

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**TRANSPEPTIDACIÓN DE PROTEÍNAS DE TRIGO DURANTE EL
PROCESAMIENTO DE PAN REDUCIDO EN GLUTEN PARA
ENFERMOS CELIACOS**

POR:

NINA GISELLA HEREDIA SANDOVAL

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

SEPTIEMBRE DEL 2012

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Nina Gisella Heredia Sandoval, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Ana Maria Calderón de la Barca
Directora de Tesis



Dra. Alma Rosa Islas Rubio
Asesora



Dra. Elizabeth Carvajal Millán
Asesora



Dra. Verónica Mata Haro
Asesora

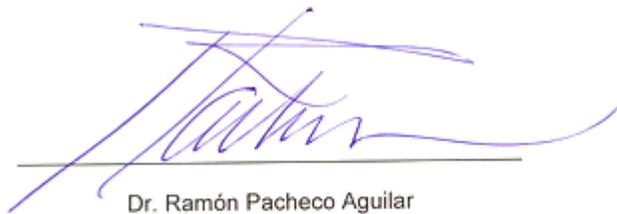


Dr. Francisco Cabrera Chávez
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General del CIAD, A.C.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, en especial a la Coordinación de Nutrición por aceptarme como estudiante y abrirme las puertas durante estos dos años de maestría.

A mi comité de tesis: Dra. Elizabeth Carvajal, Dra. Verónica Mata, Dra. Alma Rosa Islas y Dr. Francisco Cabrera, por su valiosa colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca, por su apoyo desde mis primeras visitas a CIAD, su paciencia, regaños, pero principalmente por haber compartido sus conocimiento y experiencia.

A los integrantes del Laboratorio de Proteínas: Adriana Bolaños por su colaboración en detalles del trabajo, su amistad y cariño; René Valenzuela, por su ayuda y asesoría en el trabajo de laboratorio, sus bromas, amistad, pero sobre todo sus sonrisas; a Iván Anduro por su interés y apoyo en mi trabajo en los últimos meses. A cada una de los estudiantes de servicio, prácticas, veranos, etc., que pasaron por el laboratorio e hicieron más amenos los días de trabajo.

A Orlando Tortoledo por abrirme las puertas de su laboratorio por segunda ocasión y ayudarme con los análisis de aminoácidos por HPLC, así como por su confianza y amistad.

A Ma. del Carmen Granados (Pame) por ayudarme en cada una de las técnicas de panificación aplicadas en este trabajo.

A mis maestros y compañeros de maestría, por contribuir a mi formación profesional y personal, especialmente a mis compañeras del área de nutrición, por todos los momentos de estudio, estrés, felicidad, etc.

A Rocío, Mitzuko, Lore, Ely, Cecy, Caro, Bere, y Mely, por haberse convertido en excelentes amigas fuera y dentro de CIAD.

A mi roomie de laboratorio Melissa Ruíz, por su actitud siempre positiva, su compañía, sus consejos, amistad y muchas más cualidades lindas que la caracterizan. A Lore, la roomie oficial! Por su compañía, por escucharme siempre y darme sus mejores consejos (y con estilo defeño), por su confianza, cariño y amistad. A mis amigas de antaño Mony, Yadell, Martha, Adriana y Pau, por siempre estar conmigo a pesar de las distancias, en especial a Pau, por sus divertidas bienvenidas en tierras nogalenses. A Marcelo, por su gran apoyo y cariño.

DEDICATORIA

A mi familia: Jessy y Faby, mis hermanas y mejores amigas, gracias por su apoyo y cariño incondicional. A mi cuñis José Luis, por apoyarme e interesarse tanto en este trabajo. A mis padres, por su constante apoyo y por estar a mi lado en todo momento.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Enfermedad Celiaca.....	3
Patogénesis.....	4
Tratamiento.....	5
Proteínas en Panificación.....	6
Modificación de Proteínas en Panificación y Enfermedad Celiaca..	6
Métodos de Modificación de Proteínas.....	7
Fermentación Ácida.....	7
Unión de Aminoácidos por Transpeptidación.....	8
Transferasas.....	8
Proteasas.....	10
Efecto de la Modificación Sobre la Respuesta Inmune.....	12
Métodos Para Garantizar la Seguridad de los Alimentos Para Enfermos Celiacos.....	13
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
General.....	15
Particulares.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Modificaciones Enzimáticas.....	16

Modificación con Transglutaminasa Microbiana.....	16
Modificación con α -Quimiotripsina.....	17
Estimación de la Unión de Aminoácidos.....	18
Reacción de Ninhidrina.....	18
Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	18
Propiedades Reológicas de las Masas y Evaluación de los Panes Modificados.....	19
Mixograma.....	19
Elaboración de Pan.....	19
Volumen Específico.....	20
Cuantificación de Gluten por ELISA-R5.....	20
Extracción y Cuantificación de Gliadinas y Gluteninas.....	20
Análisis Estadístico.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
Modificación con Transglutaminasa.....	22
Modificación con Quimiotripsina.....	27
Propiedades Reológicas de las Masas y Evaluación de los Panes Modificados.....	30
Contenido de Aminoácidos Ligados a Gliadinas y Gluteninas en los Panes Modificados.....	36
CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS.....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Efecto de la concentración de ME-Lys y de TGm en el porcentaje de unión a proteínas de trigo, después de 90 min de fermentación de la masa.....	24
2. Contenido de gluten “reactivo” en masa de harina de trigo modificada por transpeptidación con TGm para unirle Lys.....	26
3. Volumen específico y contenido de gluten en panes.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Unión de aminoácidos a proteínas en la harina de trigo.....	23
2. Efecto del tiempo de fermentación en la unión de ME-Lys a harina de trigo, utilizando 2 niveles de TGm (0.4 y 0.8 U/mL) y 2 niveles de ME-Lys (0.2 y 1 M).....	25
3. Efecto del pH en la unión de L-lisina a gluten al 30% (p/v) en agua destilada.....	27
4. Efecto del pH en la unión de ME-Val a gluten al 30% (p/v) en glicerol 3 M.....	28
5. Efecto de la concentración de ME-Val en la unión a gluten al 30% (p/v) en glicerol 3M.	28
6. Efecto de la concentración de Lys en la unión a gluten al 30% (p/v) en glicerol 3M.....	29
7. Mixogramas de harina de trigo y masas modificadas.....	31
8. Corte transversal de las piezas de pan.....	33
9. Contenido de lisina ligada a gliadinas y gluteninas en panes modificados con TGm.....	37
10. Contenido de valina ligada a gliadinas y gluteninas en panes modificados con QT.....	38

