finalmente, las prolaminas pobres en azufre contienen un dominio repetitivo basado en motivos similares a los de las ricas en azufre; sin embargo, no contienen las regiones A, B y C (Shewry, *et al.*, 1995; Shewry & Tatham, 1990).

### **4.1.3 Biogénesis**

Las proteínas de almacenamiento sirven de reserva de carbono, nitrógeno y azufre para la germinación y se encuentran en grandes cantidades en semillas. Debido a esto, las plantas han utilizado sistemas endomembranales para secuestrar a las proteínas de almacenamiento en una forma altamente compactada: el cuerpo proteico (CP). La mayoría de las plantas, incluidas las cereales, usan vacuolas de diferente origen como sitios de deposición, mientras que otras han aprovechado el lumen del retículo endoplásmico (RE) como una alternativa de almacenamiento (Kumamaru, *et al.*, 2007).

Las prolaminas toman su conformación plegada en el lumen del RE, el cual es también el sitio de formación de puentes disulfuro. Tres tipos de proteínas asisten este proceso: proteínas chaperonas de la familia HSP70/BiP, las peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas (PPI) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (Shewry, *et al.*, 1995).

Dos rutas de formación de CP operan en el endospermo: en uno el CP se forma a partir de una vacuola proveniente del aparato de Golgi y en la otra se forma desde el RE.

En la primera ruta, el empaquetamiento de prolaminas se lleva a cabo en pequeñas vesículas conectadas a la cisterna del aparato de Golgi. Asimismo, distribuidas en el citoplasma, se encuentran vacuolas que contienen cuerpos de inclusión con prolaminas, sugiriendo la coalescencia de gránulos pequeños para formar los correspondientes de mayor tamaño que posteriormente se fusionan y forman vacuolas de proteínas de almacenamiento (VPA) (Kumamaru, *et al.*, 2007).

Respecto a la segunda ruta, en varios estudios se han observado grandes inclusiones unidas al RER, la proteína BiP se ha identificado dentro de los CP y

debido a que esta proteína reside normalmente en el lumen del RE, se infiere que los CP son ensamblados inicialmente precisamente en este sitio.

La última propuesta, y la más aceptada, es que se acumulan y se ensamblan las proteínas en gránulos de inclusión dentro del RE, los cuales luego son liberados al citoplasma donde son introducidos en pequeñas vesículas. Estas vacuolas se fusionan entre sí y eventualmente forman grandes VPAs. Este proceso se comprueba por la identificación de la proteína BiP y remanentes de membrana del RE rugoso (RER) dentro de las VPA (Kumamaru, *et al.*, 2007).

A pesar de conocer esta información, los mecanismos que determinan si un grupo de prolamina es transportada a la vacuola o retenida en el RE no se conocen por completo. En cebada, trigo y centeno otros mecanismos deben existir para ensamblar las prolaminas en el RE en un estado adecuado para su transporte. En cebada se ha encontrado que las dos rutas participan en la formación de CP (Shewry, *et al.*, 1995).

Por otro lado, poco se conoce sobre la organización de las prolaminas dentro de los CP, aunque esta organización debe ser importante para asegurar un uso eficiente del espacio y facilitar su movilización durante la germinación (Shewry, *et al.*, 1995).

#### **4.1.4 Movilización durante la germinación**

El proceso de movilización consiste principalmente en la acción de enzimas proteolíticas, las cuales necesitan condiciones como pH y un ambiente con potencial redox adecuado para favorecer la solubilización de las proteínas de almacenamiento.

El grado de compactación que se observa en estas proteínas parece ser un atributo deseable para que grandes cantidades de aminoácidos sean almacenados en pequeños volúmenes y no sean digeridas con facilidad durante la maduración de la semilla. Asimismo, la compactación puede ser una forma de regular su degradación durante la germinación.

La movilización de las prolaminas está altamente regulada, al igual que otros procesos en plantas, por fitohormonas y por inhibidores de proteasas principalmente.

Por una parte, el estado redox es importante ya que los puentes disulfuro intermoleculares e intramoleculares son una característica común de varias prolaminas. Es evidente que la reducción de estos enlaces disminuye el grado de compactación. De hecho, el estado redox dentro de la VPA contribuye a la regulación de la degradación de estas proteínas.

Finalmente, el pH es también un factor relevante en la regulación de la actividad proteolítica de algunas proteínas. Después de la etapa de remojo, la capa de aleurona regula el pH del endospermo hasta pH cercano a 4.2 mediante la secreción de ácido málico. Esta acidificación produce un ambiente favorable para la actividad proteolítica y también aumenta la solubilidad de las proteínas de almacenamiento (Tan & Wilson, 2012).

## **5 Hordeínas como marcadores moleculares relacionados con calidad de la malta y la cerveza**

Como se mencionó en la sección 3.3, existe la necesidad de encontrar marcadores moleculares relacionados con el desempeño de la semilla durante el malteo o con la calidad de la malta que se obtiene.

Gran parte de la investigación actual relacionada con cebada se enfoca en la relación que existe entre las hordeínas y la calidad o el desempeño de la malta durante su procesamiento. Además se han propuesto como marcadores moleculares que permitan diferenciar entre diferentes variedades de cebada (Baxter, 1981).

Por otro lado, el impacto negativo de un alto contenido de proteína en la calidad de la malta y la cerveza está bien establecido; por lo tanto, no es de sorprenderse que efectos similares se hayan demostrado para el contenido de hordeínas, ya que estas representan la mitad del contenido proteico de la semilla.

Sin embargo, también se ha encontrado una relación favorable entre hordeínas y estabilidad de la espuma (Baxter, 1981).

En general, altos niveles de hordeínas están asociadas con una malta de mala calidad, aunque la relación es dependiente de la variedad. En algunos estudios se ha visto que las hordeínas D son las que tienen una relación negativa con la calidad de la malta, independientemente de la variedad que se trate. Esta relación negativa de las hordeínas D se observa también con lotes de diferentes estaciones del año, condiciones de crecimiento y variedades; indicando una relación causal entre las hordeínas y la calidad de la malta. Asimismo, se ha propuesto la cuantificación de las hordeínas, como alternativa a la de proteína total para la predicción de la calidad de la malta sobre una gran variedad de condiciones ambientales (Howard, *et al.*, 1996). Sin embargo, esta relación no se ha fortalecido en estudios con otras variedades.

Respecto a las hordeínas C, se ha encontrado que éstas son más resistentes a la digestión durante la germinación y el malteo que las otras hordeínas y, por lo tanto, tienen un papel importante en la estabilidad de la espuma en la cerveza (Tatham & Shewry, 2012).

En general, las semillas de variedades con mejores características malteras, contienen menos bandas de hordeínas B de peso molecular intermedio que aquellas variedades que generan malta de menor calidad. Esto sugiere que la tendencia de los péptidos de hordeínas a formar puentes disulfuro puede ser, ciertamente, un factor importante en el malteo y producción de cerveza.

Los patrones electroforéticos de hordeína de malta generalmente contienen menos bandas que la semilla de inicio. En algunas variedades, especialmente aquellas destinadas a alimento y no a malteado, el patrón de bandas de la malta es casi indistinguible del patrón de la semilla original. Pero en maltas modificadas, las hordeínas B se ven reducidas en intensidad, y varias bandas están ausentes por completo. En malta, los polipéptidos que son primeros en degradarse son los de las bandas B.

La filtrabilidad también ha sido relacionada con el grado de rompimiento de los puentes disulfuro de las hordeínas B. El mecanismo que se propone para este

fenómeno es que hay una gran asociación entre el almidón y las hordeínas, de esta forma, es probable que la formación de puentes disulfuro provoque la agregación de gránulos de almidón no modificados, material de la pared celular y proteínas, provocando una baja velocidad de separación del mosto.

Además, la degradación excesiva de polipéptidos y la eliminación completa de los puentes disulfuro puede llevar a problemas con la estabilidad de la espuma en la cerveza (Baxter, 1981).

Por otra parte, también se ha investigado la influencia de algunas condiciones ambientales y nutricionales en la acumulación de algunas hordeínas.

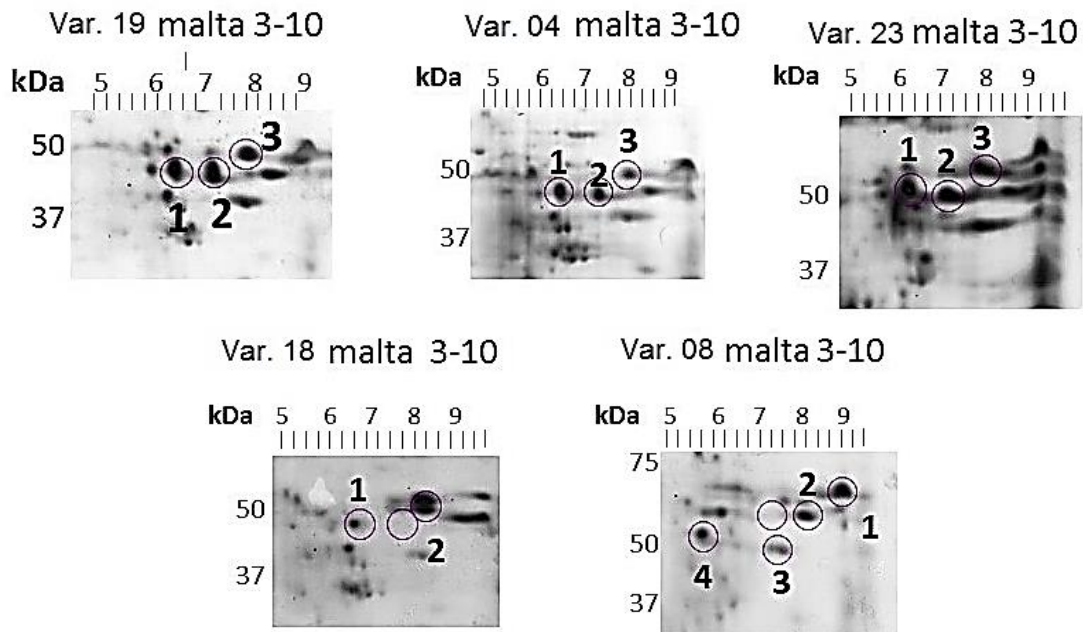
Se conoce que el control en los niveles prolaminas en trigo y cebada es a nivel de transcripción (Giese & Hopp, 1984; Shewry, *et al.*, 2001), y está sujeta a control nutricional, dependiendo principalmente de la disponibilidad de N. Se ha observado que en cebada, una alteración en los niveles de N produce cambios en los niveles de hordeínas C, decayendo en un 70% (Giese & Hopp, 1984; Qi, *et al.*, 2006). La deficiencia de azufre ha sido también demostrada que afecta la composición de proteínas en los granos de cebada, con una reducción de los hordeínas B ricas en azufre y el incremento de los hordeínas C pobres en azufre (Shewry, *et al.*, 1983).

De igual manera, se ha documentado que el contenido de los diferentes grupos de hordeínas se ve modificado con la fecha de siembra y lugar geográfico.

Además, respecto a su influencia o relación entre cada grupo de hordeínas y la calidad de la malta, se ha encontrado una correlación negativa entre el extracto de malta y el contenido de hordeínas B, ya que éstas son las más abundantes en semilla. Asimismo se ha reportado que hay diferencias significativas en la actividad  $\beta$ -amilasa en cebada de diferentes variedades y que esto es debido principalmente a condiciones ambientales y no así al genotipo o variedad (Qi, *et al.*, 2005; Molina-Cano, *et al.*, 2002).

Además se ha mostrado que las proporciones relativas de hordeínas B con hordeínas C presentes en la semilla también son influenciadas por el ambiente. Por ejemplo, en cebada, un aumento en la disponibilidad de nitrógeno causa un aumento desproporcionado de síntesis de hordeínas C (Rahman, *et al.*, 1983).

Cabe mencionar que todos estos estudios han sido realizados en variedades extranjeras. Hasta la fecha se han realizado muy pocos estudios bioquímicos para conocer la composición proteica de semillas y malta de las variedades mexicanas.