RESUMEN

El tratamiento de la enfermedad celiaca es una dieta sin gluten de trigo, cuyo pan hecho con granos alternativos tiene propiedades poco aceptables. Una posibilidad es la panificación con gluten modificado, para evadir la respuesta inmune. Así, el objetivo de esta tesis fue modificar enzimáticamente el gluten durante el proceso de panificación para reducir la respuesta inmune, conservando las características del pan. Se ensayó primero la unión de lisina al gluten aislado usando transglutaminasa microbiana (TGm) o quimiotripsina (QT), además se unió valina utilizando QT. Posteriormente, se pasó al proceso de panificación iniciando con la etapa de amasado, agregando cada aminoácido y enzima, se continuó el proceso con y sin ponchado. Se evaluaron las propiedades reológicas de la masa, el volumen específico de los panes y se cuantificó gluten reactivo. Las mejores condiciones para modificar gluten fueron 0.4 U/mL de TGm y 0.2 M de Lys, así como 0.8 U/mL de TGm y 1 M de lisina, pH 8, 50°C y 45 min de reacción. La valina y la lisina se unieron mejor usando QT con la relación 1:100 QT:gluten, 5% valina a pH 5, o 10% lisina, 37°C y 70-80 min de reacción. En cuanto a volumen específico y reducción de gluten reactivo, fueron mejores los panes modificados con QT que con TGm. Omitiendo el ponchado de la masa, se redujo mejor el contenido de gluten reactivo, independientemente del aminoácido unido. El pan elaborado con 10% de lisina usando QT, mostró mejor disminución (52%) de gluten reactivo comparado con el control. La transpeptidación de proteínas durante la panificación es una tecnología prometedora para la elaboración de pan de trigo para enfermos celiacos.

ABSTRACT

Treatment for celiac disease is a gluten-free diet, but bakery foodstuffs made from alternative grains have low acceptability. Gluten could be modified to avoid the immune response of patients and then used for baking. The aim of this thesis was the enzymatic modification of gluten during the baking process, to reduce the immune response, preserving the gluten properties required to make wheat bread. Firstly, lysine was bound to isolated gluten using microbial transglutaminase (mTG) or chymotrypsin (QT) and separately, valine was also bound to the isolated gluten by QT. Afterwards, the beginning of the baking process started with the mixing of wheat flour, each amino acid used and the corresponding enzyme with and without punching. Dough rheological properties, specific volume and the reactive gluten of breads were evaluated. The best conditions for isolated gluten modification with lysine were 0.4 U/mL of mTG and 0.2 M Lys and, 0.8 U/mL of mTG and 1M Lys, pH 8, 50°C and 45 min reaction. Those conditions for valine and lysine binding using QT were 1:100 chymotrypsin:gluten, 5% Val or 10% Lys, pH 5, 37°C and 70-80 min reaction. The modified breads using QT were better regarding specific volume and reduction of reactive gluten than those obtained by mTG for. The gluten reactivity was lower when the punching step was omitted, independently of the amino acid bound. The best gluten reactivity reduction (52% compared to non-modified bread) was obtained with 10% lysine using QT without punching. Protein transpeptidation during baking process represents promising technology to make wheat bread with reduced reactive gluten for celiac patients.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía autoinmune, que se desarrolla en personas genéticamente predispuestas (Abadie et al., 2011). Esto, debido a la ingestión de las prolaminas del gluten, denominadas gliadinas, secalinas y hordeinas en trigo, centeno y cebada, respectivamente. Además, las proteínas de maíz y avena también pueden desencadenar la intolerancia en algunos celíacos (Kristjánsson et al., 2005; Lundin et al., 2003).

El único tratamiento disponible para la EC, es una dieta libre de gluten de por vida. Por ello, actualmente se ofrecen en el mercado diversos alimentos libres de gluten, principalmente productos de panificación. Estos alimentos para la nutrición especial, no presentan las mejores características de calidad ni de aceptabilidad porque no contienen gluten de trigo, que es el que aporta las propiedades funcionales a la harina destinada a panificación. Por tal motivo, la tecnología de alimentos ha buscado nuevas opciones que puedan aplicarse para el desarrollo de estos productos, brindando calidad, sin representar un riesgo para los celíacos (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2010).

Una de las alternativas en el desarrollo de alimentos para celíacos, es la modificación enzimática de las proteínas del gluten con aminoácidos unidos a las cadenas laterales, para evadir la respuesta inmune. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de enzimas que catalizan reacciones de transpeptidación. Entre éstas, se encuentra la transglutaminasa microbiana, que pertenece al grupo de las acil-transferasas y cataliza el entrecruzamiento entre el grupo acilo de los residuos de glutamina y el grupo amino de lisina (Gianfrani et al., 2010). Además, se ha estudiado el uso de proteasas que actúan como transferasas en un medio restringido de agua, para la síntesis de enlaces peptídicos. En esta forma, se pueden unir diversos aminoácidos hasta encontrar la modificación

que mantenga mejor las propiedades tecnológicas del gluten, para la panificación (Cabrera-Chávez et al., 2010).

La finalidad de realizar estas modificaciones es que los productos resultantes no sean reconocidos por el sistema inmune de los celíacos. Por ello, estas modificaciones deben ser evaluadas inmunológicamente para asegurar que no queden proteínas que sean reconocidas por el sistema inmune de los celíacos (Cabrera-Chávez et al., 2010).

En este estudio, se formularon panes de harina de trigo modificados enzimáticamente, por unión de aminoácidos durante el procesamiento, añadiéndolos junto con las enzimas en el mezclado. Para establecer las condiciones de reacción, se realizaron modelos sencillos utilizando gluten aislado de trigo en suspensión. A las masas preparadas, se les evaluaron las propiedades reológicas, y a los panes obtenidos se les evaluó el contenido de gluten reactivo.

ANTECEDENTES

Enfermedad Celiaca

El trigo, después del maíz y al igual que el arroz, es uno de los cereales de mayor cultivo y producción en el mundo, ya que es un alimento básico para la alimentación humana (von Braun, 2007). Sin embargo, aproximadamente el 1% de la población presenta una intolerancia al gluten de trigo y cereales como el centeno y la cebada (Catassi et al., 2007), definida ésta como enfermedad celiaca. Esta patología ocasiona lesiones en la mucosa intestinal causando la posterior atrofia de las vellosidades (Tjon et al., 2010). De no ser tratada a tiempo, puede dar lugar a problemas de malnutrición, por la deficiencia en la absorción de nutrientes, así como inducir el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes. Además, se ha asociado a linfomas intestinales y algunos tipos de cáncer (Cattasi et al., 2005).

La EC se presenta en personas genéticamente predispuestas, portadoras de al menos una de dos variantes del antígeno leucocitario humano (HLA): las moléculas DQ2 y DQ8. Pero la presencia de estos haplotipos no es un factor decisivo para desarrollar EC, sino la combinación de este elemento genético con factores ambientales (Abadie et al., 2011). Diversos estudios han encontrado que las infecciones virales repetidas, la falta de lactancia materna, la introducción temprana de cereales a la dieta e incluso el uso de fórmulas infantiles, son factores ambientales de riesgo (Green y Jabri, 2006).

La EC se caracteriza por la intolerancia permanente al gluten, que es la fracción insoluble en agua de las proteínas de almacenamiento del trigo y otros cereales emparentados taxonómicamente. Estas proteínas en el trigo son denominadas gliadinas (prolaminas) y gluteninas (glutelinas) y son ricas en los aminoácidos

glutamina (~35%) y prolina (~15%) (Tjon et al., 2010). Este último aminoácido es único a causa de su estructura cíclica, su conformación impone algunas restricciones de accesibilidad a la acción proteolítica. Debido a su contenido alto de prolina, las prolaminas se hidrolizan solo parcialmente en el tracto digestivo (Matthias et al., 2010; Shan y Khosla, 2007). Así, en los enfermos celíacos con permeabilidad intestinal restringida, dichos péptidos grandes de gluten llegan a la superficie de la mucosa intestinal, pasan a lámina propia e inician la respuesta inmune.