Variedades					
Mancha	19	04	18	23	08
1	Hordeína B Hordeína B3 Prot. de almacenaje	Hordeína B Hordeína B1 Prot. de almacenaje Gliceraldehído-3P deshidrogenasa	Hordeína B Hordeína B3 Prot. de almacenaje	Hordeína B Hordeína B3 Hordeína B1 Prot. de almacenaje	Hordeína B3
2	Hordeína B, Hordeína B1 Hordeína B3 Prot. de almacenaje	Hordeína B Hordeína B3 Hordeína B1 Prot. de almacenaje	Actina Hordeína B3 Hordeína B1 Prot. de almacenaje ATP sintasa	Hordeína B Hordeína B3 Prot. de almacenaje	Hordeína B3
3	Hordeína B Hordeína B3 Hordeína B1 Prot. de almacenaje Proteína relacionada a patógenos	$\beta$ -glucosidasa Hordeína B3 Hordeína Y1 B-amilasa 1 Prot. de almacenaje		Hordeína Y1 Hordeína B	Actina Hordeína B3
4					Hordeína B1 Hordeína B3

**Figura 8.** Geles 2D y los resultados de la identificación por Espectrometría de Masas (EM) de muestras de malta de diferentes variedades mexicanas.



Como antecedente inmediato a este trabajo, en el laboratorio se identificaron proteínas obtenidas de geles en dos dimensiones de muestras de proteína total de malta de las cinco variedades de cebada mexicanas. Estos geles muestran, interesantemente, que una gran parte de las proteínas abundantes en malta son, precisamente, hordeínas (Figura 8) (Herrera, No publicado).

En este estudio, se analizaron cuatro variedades mexicanas (19, 04, 23 y 18) además de 08 y se encontró que son las hordeínas B las identificadas de forma mayoritaria en las variedades.

Estos resultados dan pauta a investigar de forma más específica la composición de hordeínas y su posible utilización como marcadores moleculares en variedades mexicanas.

## Hipótesis

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, la hipótesis de este trabajo es:

“Si las hordeínas son una familia de proteínas altamente polimórficas, entonces los patrones electroforéticos de hordeínas de las variedades mexicanas y una canadiense son distintos entre sí”

## Objetivo General

Este trabajo tiene como objetivo principal determinar si las hordeínas son candidatas a ser utilizadas como marcadores moleculares en variedades mexicanas de cebada.

## Objetivos Particulares

1. Analizar y comparar los patrones de hordeínas de semilla seca y malta de diferentes variedades mexicanas de cebada mediante SDS-PAGE a partir de extractos enriquecidos en hordeínas.
2. Seleccionar las bandas de proteínas diferenciales que tengan potencial de ser utilizadas como marcadores moleculares para distinguir entre variedades.
3. Identificar por Espectrometría de Masas (EM) algunas de las proteínas presentes en bandas seleccionadas.

## CAPÍTULO II

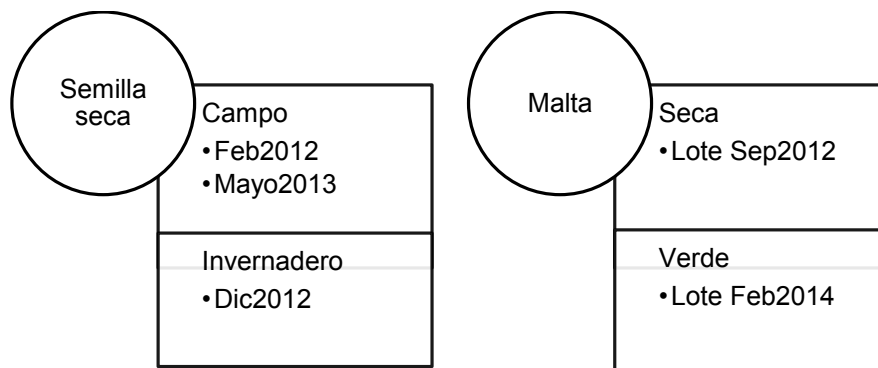
### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1 Material vegetal

Se utilizaron tres lotes de semilla seca: Feb2012, Dic2012 y Mayo2013. De estos, los de Feb2012 y Mayo2012 fueron obtenidos de plantas cultivadas en campo. El lote Dic2012 se obtuvo a partir del cultivo de las semillas Feb2012 en condiciones de invernadero (Conjunto E, Facultad de Química). Cada uno de los lotes está compuesto por las 5 variedades mexicanas: 04, 19, 18, 23 y 11.

Las muestras de malta provienen de un único lote (Sep2012), el cual incluye a las variedades: 04, 19, 23, 18 y 08.

Finalmente, se utilizó un lote con las variedades 04 y 19 que consistía en muestras que han pasado por el proceso de remojo y germinación únicamente; es decir, una fase intermedia del malteo.



**Figura 9.** Esquema de los lotes de semilla y malta utilizados.

## **2 Extracción de hordeínas**

Las hordeínas fueron extraídas con una modificación del protocolo disponible para maíz (Larkins Lab, 2003).

- 1) Las muestras de semillas y malta fueron molidas con nitrógeno líquido en un mortero. Se pesaron aproximadamente 50mg de la harina en una balanza analítica y se colocaron en un tubo Eppendorf de 2.0 mL.
- 2) Posteriormente, se agregó a cada muestra 1.6 mL de buffer de extracción (12.5 mM Borato de Sodio, 1% SDS y 2%  $\beta$ -mercaptoetanol a pH 10) y se incubaron con agitación constante a temperatura ambiente (TA) durante 5 h.
- 3) Se centrifugaron las muestras a 11 Krpm durante 15 min.
- 4) Se tomó el sobrenadante y se agregó etanol de la siguiente forma: por cada 500  $\mu$ L de sobrenadante, se adicionaron 1.2 mL de etanol absoluto para alcanzar una concentración final de etanol equivalente al 70%.
- 5) Las muestras se incubaron con agitación durante 1 h a TA y se centrifugaron a 11 krpm por 15 min.
- 6) Finalmente el sobrenadante que contiene las hordeínas se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

## **6 Preparación de la muestra para electroforesis**

- 1) Se tomó una alícuota de 300  $\mu$ L de la fracción con hordeínas y se secó mediante evaporación utilizando un concentrador al vacío (Centrivap Concentrator de Labconco Corporation®, Kansas USA).
- 2) Posteriormente se resuspendió el botón en 50  $\mu$ L de buffer de carga 1X.

## **7 Análisis de patrones de hordeínas**

- 1) Se realizaron por triplicado los geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12.5% para obtener los patrones de hordeínas correspondientes a cada lote (Yin, *et al.*, 2003).

- 2) Los geles se tiñeron con Coomassie Coloidal G-250 al 0.02% (Agrawal & Thelen, 2009).
- 3) Se seleccionaron algunas bandas de los patrones de malta y semilla y se identificaron por espectrometría de masas.

## **8 Identificación por espectrometría de masas**

El tratamiento de muestra previo a la identificación fue realizado acorde al protocolo desarrollado en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química en la UNAM.

- 1) Las bandas de gel fueron cortadas en fragmentos pequeños y se destiñeron con 50% de metanol (v/v), 5% de ácido acético (v/v) por 12 h.
- 2) Se lavaron con agua destilada y se incubaron por 15 min dos veces en 100 mM de bicarbonato de amonio. Se redujeron en 50 mM DTT durante 45 min y se alquilaron con iodoacetamida 30 mM durante 2 h.
- 3) Se lavaron 3 veces con 100 mM de bicarbonato de amonio. Se deshidrataron completamente con 100% de acetonitrilo y se llevaron a sequedad total.
- 4) La digestión en gel fue llevada a cabo con 30  $\mu$ l de tripsina de porcino modificada (Sigma-Aldrich Química S. de R.L. de C.V., Toluca, México) de una solución que contenía 20 ng/ $\mu$ l y se incubaron por 18 h a 37°C. En los protocolos modificados, se utilizó la mezcla Trypsin-LysC de Promega (Promega Corporation, USA) siguiendo el mismo procedimiento, mientras que la digestión secuencial con quimotripsina y tripsina se realizó acorde a Colgrave, *et al.* (2012).
- 5) Los péptidos se extrajeron con 50% acetonitrilo (v/v) y 5% de ácido fórmico (v/v) en sonicación y se llevaron a sequedad total.
- 6) Posteriormente, se resuspendieron en 20  $\mu$ l de ácido fórmico al 1% (v/v), se desalaron en columnas Ziptip C18 y se eluyeron en 12  $\mu$ l de fase móvil (97% agua 3% acetonitrilo 0.1% de ácido fórmico).
- 7) El análisis de péptidos por espectrometría de masas se llevó a cabo utilizando un sistema nano-LC-ESI-MS/MS integrado SYNAPT G2 de alta

definición (Waters Corporation, UK) equipado con una fuente de iones NanoLockSpray y acoplado en línea a un cromatógrafo líquido nanoACQUITY Ultra Performance (UPLC; Waters Corporation).

- 8) El sistema de disolventes binario fue acetonitrilo 2% en agua MilliQ con ácido fórmico al 0,1% (fase móvil A) y 98% de acetonitrilo en agua MilliQ con ácido fórmico al 0,1% (fase móvil B). La muestra se inyectó en una columna de trampa C18 UPLC de 5  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}\times$ , 20 mm (Waters Corporation) y se lavó con 100% de fase móvil A a una velocidad de flujo de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Los péptidos se separaron en una columna BEH, C18 UPLC de 1,7  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}\times$ , 100 mm (Waters Corporation) utilizando un gradiente lineal hasta 40% de fase móvil B a una velocidad de flujo de 0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$ .
- 9) Se realizaron búsquedas en la base de datos UNIPROT utilizando tripsina como proteasa específica, o en el caso de la digestión secuencial, quimotripsina y tripsina. Los péptidos coincidentes con las puntuaciones de PLGS > 95% de confianza fueron aceptados como correctos. El umbral de puntuación en las condiciones anteriores fue de 52 para  $p < 0.05$ .

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación se muestran en las figuras 10-12 los patrones electroforéticos de hordeínas obtenidos a partir de semilla seca. Después, en la figura 13 se muestra el patrón de hordeínas para el lote de malta seca. Y finalmente, la figura 14 presenta el patrón correspondiente a la malta sin haber sido sometida al proceso de secado.

Las muestras utilizadas para los patrones fueron obtenidas con un método que permite obtener extractos ricos en hordeínas y se basa en las propiedades químicas de éstas: son insolubles en agua, pero altamente solubles en etanol al 70%. De hecho, las prolaminas fueron descubiertas gracias a esta característica (Shewry & Tatham, 1990).

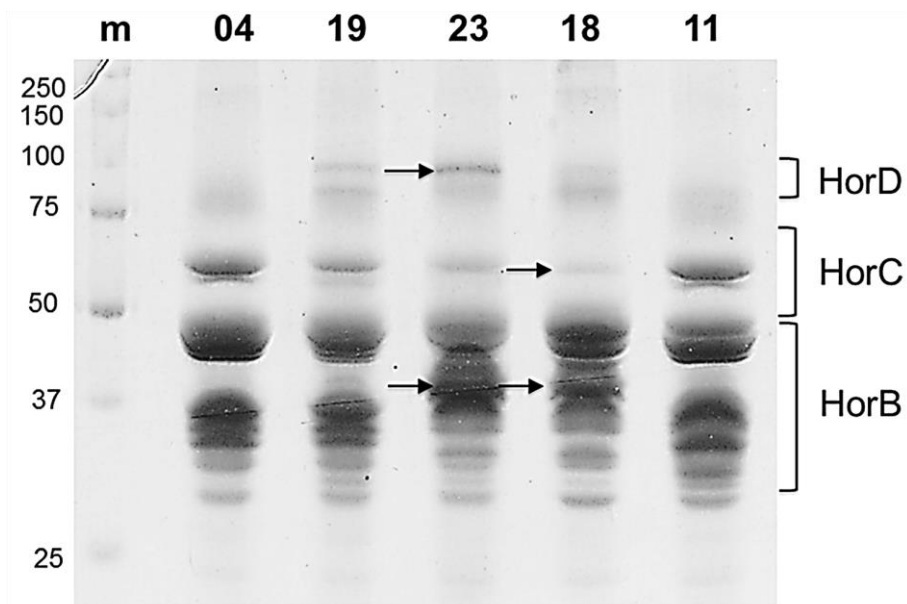
El método de extracción utilizado se basa en un primer paso de lisis y liberación de proteínas utilizando SDS a pH 10, seguido de la precipitación de proteínas (no-prolaminas) con etanol al 70%. Al finalizar esta extracción, se obtiene una mezcla etanol-agua en la que están resuspendidas las hordeínas.

#### **1 Patrones de hordeínas de semilla seca**

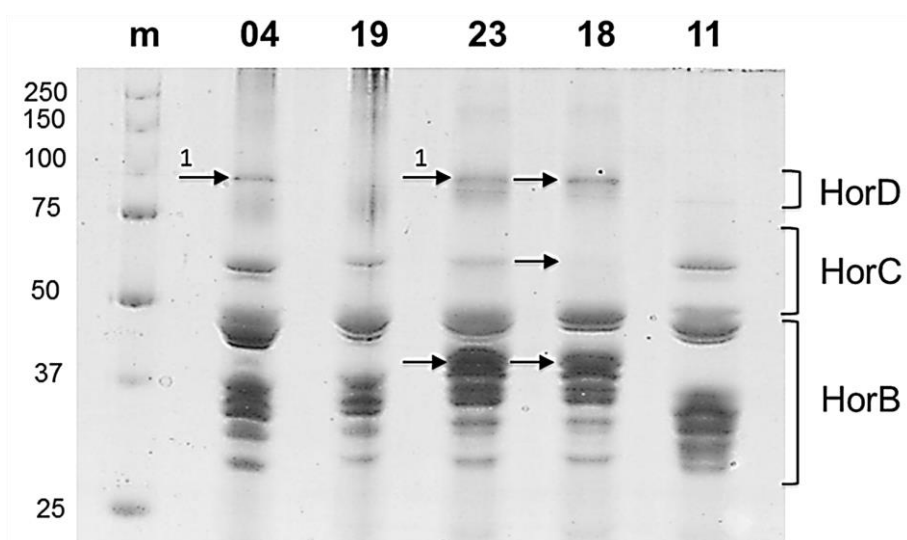
Las hordeínas se obtuvieron de semillas correspondientes a plantas crecidas en condiciones de campo y colectadas en la misma época del año. Como se describe en Métodos, para el análisis por triplicado en geles se utilizó la misma cantidad de extracto etanólico de hordeínas.

Las hordeínas se separaron en grupos de distinto peso molecular que son similares a los reportados en la literatura (Shewry & Tatham, 1990).

## 1.1 Condiciones de campo



**Figura 10. Patrón de hordeínas en semilla seca (lote Feb2012) de cinco variedades mexicanas de cebada maltera (04, 19, 23, 18, 11).** Las flechas indican las diferencias más notables. m: Marcador de peso molecular.



**Figura 11. Patrón de hordeínas en semilla seca (lote Mayo2013) de cinco variedades mexicanas de cebada maltera (04, 19, 23, 18, 11).** Las flechas indican las diferencias más notables. Las bandas identificadas por EM se señalan con una clave numérica asignada. m: Marcador de peso molecular. La clave de las bandas se compone por el origen de la muestra: S (semilla seca), la variedad y el número sobre la flecha asignada a la banda.

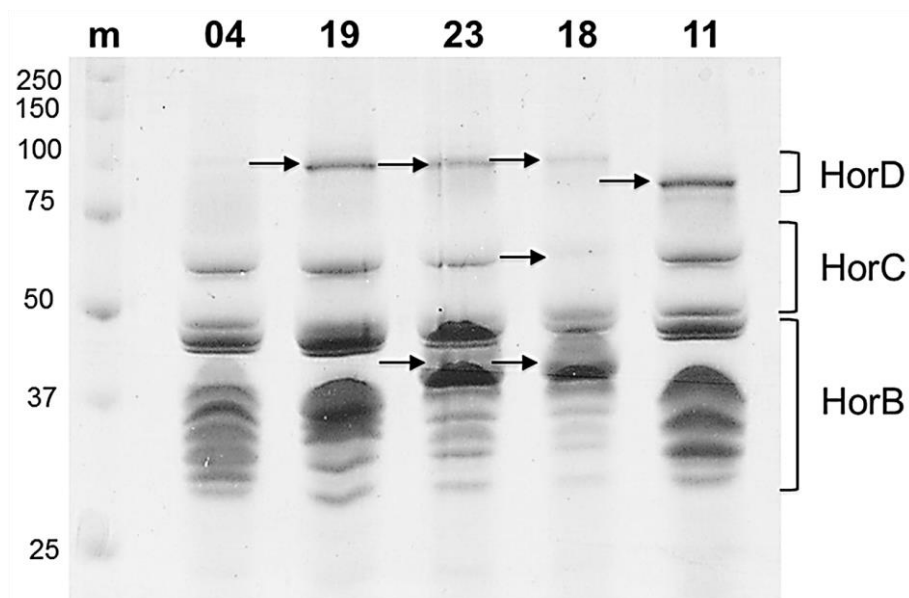
En las figuras 10 y 11 se muestran los patrones característicos de semilla seca para las cinco variedades mexicanas de cebada maltera. Con flechas se señalan las diferencias más notables.



En la figura 10 se observa, en el intervalo de tamaño de las hordeínas D, que la variedad 23 tiene una banda de aproximadamente 100kDa abundante, que está ausente o indefinida en las variedades 04, 18 y 11; mientras que en 19 se ven dos bandas: una de 85kDa y otra de 100kDa. Por otra parte, en el intervalo correspondiente a las hordeínas C, se detecta una banda de 65 kDa con intensidad diferente entre variedades: en 04 y 11 muestra la mayor intensidad, seguida de 19 y 23, mientras que para la variedad 18 la banda aparece muy tenue o ausente. Las hordeínas del grupo B fueron las más abundantes en todas las variedades y en el intervalo de tamaño de 37-45 kDa se observaron bandas características solo para las variedades 23 y 18.

En la figura 11 se observa por variedad un patrón similar de las hordeínas B y C que en el lote Feb2012. La presencia de hordeínas D, de mayor peso molecular (100 kDa) fue notoria para las variedades 04, 23 y 18 pero no se observó de manera clara en las variedades 19 y 11.

## 1.2 Condiciones de invernadero



**Figura 12. Patrón de hordeínas en semilla seca (lote Dic2012) de cinco variedades mexicanas de cebada maltera (04, 19, 23, 18, 11).** Las flechas indican las diferencias más notables. m: Marcador de peso molecular.

En condiciones de invernadero (figura 12) las variedades 19, 23 y 18 presentan una banda de 100kDa de diferente intensidad. En la variedad 11 se observa una de aproximadamente 85kDa. Los patrones de las hordeínas B y C son similares a los de campo.

Al comparar este lote con Feb2012 de campo, del cual se tomaron las semillas sembradas en invernadero, la diferencia más evidente fue la presencia de las bandas a 100kDa en la variedad 19 y de 85kDa en la 11 (hordeínas D) en variedades crecidas en invernadero y su ausencia en las crecidas en campo.

La comparación de los patrones de hordeínas de variedades crecidas en invernadero con los de campo indicó que las mayores diferencias se presentan con el lote de Mayo2013, donde las bandas de las hordeínas D en las variedades 04, 19 y 11 se observan de forma opuesta en invernadero y en campo. Siendo la banda de 85kDa, la única que es reproducible con el lote Feb2012.

El hecho que los patrones de semilla seca fueran distintos entre las variedades analizadas, apoya su utilidad como marcadores moleculares para el mejoramiento genético de las mismas. Por ejemplo, las hordeínas cuya migración en el gel corresponde al grupo D permite distinguir entre las variedades 04 y 19, mientras que las hordeínas del grupo C serían las más útiles para distinguir entre las variedades 23 y 18. Si aunado a estos datos se cuenta con conocimiento sobre algunas características fenotípicas deseables en cada una de las variedades es posible seguir estos patrones en cruza genéticas y análisis fenotípicos de la descendencia para asociar la presencia o ausencia de bandeos en estos grupos de hordeínas con las características que se desean seleccionar. En relación a esto, se ha reportado correlación entre bandas particulares de hordeínas en variedades de cebada brasileñas y la calidad de la malta obtenida de estas variedades (Echart-Almeida & Cavalli-Molina, 2001).

Además, se ha sugerido que las hordeínas D son de especial importancia, ya que la abundancia de éstas es inversamente proporcional a la calidad de la malta (Howard, *et al.*, 1996). Aunque hay otros estudios que indican que esta relación no es tan clara para todas las variedades (Brennan, *et al.*, 1998). Asimismo Benetrix *et*

*al.* (1994) y Skerrit y Jones (1993) han sugerido que la cantidad de hordeínas C afecta negativamente la calidad de la malta mientras que también se piensa que hay alelos específicos de hordeína C asociados con una mejor calidad (Yamaguchi, *et al.*, 1998). De igual forma, en un estudio reciente sobre proteínas asociadas con la calidad de malta, la hordeína Gamma 3 fue identificada con mayores niveles en micromalteo para una línea de cebada con mejores características en malta (March, *et al.*, 2012).

Una posible explicación a las diferencias observadas en los diferentes lotes, es que sean debidas al entorno ambiental en las que las plantas de cebada crecieron, que incluyen disponibilidad de nutrientes, temperatura, hidratación, ataque por patógenos y otros. Es conocido que los patrones de hordeínas se ven modificados por la disponibilidad de algunos nutrientes en el suelo, como es la fuente de nitrógeno y azufre. En este sentido, Rahman *et al.* (1983) demuestran que la falta de azufre en cebada produce una disminución en la acumulación de las hordeínas B (ricas en azúfre) con poco o ningún efecto en las hordeínas C (pobres en azúfre). Además, Qi *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la acumulación de los diferentes grupos de hordeínas y encontraron que los grupos B, C y D aumentan su acumulación con altas concentraciones de nitrógeno, siendo las C y D las que se modifican en mayor medida. Finalmente, también se conoce que la temporada de siembra influye en el contenido de proteína total y de hordeínas (Qi, *et al.*, 2005).

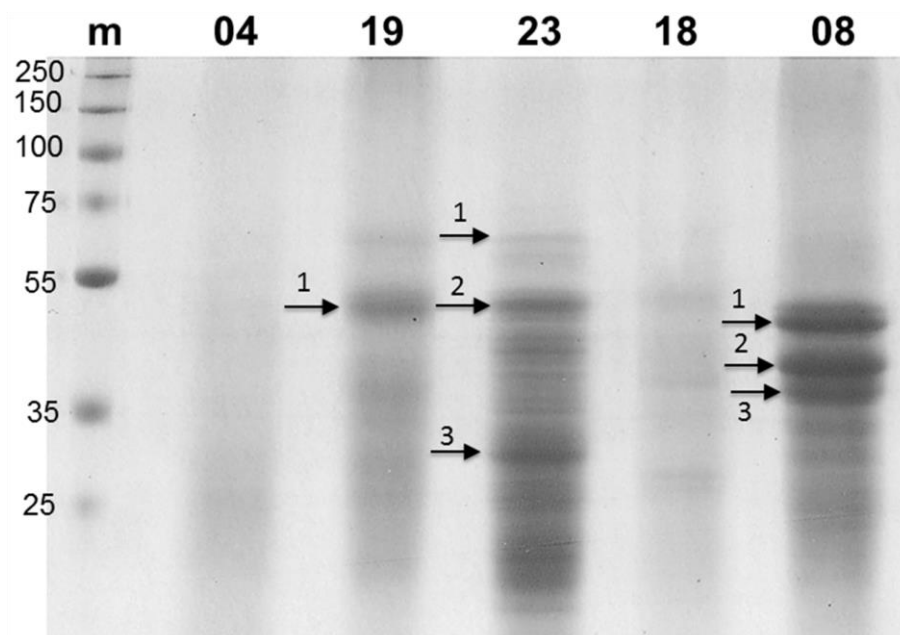
Lamentablemente, no se dispone de la información referente a los tratamientos y prácticas llevadas a cabo por los agricultores, por lo que es difícil asociar los patrones de hordeínas de cada variedad con el ambiente en los lotes de campo. Lo único que se podría asociar al lote de Mayo2013 es que fue cultivado en primavera-verano, mientras que el lote de Febrero2012 procede de un cultivo en otoño-invierno, al igual que el lote de invernadero.