Patogénesis

La piedra angular en la patogénesis de la EC es la presencia de las moléculas DQ2 y DQ8 del HLA (Abadie et al., 2011; Tye y Anderson, 2008). El primer evento en el desarrollo de la EC es la activación de la respuesta inmune innata por la entrada de péptidos de gluten a través de la barrera epitelial a la lámina propia (Schuppan et al., 2005). En ese sitio, los péptidos de gluten son desaminados por la enzima transglutaminasa tisular (TGt) y quedan con carga eléctrica. De esta forma, aumenta su afinidad a las moléculas HLA-DQ2 y/o DQ8 presentes en células dendríticas, que posteriormente presentan los péptidos a las células T CD4+ (Roessler, 2007), activándose la respuesta inmune adaptativa.

La activación de la respuesta inmune adaptativa ocasiona un daño en el epitelio intestinal, por la producción de citocinas Th1 principalmente interferón (IFN)- γ (Gianfrani et al., 2007). Esta reacción provoca la destrucción de las vellosidades y un aumento en la permeabilidad intestinal. La respuesta adaptativa de tipo humoral es activada por las células T CD4+, debido a la liberación de citocinas, en donde los linfocitos B generan anticuerpos anti-transglutaminasa y anti-gliadinas (Roessler, 2007).

Tratamiento

El único tratamiento de la EC hasta hoy, es mantener una dieta exenta de gluten (Matthias et al., 2007), lo cual es un reto, debido a que es un ingrediente utilizado ampliamente en la industria de los alimentos. Sus principales aplicaciones son en productos de panificación, para la elaboración de galletas, pastas y como ingrediente en salsas, sopas instantáneas, e incluso medicamentos. Por ello, el consumo diario de gluten en la población sana es entre 10 y 15 g/día, lo cual dificulta en gran medida la adherencia a una dieta que no lo contenga (Tjon et al., 2010). Además, factores como la presencia de pequeñas cantidades de gluten en algunos productos por contaminación en los procesos de producción, el costo alto y disponibilidad limitada de los productos libres de gluten, hacen difícil mantener una dieta sin gluten.

La variabilidad en la sensibilidad al gluten entre los individuos y la dificultad para mantener una dieta estrictamente libre de gluten, han dado lugar al desarrollo de nuevas terapias para combatir o evitar los efectos de la EC. Entre éstas se encuentran el uso de agentes bloqueadores de la TGt o de los receptores HLA-DQ, así como citocinas anti-inflamatorias. También se ha considerado el uso de antagonistas específicos de zonulina para inhibir la permeabilidad intestinal y de propil-endopeptidasas para degradar los péptidos de gluten. Sin embargo, todas estas alternativas aún están bajo estudio, por lo que su posible aplicación puede tardar algunos años (McAllister y Kagnoff, 2012; Lerner, 2010).

Actualmente, además del desarrollo de medidas terapéuticas, se han propuesto diversos tratamientos tecnológicos para la elaboración de productos de panificación con gluten de trigo, para celíacos. Estos, consisten en la modificación de las secuencias tóxicas de las proteínas del gluten, con el fin de evadir la respuesta inmune de los pacientes celíacos (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2010).

Proteínas en Panificación

Las proteínas del gluten son el principal factor ambiental para el desarrollo de la EC (Pszczola, 2010). Son un conjunto de proteínas de almacenamiento del trigo, que tienen en común su insolubilidad en agua y su alto contenido de los aminoácidos glutamina y prolina. Se trata de dos fracciones principales en la harina del trigo: las prolaminas o gliadinas y las glutelinas o gluteninas, que al mezclarse con el agua, se aglomeran formando el gluten (Hui et al, 2006). Así como gluten, tienen la capacidad de formar una masa con características viscoelásticas que ningún otro cereal posee (Hoseney, 1994).

Durante el amasado ocurren diversas transformaciones químicas, físicas y bioquímicas, que dan lugar a un producto con propiedades muy características (Arendent y Dal Bello, 2008). Las gluteninas son proteínas poliméricas estabilizadas por puentes disulfuro intermoleculares, y contribuyen a las propiedades de elasticidad en el complejo del gluten. Por su parte, las gliadinas son principalmente proteínas monoméricas, forman puentes disulfuro intramoleculares y contribuyen a las propiedades de viscosidad (Hui et al., 2006; Pistón et al., 2011). La capacidad que tiene el gluten de formar una masa viscoelástica le permite a la masa expandirse, debido a que atrapa y retiene el CO₂ producido durante la fermentación. Esta propiedad da como resultado una expansión adecuada en el volumen del pan, así como una miga uniforme (Hui et al., 2006).

Modificación de Proteínas en Panificación y Enfermedad Celiaca

Hoy en día, hay en el mercado una gran cantidad de alimentos libres de gluten, principalmente productos de panificación elaborados a base de ingredientes alternativos. La carencia del gluten en las formulaciones, puede dar como resultado una masa líquida y poco manipulable, o bien, en caso de lograr llegar

al proceso de horneado del pan, estos suelen ser quebradizos, de volumen bajo, con sabor y color poco aceptables, además de otros defectos de calidad (Arendent y Dal Bello, 2008; Gallagher, 2009). Estos problemas han dado lugar a la búsqueda de nuevas opciones para la elaboración de panes libres de gluten. Entre éstas, se encuentra la adición de compuestos que imiten sus propiedades viscoelásticas, como son el uso de hidrocoloides, enzimas, almidones, proteínas lácteas o de soya, etc. (Segura y Rosell, 2011).

Sin embargo, aunque el uso de aditivos mejora la calidad de los productos libres de gluten, aún no se ha logrado igualar las características del pan elaborado a base de harina de trigo (Sciarini et al., 2010). Por tanto, la industria de los alimentos ha buscado formas de modificar el gluten de trigo, que puedan cumplir con las necesidades de los celíacos, en términos de calidad así como de seguridad.

Métodos de Modificación de Proteínas

Para modificar las secuencias de las proteínas del gluten, se ha propuesto la tecnología enzimática, con el fin de evitar la activación de la respuesta inmune en los celíacos. Además, su objetivo es conservar la funcionalidad de las proteínas, la manipulación de la masa y la calidad del pan, al menos parcialmente (Huttner y Arendt, 2010). Los métodos de modificación incluyen la fermentación ácida y la unión de aminoácidos a las cadenas laterales de las proteínas, usando proteasas o por transferasas.

Fermentación ácida. La modificación por fermentación ácida, consiste en la adición de microorganismos vivos como iniciadores de la fermentación ácido-láctica y alcohólica, para la producción de panes de masa ácida. Para esto, se utilizan principalmente bacterias ácido lácticas (BAL) del género *Lactobacillus*, en combinación con levaduras (Mengod, 2010). El uso de esta modificación, se basa en que algunas BAL producen peptidasas específicas que hidrolizan las

uniones peptídicas en donde aparecen los residuos de prolina, disminuyendo así su toxicidad (Gobbetti et al., 2007).