A pesar de esto, se lograron identificar bandas que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares. Siendo las bandas de 100 y 85 kDa útiles principalmente en la identificación de variedades 19 y 11 que provienen de invernadero respectivamente. Y las bandas de 65 kDa y de 37-45 kDa para lotes de

campo. En este sentido, estas últimas bandas (Hordeínas B y C) son importantes ya que son las únicas que no se ven modificadas por factores externos.

## 2 Patrones de hordeínas de malta

Como se mostró anteriormente, en los patrones de semilla seca existen grupos de hordeínas cuya presencia cambia entre variedades. En este caso, el análisis de malta siguió el mismo protocolo que semilla seca y se encontró que, si bien la cantidad de proteína en el extracto etanólico de semilla seca fue similar entre variedades, en el caso de la malta hubo contrastes notables: los patrones son más variables entre sí y diferentes a los observados en semilla seca (Figura 13).



**Figura 13. Patrón de hordeínas en malta de cuatro variedades mexicanas de cebada maltera (04, 19, 23, 18) y una variedad canadiense (08).** Las flechas indican las diferencias más notables y las bandas identificadas por EM se señalan con una clave numérica asignada. La clave de las bandas se compone por el origen de la muestra: M (malta), la variedad y el número sobre la flecha asignada a la banda. m: Marcador de peso molecular.

En el análisis de patrones de hordeínas en malta, se observa un cambio importante respecto a los patrones en semilla seca, ya que ha ocurrido el proceso de germinación donde se produce la proteólisis de muchas proteínas almacenadas en la semilla. Además, la semilla germinada ha sido posteriormente secada en

condiciones controladas (Briggs, *et al.*, 2004). En los patrones se advierte que cada variedad degrada diferencialmente a las hordeínas. Por ejemplo, la malta de la variedad 04 prácticamente no tiene prolaminas íntegras, similar a 18, que presenta sólo algunas bandas muy tenues de 50, 40 y 30 kDa. En cambio, la variedad 19 muestra dos bandas mayoritarias de aproximadamente 60 y 50 kDa. De las variedades mexicanas, la 23 es la que presenta un mayor número de bandas, implicando que probablemente para esta variedad se mantiene una mayor cantidad de hordeínas después del malteo.

Es interesante señalar que el patrón de hordeínas en malta de la variedad canadiense Metcalfe (carril 08) presenta tres bandas intensas en un tamaño de 37-50 kDa que no se observan en los patrones de la malta de cebada mexicana.

En ninguna de las maltas se detectaron hordeínas en el peso molecular del grupo D, y la banda de mayor tamaño fue de aproximadamente 60 kDa. Sin embargo, en la malta es imposible predecir mediante los patrones de gel el grupo de hordeínas al que pertenece cada banda, ya que ha tenido lugar degradación, al menos parcial, de las proteínas de reserva y además estas proteínas tienden a formar asociaciones en cúmulos que aún en condiciones de electroforesis desnaturizante son difíciles de deshacer.

El comportamiento de las hordeínas en malta correspondiente a la variedad 23 muestra coincidencia con los datos reportados sobre esta variedad (Solano, *et al.*, 2009), que indican alto rendimiento y una semilla rica en proteínas, lo cual podría ocasionar problemas para malteo. La poca degradación de hordeínas en la malta podría ser una de las causas de este tipo de problemas.

Estudios sobre la composición de hordeínas en malta y cerveza indican que varias de estas mantienen su presencia a lo largo de todo el proceso aunque el contenido global disminuye considerablemente (Colgrave, *et al.*, 2012; Benkovska & Bobálová, 2012). Por ejemplo, se ha reportado que las hordeínas de tipo D y C son las que sufren mayor degradación (Benkovska & Bobálová, 2012); por el contrario, las Gamma 3 y B resisten el proceso y, en conjunto con otras proteínas no-prolaminas, tienen un papel importante en la generación de la turbidez en la cerveza (Jin, *et al.* 2012). Es por esto que las proteínas presentes en la malta

(principalmente las hordeínas) tienen una influencia importante en las características de la cerveza, siendo necesaria una cantidad adecuada para estabilizar la espuma pero sin un exceso que podría generar turbidez o hacer más costoso el proceso.

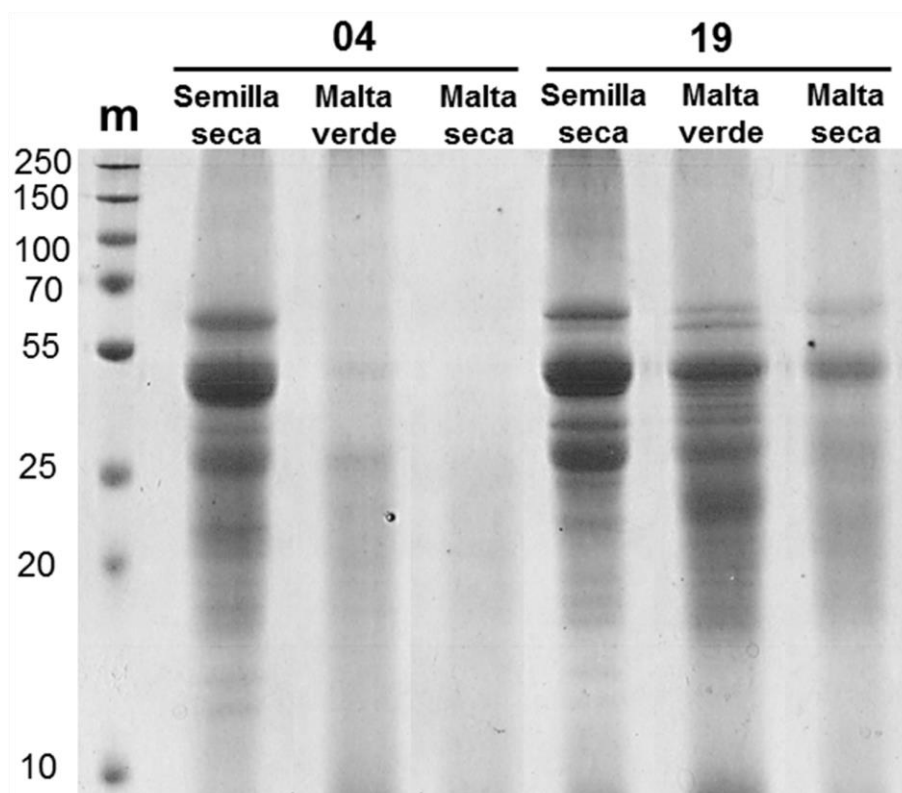
En la malta es imposible predecir mediante los patrones de gel el grupo de hordeínas al que pertenece cada banda. Además, estas proteínas tienden a formar asociaciones en cúmulos, lo cual se favorece en el proceso de malteo por las condiciones de temperatura. Sin embargo, los patrones que se obtuvieron en este estudio permiten distinguir a la variedad 04 como la que presenta mayores niveles de degradación de hordeínas lo que coincide con un comportamiento más favorable de esta malta para el proceso de producción de cerveza (Qi, *et al.*, 2006).

El patrón de hordeínas en malta de Metcalfe es muy distinto al de las variedades mexicanas y sorpresivamente no se distingue por presentar la mayor degradación de estas proteínas. Considerando que Metcalfe produce una malta que se adapta muy bien a los procesos cerveceros, es posible que las proteínas contenidas en las bandas observadas sean indicativas de cúmulos de hordeínas que no afectan el proceso. Además, hay que considerar que la degradación de las hordeínas es regulada por muchos factores: el tipo de proteasas o inhibidores de proteasas y su actividad o síntesis de estos en la semilla durante la germinación (Berne, 2005; Osman, *et al.*, 2002).

Dado que la presencia de hordeínas intactas o poco degradadas normalmente se ha correlacionado con problemas en la producción de cerveza, es importante conocer la identidad de las bandas con mayor intensidad en los patrones correspondientes a malta. Es por ello que algunas fueron seleccionadas para identificar las hordeínas o fragmentos de estas que resisten la degradación durante el malteo y su posible influencia sobre las características de procesamiento de la cerveza.

Por otro lado, con estos resultados se decidió evaluar lotes de malta verde, es decir, sin haber pasado por el proceso de secado. Esto nos permitiría identificar bandas de proteínas susceptibles y resistentes a la temperatura.

En la figura 14 se comparan semilla seca, malta verde y malta de las variedades 04 y 19. En la variedad 04 las hordeínas son, en su mayoría, degradadas durante la germinación; en contraste, en la variedad 19 se observa que una gran proporción de hordeínas es degradada en la germinación y también en el proceso de secado.



**Figura 14. Comparación del patrón de hordeínas de semilla seca, malta verde y malta seca de dos variedades mexicanas de cebada maltera (04 y 19). m: Marcador de peso molecular.**

Esta es información valiosa, ya que si se identifican las bandas que resisten las condiciones de malteo, se puede saber cuáles son los grupos de hordeínas que pasan al mosto y que tienen una posible influencia sobre las características de procesamiento de la cerveza. Es importante resaltar que a pesar de que todos los lotes utilizados son distintos, se logra observar una tendencia que se conserva en las variedades analizadas. Esta tendencia es para el caso de la variedad 04, un grado de degradación similar de todos los grupos de hordeínas, obteniendo al final una malta con poca hordeína íntegra. Para la variedad 19 es la degradación

preferencial de las hordeínas C, las B de menor peso molecular y la conservación en mayor proporción de la banda de hordeínas B de aproximadamente 50kDa.

### **3 Identificación por espectrometría de masas**

Al comprobar la reproducibilidad de los patrones de hordeínas en los lotes analizados, se procedió con la identificación de algunas bandas seleccionadas para semilla y malta seca (Figuras 11 y 13). Los criterios de selección de las bandas fueron los siguientes:

1. Se seleccionó un mayor número de bandas en malta correspondientes a las variedades 23 y 08, debido a sus patrones contrastantes.
2. En el caso de semilla seca se identificó la banda de aproximadamente 100 kDa en dos variedades para determinar si había diferencias cualitativas en su composición (23 y 04).
3. Asimismo, para la malta de la variedad 19 se eligió la banda de aproximadamente 45 kDa porque su abundancia parecía ser la única resistente a la degradación en la malta de esta variedad.

Además, las bandas se nombraron con una clave que contiene una letra (M o S, malta o semilla), la variedad y un número para distinguir bandas de una misma variedad que se muestra en cada uno de los patrones (Figuras 11 y 13). Por ejemplo: la muestra M08-2 se refiere a la banda número 2 de la variedad 08 de malta.

Se ha reportado en diversos estudios que las prolaminas pueden presentar problemas de identificación por la dificultad de ser digeridas por la tripsina, comúnmente utilizada en estudios de proteómica. Con el fin de evaluar con qué enzimas se mejoraba la identificación de las hordeínas por EM, se siguieron dos protocolos distintos además del estándar con tripsina (Tabla 4). Uno de estos fue realizado acorde a Colgrave, *et al.* (2012) quienes reportaron un protocolo de digestión secuencial utilizando tripsina y quimotripsina, que permitió la identificación por EM de proteínas distintas a las encontradas usando únicamente tripsina. Cabe mencionar que algunas de las muestras correspondientes a las bandas



seleccionadas fueron tratadas por los tres protocolos (M23-2 y M08-1), mientras que otras se trataron con uno o dos de estos procedimientos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Enzimas utilizadas en la preparación de la muestra para Espectrometría de Masas.