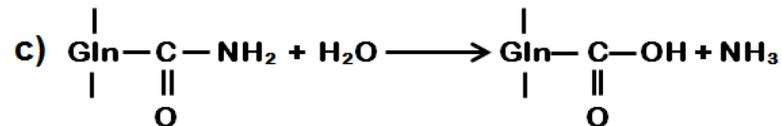
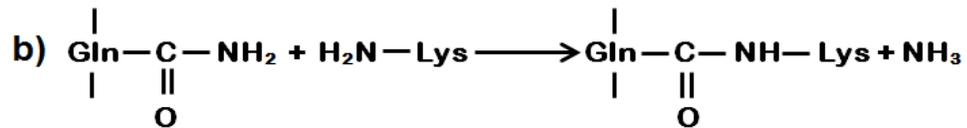
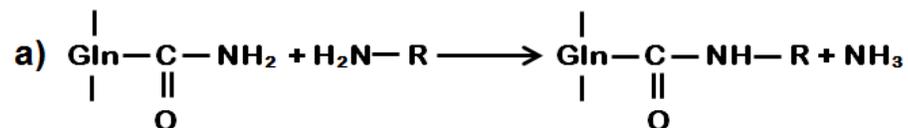
Aunque el empleo de la fermentación ácida para disminuir la toxicidad de las proteínas del gluten ha resultado positivo, existen algunos inconvenientes importantes que limitan su utilización. Uno de ellos, es que se requiere un tiempo de fermentación largo para lograr hidrolizar los péptidos inmunogénicos del gluten. De acuerdo a algunos autores, después de 24 h de fermentación, se hidrolizan suficientemente las prolaminas del trigo (De Angelis et al., 2010). Por otra parte, bajo estas condiciones de fermentación se afecta la estabilidad y resistencia de la masa debido al colapsamiento de la red del gluten (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2010).

Unión de aminoácidos por transpeptidación. Otro método de modificación propuesto para producir pan seguro para los celíacos, es la unión de cualquier aminoácido a los residuos de glutamina en las proteínas del gluten, con el uso de transferasas o proteasas. Esta modificación se basa en que el reconocimiento por las moléculas HLA-DQ depende del tipo de residuos que tengan los péptidos, ya que presentan gran afinidad por los aminoácidos cargados. Por lo que al ser modificados, tendrán un aminoácido unido a los residuos de glutamina, lo cual disminuirá o anulará su reconocimiento. Además, presentarán un efecto estérico, que también influirá en la evasión de la respuesta inmune (Kapoerchan et al., 2008). Las propiedades funcionales de la proteína resultante, dependerán de las características del aminoácido utilizado para la unión. Por ejemplo, si se une un aminoácido azufrado podría mejorarse la funcionalidad de la proteína por la capacidad de formar puentes disulfuro.

Transferasas. La transglutaminasa (TG) pertenece al grupo de las acil transferasas. Éstas catalizan la reacción de transferencia de acilos entre el grupo γ -carboxiamida de los residuos de glutamina en las proteínas, péptidos o

aminas primarias, incluyendo el grupo ϵ -amino de lisina en las proteínas. Esta reacción permite la polimerización de sustratos proteicos o la incorporación de una amina, dependiendo del tipo de sustrato (Curotto et al, 2007).

El primer paso en el mecanismo de acción de la TG, es la acilación de la cisteína (sitio activo de la enzima) por los residuos de glutamina, resultando en la liberación de amoníaco y la formación de un intermediario tioéster entre la TG y el sustrato. En el siguiente esquema se muestran las reacciones catalizadas por la TGm (Buchert et al., 2010):



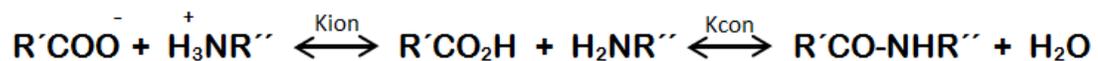
En la reacción de transaminación mostrada en los incisos (a) y (b), el intermediario es atacado nucleofílicamente por una amina primaria, con esto es posible formar enlaces isopeptídicos muy estables (Siegel y khosla, 2007). Si el sustrato no contiene un grupo amino aceptor del grupo acilo, el agua actúa como nucleófilo y ataca al intermediario tioéster resultando en la conversión de glutamina a glutamato por desaminación (c) (Buchert et al., 2010; Siegel y khosla, 2007).

La enzima transglutaminasa microbiana (TGm) pertenece al grupo de las acil transferasas, por lo que se ha estudiado la posibilidad de utilizarla para

disminuir la toxicidad de las proteínas del gluten, al catalizar una reacción de transaminación. Gianfrani et al. (2007), emplearon TGm para unir metil éster de lisina a los residuos de glutamina en harina de trigo, encontrando un bloqueo en la respuesta inmune de celíacos mediada por células T específicas a gliadinas. Esta modificación está lejos de ser aplicada para fines prácticos, debido a que se realizó en un sistema muy diluido. Así, sería poco viable económicamente, por efecto del procesamiento para remover tal cantidad de agua.

Proteasas. La unión de aminoácidos libres a péptidos o proteínas se puede realizar mediante el uso de proteasas que actúan como transferasas (Calderón de la Barca et al., 2000). Éstas, catalizan el proceso inverso a la hidrólisis de proteínas, es decir la síntesis de enlaces peptídicos en un medio restringido de agua. Contrario a la hidrólisis, los grupos amino libres reaccionan como nucleófilos en lugar de las moléculas de agua en la síntesis (Kasche, 1989).

La síntesis de enlaces peptídicos por proteasas procede por 2 mecanismos: uno controlado termodinámicamente (SCT) y otro controlado cinéticamente (SCC). El primero, se muestra en el siguiente esquema (Guzmán et al., 2007):



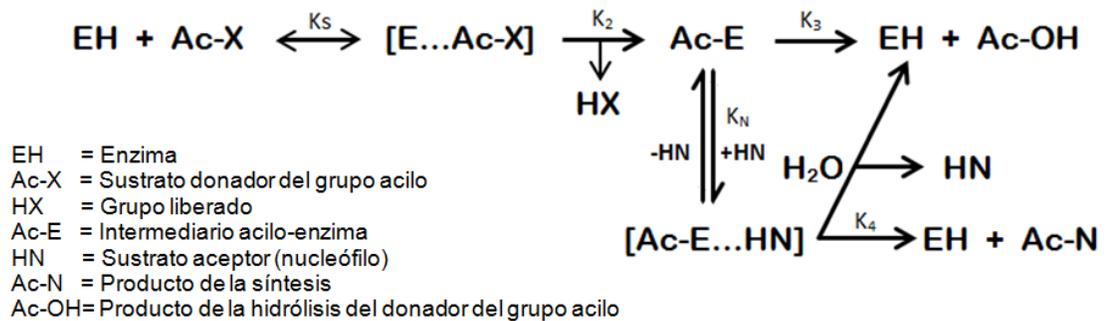
K_{ion} = Constante de ionización en equilibrio

K_{con} = Constante de conversión en equilibrio

La síntesis del enlace peptídico y la reacción de hidrólisis proceden por el mismo mecanismo, a través del mismo intermediario. La formación del intermediario acilo a partir del ácido carboxílico es muy lento y representa el paso limitante en cuanto a velocidad de reacción en este tipo de síntesis. De acuerdo al esquema, el equilibrio puede desplazarse hacia hidrólisis en un medio acuoso. Sin embargo, para desplazarlo hacia la síntesis del enlace peptídico, se requiere manipular el estado de equilibrio de la reacción, ya sea

modificando la composición del medio o bien por cambios de pH. El uso de solventes orgánicos, es una buena opción para desplazar el equilibrio hacia la síntesis, ya que reducen la actividad de agua en el medio de reacción y la constante dieléctrica del medio (Guzmán et al., 2007).