<b>Banda</b>	<b>Tripsina<sup>1</sup></b>	<b>Trypsin LysC<sup>2</sup></b>	<b>Quimotripsina<sup>3</sup> + Tripsina</b>
<b>M19-1</b>	x		
<b>M23-1</b>	x		
<b>M23-2</b>	x	x	x
<b>M23-3</b>	x		
<b>M08-1</b>	x	x	x
<b>M08-2</b>	x		
<b>M08-3</b>	x		
<b>S04-1</b>		x	x
<b>S23-1</b>		x	x

1) Genera péptidos con arginina o lisina en C-terminal. 2) Mezcla de Tripsina y rLys-C, genera péptidos tripticos y es más eficiente el corte en residuos de lisina. 3) Hidroliza el extremo C-terminal de aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe y Trp) y en menor grado los residuos de Leu y Met. La clave de las bandas se compone por el origen de la muestra: S (semilla seca); M (malta), la variedad y el número sobre la flecha señalados en las figuras 11 y 13.

De forma general, se puede observar en la tabla 5 que las hordeínas ricas en azufre (B3 y gamma1) fueron identificadas tanto en malta como en semilla, mientras que las hordeínas C y gamma 3 se encontraron únicamente en ésta última. Además, de forma interesante se encontraron serpinas (inhibidores de proteasas) únicamente en las bandas de la malta correspondientes a la variedad 08. También se observa que la proteína  $\beta$ -amilasa está presente en todas las muestras de malta y la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) junto con la 1-Cys Peroxirredoxina están en malta pero únicamente en la variedad 23. Finalmente, la Proteína de Transferencia de Lípidos No Específica 1 (LTP1) se encontró en malta y semilla.

Particularmente, notamos que una gran parte de las proteínas identificadas no migran de acuerdo a la masa molecular que les corresponde. Esto puede ser debido a que existen interacciones de tipo covalentes (puentes disulfuro) entre hordeínas que lleven a la formación de aglomerados que se resuelven en un tamaño distinto al de las proteínas que lo forman. Por ejemplo, en la banda M23-1 ubicada entre 55-70kDa, intervalo correspondiente a hordeínas C, se identificaron hordeínas

B3 cuyo tamaño teórico es  $\approx 46$  kDa. A pesar de haber utilizado agentes reductores durante la extracción, es recomendable agregar un paso extra de alquilación de los residuos de cisteína una vez reducidos, para asegurar que no se formen nuevas interacciones entre proteínas.

Por otro lado, las serpinas son inhibidores de serin-proteasas principalmente, y se ha encontrado una relación negativa entre su presencia (principalmente las serpinas Z7 y Z4) y la filtrabilidad de la malta (Jin, *et al.*, 2013).

Además, las serpinas están asociadas a hordeínas y son degradadas para permitir la acción de proteasas sobre las hordeínas. El tamaño de las serpinas Z7 y Z4 es de aproximadamente 42 y 43 kDa respectivamente y dado que se identificaron en bandas de diferente tamaño, es posible que tengan una estrecha asociación con las hordeínas. Considerando lo anterior, la presencia de serpinas no es completamente congruente con la información que se tiene sobre la calidad de la malta de las variedades 08 y 23, que se conocen por producir maltas de muy buena y no muy buena calidad, respectivamente. Esto significa que en el caso de estas variedades, la calidad de la malta está regida por la presencia o diferencia en actividad de otras proteínas; es decir, la presencia de serpinas no es un factor que defina la calidad de la malta. Por el contrario, también existe la posibilidad de que la asociación observada entre hordeínas y serpinas sea en realidad un remanente del proceso de degradación de las últimas y no signifique, necesariamente, que estén inhibiendo la degradación de hordeínas.

Contrariamente a las serpinas, la LTP1 se encuentra de forma preferente en la variedad 23. Se sabe que esta proteína actúa como inhibidor de proteasas y amilasas (Mundy & Rogers, 1986). Es posible que en la variedad 23 la regulación de la proteólisis sea determinada por inhibidores de tipo LTP y en la variedad 08 se regule con serpinas principalmente.

El caso de la beta amilasa es interesante, ya que se encontró únicamente en malta y no en semilla. Dado que la amilasa cataliza la reacción de hidrólisis de almidón a maltosa en el endospermo de semillas en germinación, esta enzima es importante en el malteo; además se sabe que es liberada al endospermo durante la

**Tabla 5.** Proteínas identificadas por EM con todos los protocolos de digestión.

Banda	Hordeínas				Serpinas			Otras			
	B3	Gamma 1	Gamma 3	C	Z7	Z4	Z2A, Z2B y ZXA	$\beta$ -amilasa	GAPDH	1-Cys peroxiredoxina	Proteína de transferencia de lípidos no específica
M19-1								X			
M23-1	X							X			X
M23-2	X							X	X	X	X
M23-3		X						X		X	
M08-1	X				X	X		X	X		X
M08-2	X	X			X	X	X	X			
M08-3		X			X			X			
S04-1	X	X	X	X							
S23-1	X	X		X							X

La clave de las bandas se compone por el origen de la muestra: S (semilla seca); M (malta), la variedad y el número sobre la flecha señalados en las figuras 1 y 2.

germinación. Por esto, no es de sorprenderse que todas las muestras de malta presenten a esta enzima. Es muy probable que el hecho de que se encuentre de distinto tamaño sea debido a que tiene una fuerte asociación con las hordeínas, originada ya sea por la forma en la que se almacenan en los cuerpos proteicos o porque interaccionan una vez que comienza la germinación y esto sea una posible forma de regulación de su actividad.

Igualmente, el fenómeno anterior puede ocurrir con la GAPDH. Esta enzima participa en la glucólisis, y ya que durante la germinación ocurre una activación metabólica para utilizar los carbohidratos liberados del almidón para la producción de ATP, aumenta la síntesis de esta enzima.

Finalmente, la 1-Cys peroxirredoxina es una enzima que tiene un rol de protección en las células de la aleurona y el embrión contra el daño por especies reactivas de oxígeno durante la germinación tardía y la imbibición temprana (Stacy, et al., 1999). En nuestros resultados se observa a esta proteína únicamente en la variedad 23, y es posible que aporte indicios de las condiciones con las que se obtuvo la malta de dicho lote.

Por otro lado, con el fin de evaluar con qué enzimas se mejoraba la identificación de las hordeínas por EM, se siguieron dos protocolos distintos al estándar con tripsina. En este sentido, Colgrave, *et al.*, (2012) reportan un protocolo de digestión secuencial utilizando tripsina y quimotripsina, que permite la identificación por EM de proteínas distintas a las encontradas usando únicamente tripsina en variedades extranjeras (Risø 56, Risø 1508 y Sloop).

De manera interesante, los péptidos identificados en el análisis por espectrometría de masas indican distinto grado de degradación de las hordeínas en las muestras de malta (Tabla 6). Por ejemplo, para la hordeína B3 se observa un gran número y diversidad de péptidos truncados en malta que no contienen Lisina o Arginina en el extremo C-terminal como cabría esperar de una digestión triptica. En cambio, la mayoría de péptidos identificados en semilla para esta hordeína sí contienen los aminoácidos esperados en el C-terminal. Lo mismo se puede observar para la hordeína Gamma 1.

Como se mostró anteriormente, en la Tabla 3, las hordeínas C son el grupo de prolaminas que tiene aminoácidos aromáticos en mayor abundancia, sobre todo fenilalanina. Y considerando que la quimotripsina hidroliza en residuos de aminoácidos aromáticos principalmente, se mejora su digestión y por lo tanto su identificación. Considerando esto, nuestros resultados son congruentes con lo esperado.

Es importante mencionar que el número de péptidos de hordeínas identificados fue muy bajo comparado con el teórico esperado (Véanse Anexo 2 y 3). Además, considerando la intensidad de las bandas que se tomaron para identificar, se esperaba encontrar una gran cantidad de hordeínas. En caso de ser un problema metodológico, esto podría mejorarse si se modifican los tiempos de incubación o cantidades de enzima utilizada.

**Tabla 6.** Hordeínas identificadas con cada protocolo de digestión usado en EM.

<b>Muestra</b>	<b>Enzima</b>	<b>Resultado</b>
<b>M19-1</b>	Tripsina	-----
<b>M23-1</b>	Tripsina	Hordeína B3
<b>M23-2</b>	Tripsina	Hordeína B3
	Trypsin-LysC	-----
	Quimotripsina + Tripsina	-----
<b>M23-3</b>	Tripsina	Hordeína Gamma 1
<b>M08-1</b>	Tripsina	Hordeína B3
	Trypsin-LysC	-----
	Quimotripsina + Tripsina	-----
<b>M08-2</b>	Tripsina	Hordeína B3 Hordeína Gamma1
<b>M08-3</b>	Tripsina	Hordeína Gamma 1
<b>S04-1</b>	Trypsin-LysC	Hordeína Gamma 3
	Quimotripsina + Tripsina	Hordeína Gamma 1
		Hordeína Gamma 3 Hordeína C
<b>S23-1</b>	Trypsin-LysC	Hordeína B3 Hordeína Gamma 1
	Quimotripsina + Tripsina	Hordeína C

La clave de las bandas se compone por el origen de la muestra: S (semilla seca); M (malta), la variedad y el número sobre la flecha señalados en las figuras 1 y 2.

Tabla 7. Péptidos identificados para cada hordeína por EM

	Hordeína B3	Hordeína Gamma 1	Hordeína Gamma 3	Hordeína C
<b>M19-1</b>	--			
<b>M23-1</b>	...PLAIDTR .VPLAIDTR IVPLAIDTR			
<b>M23-2</b>	IVPL IVPLA IVPLAI IVPLAIDTR TLPTMCSVNVPLYR .....TMCSVNVPLYR			
<b>M23-3</b>		APFV APFVGVTGV APFVGVTGVG APFVGVTGVGG APFVGVTGVGGQ		
<b>M08-1</b>	IVPL IVPLA IVPLAI IVPLAIDTR ....PLAIDTR VFLQQCSPLAMSQR			
<b>M08-2</b>	IVPL IVPLA IVPLAI IVPLAID IVPLAIDT IVPLAIDTR ....PLAIDTR	APFVGVT APFVGVTGV APFVGVTGVGGQ .....GVGGQ		
<b>M08-3</b>		APFVGVTGV APFVGVTGVGGQ .....GVGGQ		
<b>S04-1</b>		<i>KCTAIDS</i> <i>KCTAIDSIVHAI</i> <i>KCTAIDSIVHAIF</i> <i>LQQQL</i> <i>LQQQLNPCKEF</i>	<i>LLQQCTLDEKVPLLQSVISF</i> <i>VLPQQQAQF</i> <b>YPEQPQQPFWQQPTIQLYLQQQLNPCK</b> <b>IVQQSSCRVMQQQCCLQLAQIPEQYK</b>	<i>RQLNPSSQELQSPQQSY</i> <i>RQLNPSSQELQSPQQS</i> <i>..QLNPSSQELQSPQQSY</i> <i>.....PSSQELQSPQQSY</i> <i>.....SPQQSY</i>
<b>S23-1</b>	IVPLA IVPLAIDTR .VPLAIDTR TLPTMCSVNVPLYR	<b>APFVGVV</b> <b>APFVGVTGVGGQ</b> <b>IVQQSSCRVMQQQCCLQLAQIPEQYK</b> <b>YPEQPQQPFWQQPTIQLYLQQQLNPCK</b>		<i>.....PQQSY</i> <i>..QLNPSSQELQSPQQSY</i> <i>RQLNPSSQELQSPQQSY</i> <i>RQQAELI</i> <i>RQQAELIIPQQPQQPFPLQPHQPY</i> <i>TQQTIV</i>

Letra redonda: Identificación con Tripsina. Negrita: Identificación con Trypsin-LysC. Cursiva: Identificación con Quimotripsina y Tripsina. La clave de las bandas se compone por el origen de la muestra: S (semilla seca); M (malta), la variedad y el número sobre la flecha señalados en las figuras 11 y 13.

Agregando a lo anterior, se analizaron los péptidos identificados para cada hordeína identificada por EM (Tabla 7) y se encontró que en el caso de malta, para las hordeínas B3 únicamente se identificaron 3 péptidos distintos (IVPLAIDTR, TLPTMCSVNPLYR, VFLQQQCSPLAMSQR) y varios de menor tamaño originados de alguno de estos (Ej. IVPL y IVPLAI para el péptido IVPLAIDTR). Lo mismo sucede para las hordeínas gamma 1 en los que se encontró un péptido (APFVGVVTGVGGQ). Los péptidos mencionados fueron cortes trípticos y los de menor tamaño son muy posiblemente debidos a la proteólisis generada durante el proceso de malteo, ya sea en la germinación o en el secado y tostado. Esto es un acercamiento para conocer el grado de degradación de proteínas que ocurre en cada variedad.

En el caso de semilla seca, los péptidos identificados para las hordeínas B3 sólo se identificaron en la variedad 23 y son los mismos observados en la malta de esa misma variedad; sin embargo es evidente que el número de péptidos de menor tamaño es mucho menor en semilla que en malta.

Para las hordeínas gamma 1 de semilla seca podemos advertir que para la variedad 04 se identificaron de mejor forma utilizando Quimotripsina con Tripsina, contrariamente a la variedad 23 en la que se identificaron usando Trypsin LysC.

Las hordeínas gamma 3 fueron detectadas únicamente en la variedad 04 y las hordeínas C, interesantemente, sólo se observaron en las muestras de semilla.

En ninguna de las bandas se identificó a hordeínas del grupo D, aun cuando se seleccionaron bandas en semilla seca correspondientes a su tamaño, por lo que será necesario optimizar los protocolos de identificación para este tipo de proteínas. Finalmente, la caracterización molecular de las variedades mexicanas de cebada es de gran importancia para encontrar marcadores moleculares que permitan facilitar y acelerar el proceso de obtención de nuevas variedades que se adapten mejor a las condiciones ambientales y requerimientos para la producción de cerveza en México, de esta forma se promueve su cultivo y se benefician los agricultores y la industria mexicana.

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron extractos ricos en hordeínas y se reportaron los patrones de éstas en geles SDS-PAGE de una dimensión de cinco variedades mexicanas de cebada.
2. En semilla seca, las hordeínas D mostraron mayor variabilidad y susceptibilidad a cambios por las condiciones ambientales, contrariamente a las hordeínas C y B cuyos patrones se conservaron entre lotes.
3. Las bandas de 100kDa en las variedades 04 y 19, la de 85kDa en la 11, la de 65kDa en la 18 y de 37-45kDa en la 23 y 18 tienen un potencial uso como marcadores moleculares.
4. La malta de variedades mexicanas de cebada mostró grandes diferencias entre variedades, resaltando que el patrón de la variedad 23 mantiene un elevado contenido de hordeínas, contrario a la variedad 04 que prácticamente muestra ausencia de hordeínas.
5. Para la identificación de hordeínas por EM, la digestión con Tripsina favorece la identificación de péptidos en muestras de malta, mientras que en semilla seca, solamente la digestión conjunta de Tripsina con Quimotripsina favorece la identificación de las hordeínas C.



## PERSPECTIVAS

Estos resultados abren un amplio panorama sobre la influencia de las condiciones ambientales en la expresión de hordeínas, que posteriormente puede ser profundizado con análisis que permitan identificar bandas diferenciales con mayor resolución y en el que se tengan controladas las condiciones de cultivo, de esta forma se podría obtener un patrón definido para cada variedad.

Estos patrones pueden ser utilizados para proponer una “prueba diagnóstica” que permita a la industria maltera analizar los lotes de materia prima y complementar sus metodologías actuales para identificar con mayor certeza cada variedad, además de anticipar las condiciones de procesamiento para obtener malta.

Este “método diagnóstico” basado en geles de una dimensión tendría las ventajas de ser relativamente rápido y barato, ya que sólo es necesario hacer un gel de poliacrilamida que permitirá identificar si se trata de un lote compuesto por una variedad o mezclas de variedades. Incluso se ha propuesto que pueden obtenerse muestras de hordeínas de semillas individuales y es suficiente para determinar la variedad de la semilla (Shewry, *et al.*, 1978).

Estos patrones también, se pueden utilizar para identificar nuevas variedades malteras; es decir, son una forma de monitorear cruces entre variedades que permita la selección de plantas útiles de las cuales se pueda obtener malta de buena calidad. De esta forma se reducen tiempo y costo, y se benefician los agricultores y la industria maltera-cervecera mexicana.

En suma, se propone analizar con mayor resolución a las hordeínas B y determinar las condiciones que influyen en la acumulación de hordeínas D para proponer posteriormente un método de análisis de hordeínas que permita diferenciar entre variedades, identificar futuras variedades malteras y encontrar una asociación entre grupos de hordeínas con calidad de la malta.

## ANEXOS

### 1 Parámetros de calidad de la malta

Algunos de los parámetros más importantes que son evaluados en la malta se presentan a continuación. Éstos se clasifican en tres grupos: los relacionados con el rendimiento, con el comportamiento durante su procesamiento y la calidad del mosto y la cerveza que se obtiene (Bamforth, 2009).

Rendimiento	Comportamiento en el procesamiento	Calidad de mosto y cerveza
<ul style="list-style-type: none"><li>• Humedad</li><li>• Extracto</li><li>• Proteína</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Turbidez</li><li>• Friabilidad</li><li>• Pureza de la variedad</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Color</li><li>• Actividad enzimática</li><li>• Índice de Kolbach</li></ul>

**Humedad:** Las maltas con un menor contenido de humedad pueden ser almacenadas por más tiempo (en buenas condiciones). Un alto contenido de humedad también hace que la molienda de procedimientos posteriores sea más gruesa de lo normal, lo que afecta negativamente los rendimientos. Un exceso de humedad disminuye la estabilidad.

**Extracto:** Se refiere a la cantidad de materia soluble que se puede extraer con agua. Principalmente está dado por azúcares solubles, que son transformados a alcohol en la cervecería. Se persiguen valores altos, para lograr más cantidad de litros de cerveza, por kilogramo de malta utilizado. Esto a su vez depende de la

naturaleza de la cebada original y del grado de modificación logrado durante el malteo.

**Color:** La intensidad del color en el mosto refleja el grado de modificación y secado de la malta. Es un reflejo del color de la cerveza final.

**Turbidez:** Un alto grado de turbidez del mosto podría ser un indicador de una malta menos modificada.

**Proteínas Totales:** Altos valores, indican una mayor dificultad en la transformación de cebada en malta, ya que primero hay que disolver la matriz proteica que rodea a los gránulos de almidón, para que posteriormente otras enzimas puedan llegar éstos y degradarlos. Por otro lado, normalmente altos valores se asocian a bajos contenidos de extracto, mientras que bajos valores, por ejemplo menores a 9%, pueden implicar menores cantidades de proteínas formadoras de espuma y de aminoácidos que son sustrato para las levaduras.

**Proteína soluble:** Se refiere a la cantidad de proteína que es solubilizada durante la maceración y que está disponible en el mosto, está influenciada tanto por el nivel total de proteína como por el grado de modificación de la malta. La proteína soluble contribuye a la formación de color durante la ebullición del mosto y provee de aminoácidos para la nutrición de la levadura durante la fermentación. De igual manera, la proteína soluble residual contribuye a darle cuerpo a la cerveza, así como aumenta el potencial de formación de espuma, aunque niveles excesivos de la misma pueden contribuir a la formación de turbidez.

**Índice de Kolbach:** Es la relación de proteína soluble y proteína total en la malta (EBC). Altos valores nos dan indicativos de maltas muy modificadas, con un contenido de enzimas bastante elevado.

**Viscosidad:** Valores altos son indicativos de una modificación deficiente, así como de la presencia de  $\beta$ -glucanos no degradados, los cuales pueden causar problemas de filtración de mosto y cerveza.

**Poder Diastásico:** Es una medición de las enzimas que degradan el almidón presente en la malta. Los valores están influenciados por la variedad de cebada y el contenido de proteína. La modificación de la malta y las condiciones de secado también influyen en el nivel de enzimas de la malta. Las especificaciones varían mucho dependiendo de los programas de maceración, así como de la proporción de adjuntos no malteados que se utilizan.

**FAN:** Significa “Free Amino Nitrogen”. En la práctica constituye la fracción de aminoácidos resultantes de la degradación de proteínas de alto peso molecular, que las levaduras utilizan como sustrato, en su proceso de multiplicación, en la fase inicial de la fermentación.

**$\beta$ -glucanos en el mosto:** Por lo general, valores extremadamente elevados (>400 mg/L) pueden generar problemas de formación de geles/gomas durante la elaboración de mosto, así como problemas durante las filtraciones de mosto y cerveza. Sin embargo cierta cantidad de  $\beta$ -glucanos es siempre beneficiosa para la cerveza, brindándole cuerpo a la misma y estabilidad a la espuma, esto debido a la menor tensión superficial que pueden impartir.

**Filtrabilidad:** Valores muy elevados pueden ser indicadores de maltas muy modificadas o poco modificadas. Nos da una idea de cómo se comportará la malta durante el filtrado del mosto.

**Tiempo de sacarificación:** Indica la actividad de las enzimas que degradan el almidón. Un tiempo de sacarificación corto es un indicativo de una malta de buena calidad y de una buena degradación de los almidones en azúcares fermentables

**Friabilidad y Homogeneidad:** La “facilidad de moler” la malta es una guía útil para tener una idea del grado de modificación de la misma. Sin embargo los valores de friabilidad están influenciados por la variedad de cebada, contenido de humedad, tamaño y forma del grano, grosor de la cascarilla y contenido de proteína, por lo que las especificaciones para un tipo de cebada no necesariamente son válidas para otro.

La prueba de homogeneidad es probablemente más útil ya que determina el tamaño de grano no friable en la muestra. Fragmentos grandes no friables de endospermo y granos enteros no malteados son fuentes principales de beta-glucanos de elevado peso molecular, los cuales pueden formar geles, en el mosto.

## 2 Proteínas identificadas por EM

Banda	Enzima	Acceso	Descripción	Especie	Péptidos	% cobertura	Score	
M19-1	Tripsina	AMYB_HORSP	Beta amylase	<i>Hordeum spontaneum</i>	11	22.243	958.1711	
		AMYB_SECCE	Beta amylase Fragment	<i>Secale cereale</i>	3	14.4144	726.5082	
M23-1	Tripsina	AMYB_HORVU	Beta amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	20	39.6262	4710.326	
		NLTP1_HORVU	Non specific lipid transfer protein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	2	33.3333	1798.423	
		HOR3_HORVU	B3 hordein Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	3	3.4091	1788.993	
M23-2	Tripsina	REHY_WHEAT	1 Cys peroxiredoxin	<i>Triticum aestivum</i>	9	41.2844	726.8463	
		AMYB_HORVU	Beta amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	31	37.9439	3363.291	
		G3PC_HORVU	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	8	22.6229	683.4961	
		NLTP1_HORVU	Non specific lipid transfer protein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	3	13.6752	7283.569	
		HOR3_HORVU	B3 hordein Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	6	8.7121	1447.567	
		REHY_MAIZE	1 Cys peroxiredoxin	<i>Zea mays</i>	3	4.3668	294.3626	
		G3PE_MAIZE	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic 3	<i>Zea mays</i>	6	10.3858	130.3165	
		G3PC_TOBAC	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic Fragment	<i>Nicotiana tabacum</i>	3	6.4417	130.3165	
	Trypsin LysC	REHY_HORVU	1 Cys peroxiredoxin	<i>Hordeum vulgare</i>	13	18.8073	1152.709	
		AMYB_HORSP	Beta amylase	<i>Hordeum spontaneum</i>	19	23.9252	904.7413	
		AMYB_HORVU	Beta amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	18	12.5234	1488.957	
		G3PC_HORVU	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	12	21.9672	551.8678	
	Quimotripsina + Tripsina		--	--	--	--	--	--
M23-3	Tripsina	REHY_HORVU	1 Cys peroxiredoxin	<i>Hordeum vulgare</i>	14	46.789	939.7536	
		AMYB_HORVU	Beta amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	38	44.8598	4144.813	
		AMYB_SECCE	Beta amylase Fragment	<i>Secale cereale</i>	10	32.8829	2424.369	
		RIP1_HORVU	Protein synthesis inhibitor I	<i>Hordeum vulgare</i>	11	29.5374	701.9058	
		AMYB_WHEAT	Beta amylase	<i>Triticum aestivum</i>	15	18.4891	1225.817	