Por otra parte, la SCC procede de acuerdo al siguiente esquema (Guzmán et al., 2007):



El donador del grupo acilo, necesita ser activado en forma de éster, amida o nitrilo. Primeramente, el donador del grupo acilo se une a la enzima, formando un complejo enzima-sustrato, el cual se rompe y forma un intermediario acilo-enzima unido covalentemente [Ac-E]. El intermediario puede ser atacado nucleofílicamente por el agua o por otro nucleófilo (HN), el cual puede ser una amina, alcohol o tiol que sea capaz de competir con el agua para la reacción de deacilación (Guzmán et al., 2007). El éxito de esta reacción dependerá de la cinética de las reacciones nucleofílicas. Además, factores como el pH, temperatura, concentraciones del sustrato y enzima, pueden afectar la SCC. Un aumento en la concentración del nucleófilo puede incrementar la velocidad de ataque nucleofílico al intermediario acilo-enzima; así como también, un aumento en el pH puede favorecer la síntesis, siempre y cuando sea mayor al pK del nucleófilo (Kasche, 1989).

A diferencia de las reacciones SCT, sólo las serin y cistein proteasas pueden llevar a cabo la SCC, debido a que la enzima cataliza la transferencia de un grupo acilo a partir de un aminoácido nucleofílico, a través de la formación de un intermediario acilo-enzima. Generalmente, la SCC procede de forma más rápida y requiere menor cantidad de enzima que la SCT, ya que el donador acilo se encuentra en forma de ácido carboxílico activado. Al igual que en la SCT, un descenso en la actividad de agua favorece la SCC debido a la reducción en la hidrólisis del intermediario acilo-enzima, así como del producto final (Guzmán et al., 2007).

Cabrera-Chávez et al. (2009), unieron metionina con quimiotripsina a los residuos de glutamina en gluten aislado de trigo. Posteriormente, mezclaron el gluten con almidón de maíz para elaborar una masa panaria. El pan que obtuvieron presentó características aceptables y lograron una fuerte disminución en el contenido de gluten reactivo evaluado por el ELISA-R5. Sin embargo, es poco viable escalar esta modificación a un proceso de panificación convencional, debido a las condiciones y reactivos químicos utilizados para la reacción de modificación del gluten. Se requirieron múltiples lavados del gluten modificado antes de poderlo añadir a la masa. Así mismo, se complicó mucho integrarlo con almidón de maíz para formar la masa en el proceso de mezclado.

Efecto de la Modificación sobre la Respuesta Inmune

Los métodos enzimáticos utilizados para modificar gluten, producen un cambio en la funcionalidad de las proteínas. Estas modificaciones traen consecuencias en las características sensoriales del producto resultante. Además, afectan de distinta forma la respuesta inmune de los celíacos.

La modificación por unión de aminoácidos ocasiona un cambio en la estructura de la proteína generando un péptido ramificado y con ello un efecto estérico por la proteína. Así, se evita la afinidad por las moléculas HLA-DQ, eludiendo la presentación del péptido a las células T. Aunque se ha demostrado que la

introducción de una cadena lateral al péptido de gluten, no es capaz de evitar completamente la afinidad por las moléculas HLA-DQ, el complejo péptido-HLA-DQ no es reconocido por las células T CD4+ (Kapoerchan et al., 2010).

Las modificaciones de proteínas de trigo utilizando proteasas o transferasas para unir aminoácidos a los residuos de glutamina, son efectivas para evadir la respuesta inmune en celíacos (Gianfrani et al, 2007; Cabrera-Chávez et al., 2009). Sin embargo, en el caso de la TG, si la modificación no se lleva bajo condiciones adecuadas, puede presentarse el efecto opuesto al buscado. Cuando los residuos de glutamina de las gliadinas son desaminados debido a la ausencia de lisina o proteínas disponibles, se incrementa la afinidad de las proteínas por las moléculas HLA-DQ. Esto ocasiona un aumento en la afinidad a las moléculas HLA en las células presentadoras de antígenos e induce la respuesta inmune (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2010).

Métodos para Garantizar la Seguridad de los Alimentos para Enfermos Celíacos

Debido a la amplia gama de aplicaciones del gluten y al incremento en el número de enfermos de EC, se han desarrollado diversas técnicas analíticas para garantizar la seguridad de sus alimentos. Generalmente se emplean técnicas inmunoquímicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo (Pereira da Silva et al., 2010). Las más utilizadas son los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), en diferentes arreglos y con diversos anticuerpos.

El ensayo ELISA consiste en la unión de un anticuerpo o un antígeno a una superficie a la que previamente se le ha unido uno de los componentes (antígeno o anticuerpo), ligado a una enzima. Esta última cataliza la formación de un cromóforo, que puede cuantificarse por espectrofotometría (Reen, 1994). Existen distintos tipos de ensayos ELISA, siendo los más utilizados para la detección de gluten el de tipo sándwich y el competitivo.

En el ELISA tipo sándwich se utilizan 2 anticuerpos, uno primario y otro secundario que se encuentra ligado a la enzima productora de color. En este ensayo se da lugar la unión covalente del antígeno (gluten) a los 2 anticuerpos, permaneciendo entre estos. En el caso del ELISA competitivo la muestra es incubada con el anticuerpo, para después agregar esta preparación sobre una superficie recubierta con antígeno, de tal manera que se une a la superficie del anticuerpo libre que no se unió al gluten de la muestra. Ambos ensayos son utilizados para detectar prolaminas del gluten. Gessendorfer et al. (2009), encontraron diferencias en la sensibilidad de detección de prolaminas digeridas enzimáticamente entre los dos ensayos. De estos, el ELISA competitivo resultó el más sensible para este tipo de prolaminas, pero al evaluarlas en su estado nativo no se encontraron diferencias entre ambas técnicas.

De acuerdo al *Codex Alimentarius* (2008), el método de referencia para el análisis de gluten en alimentos es el ELISA-R5. Éste se basa en anticuerpos monoclonales que reconocen al péptido QQPFP. Estos anticuerpos R-5 presentan una elevada reactividad a las prolaminas implicadas en la enfermedad celiaca: gliadinas, secalinas y hordeinas. El ELISA-R5 de tipo sándwich es el establecido para la detección de gluten en muestras procesadas térmicamente o en su estado nativo. Para aquellas muestras con gluten hidrolizado, debe aplicarse el ELISA de tipo competitivo.