		HOG1_HORVU	Gamma hordein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	6	4.2623	1436.137
M08-1	Tripsina	AMYB_HORVU	Beta amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	17	32.3364	3078.551
		HOR3_HORVU	B3 hordein Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	7	9.0909	1737.776
		NLTP1_HORVU	Non specific lipid transfer protein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	2	43.5897	1372.459
		G3PC_HORVU	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	6	15.7377	857.4008
		BSZ7_HORVU	Serpin Z7	<i>Hordeum vulgare</i>	5	24.1814	611.0029
		SPZ4_HORVU	Serpin Z4	<i>Hordeum vulgare</i>	6	16.5414	504.0879
	Trypsin LysC	AMYB_HORSP	Beta amylase	<i>Hordeum spontaneum</i>	2	5.4206	449.0423
		AMYB_WHEAT	Beta amylase	<i>Triticum aestivum</i>	3	11.7296	417.2799
		G3PC_HORVU	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	2	4.5902	284.2664
		AMYB_HORSP	Beta amylase	<i>Hordeum spontaneum</i>	5	8.785	472.6556
		G3PC_HORVU	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	4	16.7213	333.0832
		AMYB_WHEAT	Beta amylase	<i>Triticum aestivum</i>	6	12.9225	207.8692
		Quimotripsina + Tripsina	--	--	--	--	--
M08-2	Tripsina	BSZ7_HORVU	Serpin Z7	<i>Hordeum vulgare</i>	13	55.9194	4554.613
		SPZ4_HORVU	Serpin Z4	<i>Hordeum vulgare</i>	16	31.0777	2309.934
		AMYB_HORVU	Beta amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	21	24.8598	1862.152
		HOR3_HORVU	B3 hordein Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	8	3.4091	1429.711
		HOG1_HORVU	Gamma hordein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	4	4.2623	665.4105
		SPZ2A_WHEAT	Serpin Z2A	<i>Triticum aestivum</i>	6	16.3317	555.0499
		SPZ2B_WHEAT	Serpin Z2B	<i>Triticum aestivum</i>	7	15.8291	492.6738
		SPZXA_ORYSJ	Serpin ZXA	<i>Oryza sativa</i>	8	27.7778	401.587
M08-3	Tripsina	HOG1_HORVU	Gamma hordein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	3	4.2623	1124.01
		BSZ7_HORVU	Serpin Z7	<i>Hordeum vulgare</i>	17	38.7909	1122.061
		AMYB_HORVU	Beta amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	13	27.8505	891.2266
S04-1	Trypsin LysC	NLTP1_HORVU	Non specific lipid transfer protein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	5	24.7863	10170.39
		HOR3_HORVU	B3 hordein Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	5	8.7121	1494.466
		HOG1_HORVU	Gamma hordein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	3	23.9344	574.0065
		HOG1_HORVU	Gamma hordein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	2	4.2623	353.494

	Quimotripsina + Tripsina	HORC_HORSP	C hordein Fragment	<i>Hordeum spontaneum</i>	5	60.7143	18249.27
		HOG1_HORVU	Gamma hordein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	5	7.8689	780.4766
		HOG3_HORVU	Gamma hordein 3	<i>Hordeum vulgare</i>	2	10.0346	666.1533
<b>S23-2</b>	Trypsin LysC	NLTP1_HORVU	Non specific lipid transfer protein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	8	24.7863	10170.39
		HOR3_HORVU	B3 hordein Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	4	8.7121	1494.466
		HOG1_HORVU	Gamma hordein 1	<i>Hordeum vulgare</i>	3	4.2623	353.494
	Quimotripsina + Tripsina	HOR8_HORVU	C hordein Fragment	<i>Hordeum vulgare</i>	3	41.6667	3401.701
		HORC_HORSP	C hordein Fragment	<i>Hordeum spontaneum</i>	3	60.7143	12339.84



### 3 Digestión in silico de hordeínas

Cursiva: Péptidos identificados en EM

#### **Hordeína B3**

<b>TRIPSINA</b>		
<b>Posición del sitio de corte</b>	<b>Péptido resultante</b>	<b>Tamaño</b>
6	QQPVS <i>R</i>	6
115	QPQQIIPQQPQQPFPLQPQQPQFPQQPIQQPQYPQQPQSFPQQPFPSQQPFPQQPPFWQQQPVLSQQQPCTQDQTPLLQEQDQMLVQVQIPFVHPSILQQLNPCK	109
130	<i>VFLQQQCSPLAMSQR</i>	15
133	IAR	3
161	SQMLQQSSCHVLQQCCQLPQIPEQLR	28
166	HEAVR	5
238	AIVYSIVLQEQSLQLVQGVSQPQQQSQQQVGGQCSFQQPQPQQGQQQVPSVFLQPHQIAQLEATTSIALR	72
252	<i>TLPTMCNVNPLYR</i>	14
261	<i>IVPLAIDTR</i>	9
264	VG <i>V</i>	3
<b>QUIMOTRIPSINA + TRIPSINA</b>		
<b>Posición del sitio de corte</b>	<b>Péptido resultante</b>	<b>Tamaño</b>
6	QQPVS <i>R</i>	6
22	QPQQIIPQQPQQPFPL	16
66	QPQQPQFPQQPIQQPQYPQQPQSFPQQPFPSQQPFPQQPPF	44
67	W	1
73	QQQPVL	6
86	SQQQPCTQDQTPL	13
87	L	1

94	QEQQDQM	7
95	L	1
102	VQVQIPF	7
108	VHPSIL	6
111	QQL	3
115	NPCK	4
117	VF	2
118	L	1
125	QQQCSPL	7
127	AM	2
130	SQR	3
133	IAR	3
136	SQM	3
137	L	1
143	QQSSCH	6
145	VL	2
160	QQQCCQLPQIPEQL	15
161	R	1
162	H	1
166	EAVR	4
170	AIVY	4
174	SIVL	4
179	QEQSL	5
181	QL	2
202	VQGVSPQQQSQQQQVGCFSF	21
220	QQPQPQQGQQQQVPQSVF	18
221	L	1
224	QPH	3

229	QIAQL	5
237	EATTSIAL	8
238	R	1
243	TLPTM	5
250	CSVNVPL	7
251	Y	1
252	R	1
256	IVPL	4
261	AIDTR	5
264	VGW	3

### **Hordeínas Gamma 1**

<b>TRIPSINA</b>		
<b>Posición del sitio de corte</b>	<b>Péptido resultante</b>	<b>Tamaño</b>
92	ILIIILTILAMATTFATSEMQVNPVSVQVQPTQQQPYPESQQPFISQSQQQFPQPQQPFPQQPQQPFPQSQQQCLQQPQHQPQPT QQFPQR	90
139	PLLPFTHPFLTFPDQLLPQPPHQSFPQQSYPQPPLQPPQPPQK	47
167	YPEQPQQPFPWQQPTIQLYLQQQLNPCK	28
175	EFLLQQCR	8
186	PVSLLSYIWSK	11
194	IVQQSSCR	8
212	VMQQQCCLQLAQIPEQYK	18
230	CTAIDSIVHAIFMQGQR	18
269	QGVQIVQQPQPQQVGGCVLVGGQGVVQPQQLAQMEAIR	39
292	TLVLQSVPSMCFNVPPNCSTIK	23
305	APFVGVVTGVGGQ	13
<b>QUIMOTRIPSINA + TRIPSINA</b>		

Posición del sitio de corte	Péptido resultante	Tamaño
1	M	1
2	K	1
4	IL	2
7	IIL	3
10	TIL	3
12	AM	2
16	ATTF	4
21	ATSEM	5
44	QVNPSVQVQPTQQQPYPESQQPF	23
75	ISQSQQQFPQPQQPFPQQPQQPFPQSQQQCL	31
80	QQPQH	5
94	QFPQPTQQFPQRPL	14
97	LPF	3
101	THPF	4
102	L	1
108	TFPDQL	6
114	LPQPPH	6
129	QSFQPPQSYPQPPL	15
139	QFPQPPQQK	10
150	YPEPQQPFPW	11
157	QQPTIQL	7
158	Y	1
159	L	1
163	QQQL	4
167	NPCK	4
169	EF	2

170	L	1
171	L	1
179	QQCRPVSL	8
180	L	1
182	SY	2
184	IW	2
186	SK	2
194	IVQQSSCR	8
196	VM	2
202	QQQCCL	6
204	QL	2
211	AQIPEQY	7
212	K	1
221	<i>CTAIDSIVH</i>	9
224	<i>AIF</i>	3
225	M	1
230	QQGQR	5
250	QGVQIVQQQPQPQQVGQCVL	20
262	VQGQGVVQPQQL	12
265	AQM	3
269	EAIR	4
271	TL	2
273	VL	2
279	QSVPSM	6
282	CNF	3
292	NVPPNCSTIK	10
295	APF	3
305	VGVVTGVGGQ	10

### Hordeínas Gamma 3

TRIPSINA		
Posición del sitio de corte	Péptido resultante	Tamaño
17	ITTTMQFNPSGLELER	17
106	PQQLFPQWQPLPQQPPFLQQEPEQPYPQQQPLPQQQPFQQLPHQHQPQQLPQQQFPQQMPLQPQQQFPQQMPLQP QQQPQFPQQK	89
143	PFGQYQQPLTQQPYPQQQPLAQQQPSIEEQHQLNLCK	37
155	EFLQQLCTLDEK	12
167	VPLLQSVISFLR	12
179	PHISQQNSCQLK	12
180	R	1
195	QQCCQQLANINEQSR	15
254	CPAIQTIVHAIVMQQVQQVGHGFVQSQLQQLGQGMPIQLQQQPGQAFVLPQQQAQFK	59
289	VVGS�VIQTLPMLCNVHVPPYCSFPGSMATGSGGQ	35
QUIMOTRIPSINA + TRIPSINA		
Posición del sitio de corte	Péptido resultante	Tamaño
6	ITTTM	6
8	QF	2
13	NPSGL	5
15	EL	2
21	ERPQQL	6
25	FPQW	4
34	QPLPQQPPF	9
35	L	1
63	QQEPEQPYPQQQPLPQQQPFQQLPH	28

65	QH	2
82	QFPQQLPQQQFPQQMPL	17
94	QPQQQFPQQMPL	12
108	QPQQQPQFPQQKPF	14
111	GQY	3
115	QQPL	4
126	TQQPYPQQQPL	11
137	AQQQPSIEEQH	11
139	QL	2
141	NL	2
143	CK	2
145	EF	2
146	L	1
147	L	1
152	QQCTL	5
155	DEK	3
158	VPL	3
159	L	1
165	QSVISF	6
166	L	1
169	RPH	3
178	ISQQNSCQL	9
179	K	1
180	R	1
187	QQCCQQL	7
195	ANINEQSR	8
204	CPAIQTIVH	9
208	AIVM	4

218	QQQVQQQVGH	10
220	GF	2
225	VQSQL	5
228	QQL	3
236	GQGMPIQL	8
244	QQQPGQAF	8
253	VLPQQQAQF	9
254	K	1
259	VVGSL	5
266	VIQTLPM	7
267	L	1
271	CNVH	4
275	VPPY	4
279	CSPF	4
282	GSM	3
289	ATGSGGQ	7