Una alternativa para evaluar la seguridad de las proteínas del gluten es mediante un ELISA competitivo, con el uso de IgA del suero de los celíacos como anticuerpos primarios en la reacción (Berti et al., 2003). Esta técnica se basa en que los pacientes celíacos producen IgA específica a las proteínas del gluten, los antígenos en la EC. Además, esta técnica permite detectar proteínas que no están en el gluten de trigo como las caseínas de la leche, que también tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune en algunos celíacos (Cabrera Chávez et al., 2009a; Berti et al., 2003).

HIPÓTESIS

Las proteínas del gluten de trigo modificadas por transpeptidación uniéndoles un aminoácido libre, presentan inmunogenicidad reducida o nula y tienen propiedades reológicas adecuadas para la panificación.

OBJETIVOS

General

Modificar enzimáticamente las proteínas del gluten durante el proceso de panificación, para reducir la respuesta inmune de los celíacos, conservando la potencialidad para panificación.

Específicos

- Ensayar la modificación enzimática de las proteínas del gluten uniéndoles aminoácidos libres, optimizando las condiciones de reacción para reducir su reactividad inmunológica.
- Elaborar pan realizando directamente la modificación enzimática de las proteínas durante el proceso, evaluar las propiedades reológicas de la masa y el contenido de gluten en el pan por ELISA-R5.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modificaciones Enzimáticas

Se realizaron modelos de las modificaciones enzimáticas de las proteínas del gluten uniéndoles aminoácidos libres, utilizando gluten aislado de trigo (Sigma Aldrich) y harina de trigo "Los Gallos", de manera independiente. Esto con el fin de reducir la reactividad inmunológica del gluten, utilizando un sistema práctico y sencillo para el análisis, que posteriormente pueda ser escalado al proceso de panificación convencional.

Modificación con Transglutaminasa Microbiana (TGm)

Se realizaron tratamientos en gluten y harina de trigo con TGm de acuerdo a la metodología utilizada por Gianfrani et al. (2007), con algunas modificaciones. Primeramente, se utilizó harina de trigo al 50% (p/v) en buffer Tris-HCl a pH 7.0, 0.8 U/mL de TGm y 1 M de lisina como L-Lys (L-lisina) y como ME-Lys (metiléster de lisina), de manera independiente. Esto con el fin de determinar cuál de las dos formas, actuaba mejor como nucleófilo en la reacción. Se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos de reacción y se centrifugaron a 1260 xg por 15 min. La enzima se inactivó por calentamiento a 85 °C por 15 min. Los sobrenadantes resultantes se analizaron mediante la técnica de ninhidrina para estimar la desaparición de grupos alfa-amino libres en el sistema de reacción.

Una vez determinado el mejor nucleófilo, se probaron 2 concentraciones distintas de Lys (0.2 y 1 M), así como 2 niveles de TGm (0.4 y 0.8 U/mL), bajo las mismas condiciones anteriores. Además, la reacción se optimizó en cuanto a pH, probando tres valores distintos (7, 8 y 9), en una suspensión de gluten al 30% (p/v). Para cada uno de los tratamientos, se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos de reacción, centrifugando a 1260 xg por 15 min. Los sobrenadantes resultantes fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución, para determinar la concentración de aminoácidos unidos en cada tratamiento. Finalmente, una vez establecidas las condiciones óptimas de reacción, la modificación se escaló para ser aplicada directamente sobre la masa en el proceso de panificación.

Modificación con α -Quimiotripsina (QT)

La modificación con QT se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cabrera-Chávez et al. (2010), con algunos ajustes. El modelo consistió en una suspensión de gluten al 30% (p/v) en glicerol 3 M utilizando α -quimiotripsina (QT) (1:100; enzima: gluten) como catalizador. Los aminoácidos utilizados fueron metil éster de valina (ME-Val) y L-Lys. Para ME-Val, se probaron 2 concentraciones (5 y 10% p/p; AA/gluten) y 3 valores de pH (5, 8 y 10), mientras que para L-Lys se probaron solo 2 concentraciones (5 y 10% p/p; AA/gluten).

Se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos de reacción, las cuales se centrifugaron a 1260 xg por 15 min. La enzima fue inactivada por calentamiento a 85°C durante 15 min. Los sobrenadantes resultantes fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución para determinar la cantidad de aminoácidos unidos al gluten de trigo. Una vez determinado el pH óptimo, se escaló la modificación sobre la masa para la elaboración de productos de panificación.

Estimación de la Unión de Aminoácidos

Reacción de Ninhidrina

Para estimar la unión de los aminoácidos al gluten de trigo, se tomaron alícuotas de 1 mL del sistema de reacción a diferentes tiempos, las cuales fueron centrifugadas a 1260 *xg* durante 15 min. De los sobrenadantes obtenidos, se cuantificaron los grupos alfa-amino libres a diferentes tiempos, siguiendo el método descrito por Rosen (1957). La unión de aminoácidos se calculó como la diferencia entre la cantidad de grupos alfa-amino libres en las reacciones catalizadas por la enzima y la teórica.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La determinación de aminoácidos libres en los sobrenadantes obtenidos de los sistemas de reacción, se llevó a cabo por HPLC, de acuerdo a la metodología reportada por Vázquez-Ortiz et al. (1995). La muestra y el compuesto derivatizador (O-ftaldialdehído) fueron mezclados en relación uno a uno durante 2 min a temperatura ambiente. Después, la solución fue inyectada a un cromatógrafo de líquidos con un loop de 10 μ L. La separación de los aminoácidos se hizo en una columna analítica de fase reversa C18 octadecil dimetilsilano de 100 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 3 μ m (Varian, No. R008900E3).

Para la separación cromatográfica se utilizó un gradiente con un flujo de 1.2 mL/min de 2 eluyentes (A: buffer de acetato a pH 7.2 y B: metanol al 100%). El área producida por la fluorescencia se integró mediante el programa CHEM STATION (Agilent Technologies Inc. USA). Los aminoácidos se identificaron y cuantificaron de acuerdo al tiempo de retención y áreas, comparadas con un estándar. La unión de los aminoácidos se calculó como la diferencia de la

cantidad de aminoácidos iniciales, respecto a los aminoácidos libres encontrados en los sistemas de reacción a los diferentes tiempos.

Propiedades Reológicas de las Masas y Evaluación de los Panes Modificados

Mixogramas

Las condiciones de amasado se determinaron con el método 54-40A de la AACC (1995) en un mixógrafo (National Manufacturing Co., Lincoln, NE). La porción de masa utilizada para cada mixograma fue de 30 g. En base a los mixogramas obtenidos, se determinó el tiempo de desarrollo de la masa y la estabilidad durante el amasado.

Elaboración de Pan

La elaboración de pan se llevó a cabo en base al método 10-09 de la AACC (2000), usando harina de trigo (100 g), sal (2 g), levadura (2 g), azúcar (6 g), manteca vegetal (3 g) y agua (61 mL), para preparar el pan control, mientras que en los panes a los cuales se les aplicó tratamiento hubo ligeras modificaciones. Para el tratamiento con QT, se solubilizó previamente la enzima en agua y no se añadió glicerol ya que la actividad de agua de la masa es naturalmente baja. En el caso de los tratamientos realizados con TGm, se ajustó el contenido de sal en la solución azúcar-sal utilizada, ya que la enzima fue solubilizada en solución salina al 3.2% (p/v). Otra modificación consistió en omitir los ponchados, moldeando inmediatamente después del mezclado, con un tiempo de fermentación de 45 min. Se elaboraron panes de cada tratamiento con y sin ponchado.

Volumen Específico (VE)

Se midió el peso y el volumen de los panes después del horneado según el método 10-09 de la AACC (2000). Posteriormente, se calculó el volumen específico expresado como cm^3/g .

Cuantificación de Gluten por ELISA-R5

Una vez elaborados los panes modificados y el control, se molieron en fresco y se les extrajeron gliadinas utilizando etanol al 60%. Posteriormente, se cuantificó el contenido de gluten mediante un ELISA-R5 comercial (Kit Ridascreen gliadin; R-Biopharm, Darmstadt, Alemania), de tipo sándwich, según como lo establece el *Codex Alimentarius* (2008). Se agregaron 100 μL de muestra en cada pocillo de la placa y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados, se añadieron 100 μL del anticuerpo conjugado con peroxidasa y se incubó durante 30 min. Se realizaron tres lavados y se agregaron 50 μL de sustrato (peróxido de urea) y 50 μL de cromógeno (tetrametilbenzidina) a cada pozo, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción se detuvo con 100 μL de ácido sulfúrico 1 N. Finalmente, se leyó la absorbancia a 450 nm. La concentración de gliadinas se determinó en base a una curva estándar de gliadinas. El resultado se multiplicó por 2 para obtener la concentración de gluten expresado en ppm.

Extracción y Cuantificación de Gliadinas y Gluteninas

Se extrajeron gliadinas y gluteninas en el pan control y en 2 panes modificados, uno tratado con TGM y otro con QT. Esto con la finalidad de determinar en qué proporción se modifican ambas fracciones proteicas en cada tratamiento. Las muestras fueron secadas en estufa durante 8 h a 60 °C. La extracción de

gliadinas y gluteninas se realizó utilizando el método descrito por Gil et al. (2003). Los panes, se molieron en mortero hasta obtener harinas. Éstas se desgrasaron en una suspensión de cloroformo (1:5 p/v), manteniéndolas en agitación durante 1 h. Posteriormente se filtraron en papel Whatman No. 1, evaporando el solvente bajo campana de extracción. Las muestras desgrasadas se extrajeron con NaCl 0.5 M (1:10 p/v), en agitación durante 1 h, después se centrifugaron a 1260 xg durante 15 min. Los sobrenadantes se descartaron, y el precipitado se lavó con agua destilada para eliminar las sales.

Las gliadinas se extrajeron con etanol al 70% (1:5 p/v) en agitación 1 h a 4 °C, posteriormente se centrifugaron a 1260 xg durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes (gliadinas) se dializaron contra ácido acético al 1% durante 60 h y se liofilizaron. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en NaOH 0.1 M (1:5 p/v) manteniéndose en agitación 1 h, pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 1260 xg durante 10 min. Los sobrenadantes (gluteninas) se congelaron y liofilizaron.

Las gliadinas y gluteninas obtenidas se hidrolizaron con HCl 6 M en tubos de hidrólisis durante 6 h a 150 °C para cuantificar los aminoácidos unidos en cada tratamiento, respecto al control. El análisis se realizó por HPLC siguiendo la metodología antes descrita.

Análisis Estadístico

Para establecer las condiciones de reacción en los modelos de modificación, se aplicó un diseño en bloques completamente al azar, bloqueándose por tiempo. El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Al encontrar diferencias estadísticas entre las muestras, se analizaron por la prueba de Tukey-Kramer. Los datos se procesaron en el programa estadístico NCSS 2007, a un nivel de probabilidad de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificación con Transglutaminasa

Los resultados de la unión de L-Lys y de Metiléster de Lys (ME-Lys) a las proteínas del trigo por transpeptidación, usando transglutaminasa microbiana (TGm), se presentan en la Fig. 1. En este ensayo, se usó harina de trigo al 50% (p/v), 0.8 U/mL de TGm, pH 7 y 1 M de Lys en cualquiera de sus dos formas. Se unió mejor la ME-Lys entre los 60 y 120 min, que la L-Lys, en cualquier tiempo de reacción medido (Fig. 1). Esto se debe, a que la lisina esterificada, tiene protegido su grupo carboxilo, por lo cual su carga neta es de +2, mientras que la de L-Lys es +1, polaridad que favorece su reactividad como aceptor del grupo acilo de los residuos de glutamina. Después de 120 min de reacción, la concentración de ME-Lys unida disminuyó, probablemente debido a la actividad hidrolítica endógena de la harina.

Los mejores resultados en cuanto a que se une más efectivamente la ME-Lys que la L-Lys coinciden con los de Gianfrani et al. (2007), en un sistema similar con mucho menor concentración de sólidos (12%) y a pH 8.9. Dichos autores, realizaron la modificación en un sistema de laboratorio, modificando las proteínas en harina de trigo completa y demostraron que así modificado el gluten, sus gliadinas no inducían la activación de células T intestinales de enfermos celíacos. En esta tesis, el objetivo fue hacer ensayos lo más cercanamente posible las condiciones de la masa panaria, que se encuentra en el mezclado al 60% de sólidos y a pH debajo de 7. Así, se justifica buscar condiciones para realizar la misma modificación en condiciones de baja humedad, para proceder a la formulación de pan.

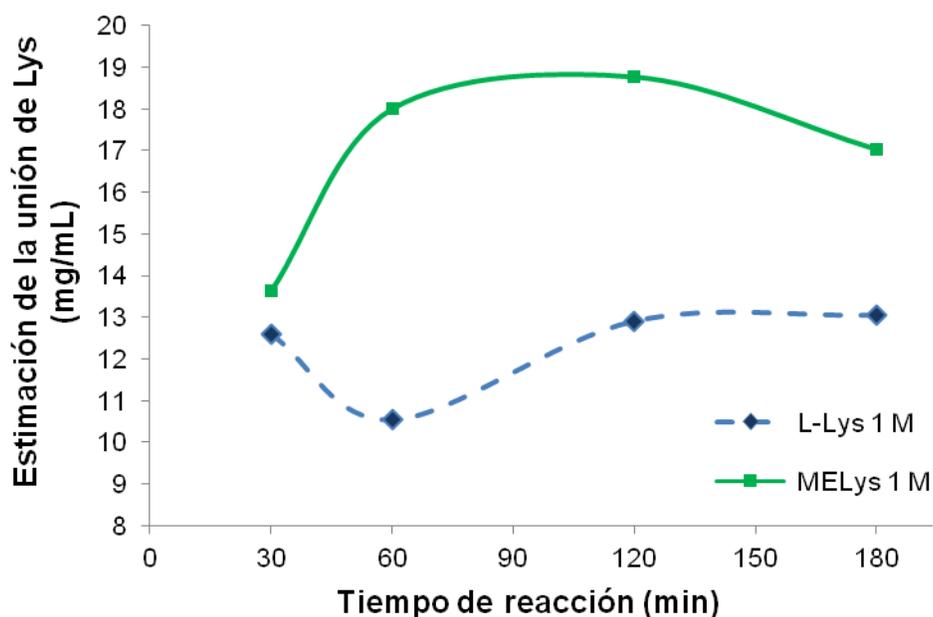


Figura 1. Unión de lisina a proteínas en la harina de trigo. Se estimó la unión como la desaparición de grupos alfa-amino libres en el sistema de reacción, utilizando 0.8 U/mL de TGm y 50% de harina de trigo (p/v) en buffer Tris-HCl pH 7.0. Promedio de duplicados.