### **Hordeínas C**

<b>TRIPSINA</b>		
<b>Posición del sitio de corte</b>	<b>Péptido resultante</b>	<b>Tamaño</b>
2	MK	2
21	TFLTFVLLAMAMSIVTTAR	19
39	QLNPSHQELQSPQQPFLK	18
117	QQSYLQQPYPQQPYLPQQPFPTQQFFPYLPQQTFPPSQQPNPLQPQQPFPLQPQQPPQQPFPQPQQPNPQQPQQPFPR	78
189	QPQQIVPQQPQQPFPQQPQQPFPQPQQPFSWQPQQPFLQPLQLXPLQAQQPFPLQPQLPFPQPQQPIGQQPK	72
308	QPLLQQPQQTIPQQPQQPFPPLQPQQPFPQQPQQPLPQQPQQIISQQPQQPFPPLQPQQPFPQPQQPFPQEQPQQAFPLQPQQPFPEESEQIITQQPFPPLQPQQLFPPQQPQQPLPQQPFPFR	119



312	QLPK	4
347	YIIPQQPQQPFLLQPHQPQQPYAQQDIWSDIALLG	35
<b>QUIMOTRIPSINA + TRIPSINA</b>		
<b>Posición del sitio de corte</b>	<b>Péptido resultante</b>	<b>Tamaño</b>
1	M	1
2	K	1
4	TF	2
5	L	1
7	TF	2
9	VL	2
10	L	1
12	AM	2
14	AM	2
21	SIVTTAR	7
23	QL	2
27	NPSH	4
30	QEL	3
37	QSPQQPF	7
38	L	1
39	K	1
43	QQSY	4
44	L	1
53	QQPYPQQPY	9
65	LPQQPFPTPQQF	12
68	FPY	3
83	LPQQTFPPSQQP NPL	15
91	QPQQPFPL	8

117	QPQPQQPFPQPQQPNPQQPQQPFPR	26
146	QPQQIVPQQPQQPFPQQPQQPFPQPQQPF	29
148	SW	2
154	QPQQPF	6
155	L	1
158	QPL	3
160	QL	2
163	XPL	3
171	QAQQPFPL	8
189	QPQLPFPQPQQPIGQQPK	18
192	QPL	3
193	L	1
210	QQPQQTIPQQPQQPFPL	17
242	QPQQPFPQQPQQPLPQQPQQIISQQPQQPFPL	32
265	QPQQPFPQPQFPQEQQQAFPL	23
286	QPQQPFPEESEQIITQQPFPL	21
291	QPQQL	5
307	FPQQPQQPLPQQQPF	16
308	R	1
312	QLPK	4
313	Y	1
323	IIPQQPQQPF	10
324	L	1
328	QPH	3
334	QPQQPY	6
340	AQQDIW	6

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal, G. & Thelen, J. A high resolution two dimensional gel-and Pro-Q DPS-Based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. *Methods in Molecular Biology*, **3**, 834-841 (2009).
2. Anderson, O. D., *et al.* The B-hordein prolamin family of barley. *Genome*, **56**, 179-185 (2013).
3. Bamforth, C. W., *et al.* (2009) *Beer: A quality perspective*. California,USA: Elsevier.
4. Baxter, E. D., *et al.* Hordein in barley and malt: A review. *Journal of the Institute of Breewing*, **87**, 173-176 (1981).
5. Benetrix, F., Sarrafi, A. & Autran, J. Effects of genotype and nitrogen nutrition on protein aggregates in barley. *Cereal Chemistry*, **18**, 75-82 (1994).
6. Benkowska, D. & Bobálová, J. Application of proteomics to hordein screening in the malting process. *Eur. J. Mass Spectrom.* , **18**, 323-332 (2012).
7. Berne, L. J., *et al.* Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science*, **42**, 139-156 (2005).
8. Blake, T. K., Ullrich, S. E. & Nilan, R. A. Purification and characterization of Barley D-Hordein. *Cereal Chemistry*, **61**, 120-123 (1984).
9. Brennan, C. S., Smith, D. B., Harris, N. & Shewry, P. R. The production and characterization of Hor 3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance. *Journal of Cereal Science*, **28**, 291-299 (1998).
10. Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A. & Stevens, R., 2004. *Brewing: Science and Practice*. Primera ed. Florida, USA: CRC Press.
11. Byung, B. K. & Ullrich, S. E. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, **48**, 233-242 (2008).

12. Castillo, F. C., Rodríguez, R. S., Prieto, F. G. & Román, A. D. Caracterización física y química proximal de paja, grano y almidón de cebada de la variedad Esmeralda. *BioTecnología*, **16**, 9-20 (2012).
13. Colgrave, M., Goswami, H., Howitt, C. & Tanner, G. What is in a beer? Proteomic Characterization and Relative Quantification of Hordein (Gluten) in Beer. *Journal of Proteome Research*, **11**, 386-396 (2012).
14. Echart-Almeida, C. & Cavalli-Molina, S. Hordein polypeptide patterns in relation to malting quality in Brazilian barley varieties. *Pesq. Agropec. Bras.*, **36**, 211-217 (2001).
15. Economía, S. D., 2003. NMX-FF-043-SCFI-2003. En: *Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-Cereal-Cebada maltera (Hordeum vulgare L. y Hordeum distichum L.)-Especificaciones y métodos de prueba*. México, D. F.: Secretaría de Economía, p. 36.
16. Giese, H. & Hopp, H. E. Influence of nitrogen nutrition on the amount of hordein, protein Z and B-amylase messenger RNA in developing endosperms of barley. *Carlsberg Research Communications*, **49**, 365-383 (1984).
17. Howard, K. A., Gayler, K. R., Eagles, H. A. & Halloran, G. M. The relationship between D hordein and malting quality in barley. *Journal of Cereal Science*, **24**, 47-53 (1996).
18. Jin, B. E., *et al.* Investigation of the relationship of malt protein and beer haze by proteome analysis. *J. Food Process Press*, **36**, 169-175 (2012).
19. Jin, Z., Xiao-Min, L., Fei, G. & Jun-Yong, S. Proteomic analysis of differences in barley (*Hordeum vulgare*) malts with distinct filterability by DIGE. *Journal of Proteomics*, **21**, 93-106 (2013).
20. Kumamaru, T., Ogawa, M., Satoh, H. & Okita, T. W. Protein body biogenesis in cereal endosperms. *Plant Cell Monographs*, **8**, 141-158 (2007).
21. Legge, W., *et al.* AC Metcalfe barley. *Canadian Journal of Plant Science*, **12**, 381-384 (2002).
22. March, T. J., *et al.* Identification of proteins associated with malting quality in a subset of wild barley introgression lines. *Proteomics*, **12**, 2843-2851 (2012).

23. Molina-Cano, J. L., *et al.* Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph. II. Genetic and environmental effects on water uptake. *Journal of Cereal Science*, **36**, 39-50 (2002).
24. Mundy, J. & Rogers, J. C. Selective expression of a probable amylase/protease inhibitor. *Planta*, **23**, 51-63 (1986).
25. Osman, A. M., *et al.* Characterization and assessment of the role of barley malt endoproteases during malting and mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, **45**, 62-67 (2002).
26. Qi, J., *et al.* Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *Journal of Zhejiang University Science*, **6B**, 1069-1075 (2005).
27. Qi, J. C., Zhang, G. P. & Zhou, M. X. Protein and hordein content in barley seeds as affected by nitrogen level and their relationship to beta-amylase activity. *Journal of Cereal Science*, **43**, 102-107 (2006).
28. Rahman, S., *et al.* Nutritional control of storage-protein synthesis in developing grain of barley. *Planta*, **159**, 366-372 (1983).
29. Rechinger, K. B., Simpson, D. J., Svendsen, I. & Cameron-Mills, V. A role for  $\gamma$ 3 hordein in the transport and targeting of prolamin polypeptides to the vacuole of developing barley endosperm. *The Plant Journal*, **4**, 841-853 (1993).
30. Shewry, P., *et al.* An evaluation of techniques for the extraction of hordein and glutelin from barley seed and a comparison of the protein composition of Bomi and Risø 1508. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 677-692 (1978).
31. Shewry, P., Napier, J. & Tatham, A. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *The Plant Cell*, **7**, 945-956 (1995).
32. Shewry, P. R., *et al.* The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein compositions of barley grain. *Journal of Cereal Science*, **1**, 21-31 (1983).
33. Shewry, P. & Tatham, A. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *The Biochemical Journal*, **267**, 1-12 (1990).
34. Shewry, P., Tatham, A. & Halford, N. Nutritional control of storage protein synthesis in developing grain of wheat and barley. *Plant Growth Regulation*, **31**, 105-111 (2001).

35. Skerrit, J. H. & Jones, P. W. High performance liquid chromatography of barley proteins: relative quantities of hordein fractions correlate with malt extract. *Journal of the Institute of Brewing*, **65**, 77-84 (1993).
36. Solano, H. S., *et al.* Alina, nueva variedad de cebada maltera para riego en el Bajío. *Agricultura Técnica en México*, **34**, 467-469 (2009).
37. Stacy, R., Nordeng, T., Culiáñez-Macià, F. & Aalen, R. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant Journal*, **29**, 1-8 (1999).
38. Tan, W. A. & Wilson, K. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, **145**, 140-153 (2012).
39. Tatham, A. S. & Shewry, P. R. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *Journal of Cereal Science*, **55**, 79-99 (2012).
40. Yamaguchi, O., Baba, T. & Furusho, M. Relationship between genotype of hordein and malting quality in Japanese barley. *Breeding Science*, **48**, 309-314 (1998).
41. Yin, Y. Q., Ma, D. Q. & Ding, Y. Analysis of genetic diversity of hordein in wild close relatives of barley from Tibet. *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 837-842 (2003).
42. Zamora, D. M., *et al.* Adabella: variedad de cebada maltera para valles altos de la mesa central de México. *Agricultura Técnica en México*, **34**, 491-493 (2008).
43. Zamora, M. D., *et al.* Armida, nueva variedad de cebada maltera para riego en el Bajío. *Agricultura Técnica en México*, **1**, (2010).
44. Aguado, S. G. Obtención de materiales de cebada tolerantes al estrés hídrico mediante variación somaclonal 2008. [En línea]. Disponible en: <http://www.intranetfgp.com/SIAC/2007/36605/Informe%20Final/Informe%20Final.pdf> [Último acceso: 28 Julio 2014].
45. EnsemblPlants, V. 0., 2014. *Hordeum vulgare*. [En línea] Disponible en: [http://plants.ensembl.org/Hordeum\\_vulgare/Info/Annotation/#about](http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Annotation/#about) [Último acceso: 10 Junio 2014].
46. Fernández Vera, Z., 2013. 4° Congreso Latinoamericano de Cebada. [En línea] Disponible en: <http://congresocebada.files.wordpress.com/2012/10/31-10-13->

2-nuevas-variedades-de-cebada-cervecera-adaptadas-a-mc3a9xico.pdf [Último acceso: 27 Julio 2014].

47. Gómez, M. H., 2001. *Hordeum vulgare*. [En línea] Disponible en: <http://ecoport.org/ep?Plant=1232> [Último acceso: 11 Junio 2014].

48. Group, C., 1999. *The Barley Grain*. [En línea] Disponible en: <http://www.crc.dk/flab/the.htm> [Último acceso: 17 Junio 2014].

49. Larkins Lab, P., 2003. *Protein extraction from flour*. [En línea] Disponible en: <http://www.ag.arizona.edu/research/larkinslab/protocols/protein%20extraction%20from%20flour.pdf> [Último acceso: 12 Febrero 2014].

50. SAGARPA, 2014. *Mejora INIFAP variedad de cebada malteada tolerante a la roya y con mayor rendimiento*. [En línea] Disponible en: <http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B006.aspx> [Último acceso: 27 Julio 2014].

51. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, U., 2010. *Notas explicativas sobre la definición de variedad con arreglo al acta de 1991 del convenio de la UPOV*. [En línea] Disponible en: [http://www.upov.int/edocs/expndocs/es/upov\\_exn\\_var\\_1.pdf](http://www.upov.int/edocs/expndocs/es/upov_exn_var_1.pdf) [Último acceso: 2014 agosto 13].