La proporción de aminoácido ligada varió en relación a la cantidad añadida a dos niveles de TGm y tres concentraciones de ME-Lys, bajo las mismas condiciones antes descritas (Tabla 1). Independientemente del nivel de TGm, cuando se añadió 0.02 M al sistema de reacción, la proporción unida fue mínima, sin mostrar diferencias ($p > 0.05$) entre el tratamiento 1 y 2 (Tabla 1). Con más de 0.2 M de ME-Lys en el sistema de reacción, más del 50% añadido quedó ligado, como se observa en los tratamientos 3 y 4 (Tabla 1). Estos resultados, sugieren que es necesaria una mayor cantidad de aceptores del grupo acilo que compitan con las moléculas de agua en el sistema de reacción, con el fin de llevar la reacción hacia la transaminación y por tanto, mejorar el rendimiento de la síntesis (Guzmán et al., 2007).

Tabla 1. Efecto de la concentración de ME-Lys y de TGm en el porcentaje de unión a proteínas de trigo, después de 90 min de fermentación de la masa.

Tratamientos	TGm* (U/mL)	ME-Lys (M)	ME-Lys ligada** (%)
1	0.4	0.02	15.09 ± 1.0 ^a
2	0.8	0.02	8.56 ± 3.8 ^a
3	0.8	1	54.82 ± 3.1 ^b
4	0.4	0.2	56.81 ± 2.6 ^b

* TGm (grado alimenticio) =100 U/g de preparación.

** % de ME-Lys ligada, calculada a partir del valor inicial. Media ± DS. Literales distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Debido a que la medición de la desaparición de grupos alfa-amino, como señal indirecta de Lys unida, es solo una estimación, se decidió continuar el estudio cuantificando con exactitud la Lys, por medio de HPLC. Por ser un método cuantitativo, se volvió a evaluar el efecto de los niveles de TGm así como las concentraciones de ME-Lys añadidos al sistema. En la Fig. 2, se observa que hay una relación entre el nivel de TGm y la concentración de ME-Lys añadida. Así, a los 60 min de fermentación en el tratamiento con 0.8 U/mL de TGm y 1 M de ME-Lys, se unen 1458 μ moles, mientras que con 0.4 U/mL de TGm y 0.2 M de ME-Lys, se unen 1261 μ moles.

La idea de unir Lys sola o esterificada a las cadenas de las proteínas del gluten, es con la finalidad de reducir o anular su efecto en el sistema inmune de los enfermos celíacos; es decir, que ellos puedan consumir los alimentos producidos con gluten modificado. De acuerdo al *Codex Alimentarius* (2008), la cuantificación de gluten “reactivo” en un alimento se realiza con un ensayo inmunoquímico usando anticuerpos producidos contra un pentapéptido del gluten, que es inmunodominante en la enfermedad celíaca.

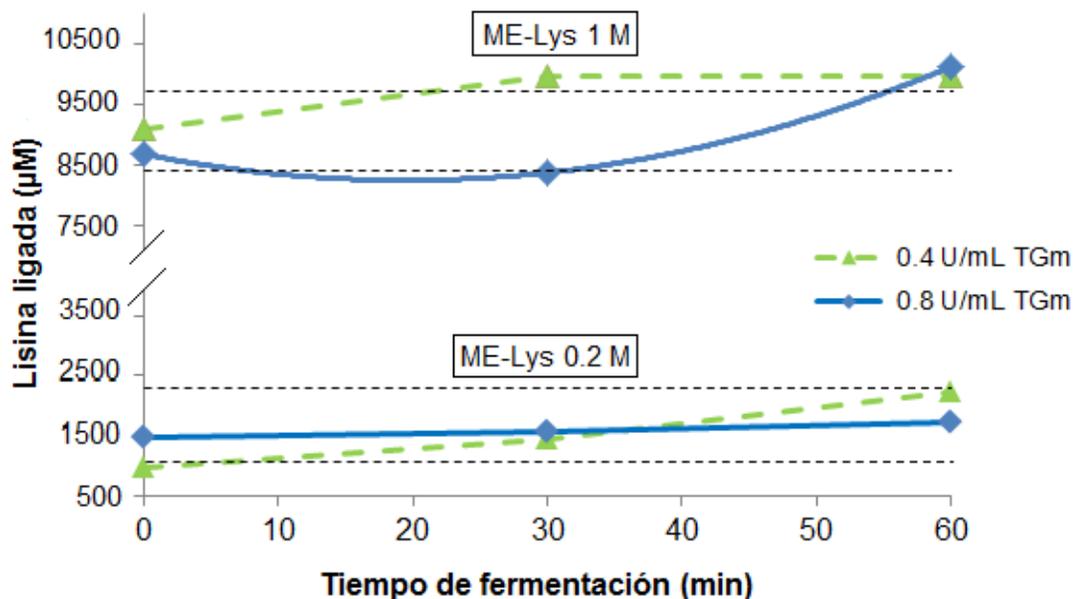


Figura 2. Efecto del tiempo de fermentación en la unión de ME-Lys a harina de trigo. Se usaron dos niveles de TGm (0.4 y 0.8 U/mL) y 2 niveles de ME-Lys (0.2 y 1 M). Promedio de duplicados.

En la Tabla 2, se muestran los resultados de este inmunoensayo (ELISA-R5) con las gliadinas obtenidas del tratamiento con 0.8 U/mL de TGm y 1 M de ME-Lys. Así, se dió una disminución significativa ($p < 0.05$) del 28% del contenido de gluten “reactivo” en la masa después de 60 min de fermentación, masa a la que se le habían unido enzimáticamente 1458 μM de ME-Lys. En base a estos resultados, es posible inferir que las proteínas de trigo modificadas por unión de aminoácidos, no son igualmente reconocidas por los anticuerpos, que aquéllas sin modificar (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2010).

Considerando que el hecho de añadir ME-Lys al sistema de reacción para la transpeptidación, requiere ajustar el pH muy ácido (pH 2) y esto no se puede realizar en la masa del pan para consumo humano, se decidió continuar la optimización de la reacción usando en su lugar L-Lys. Es importante aclarar que la disminución del pH en el sistema de reacción, se debió a la naturaleza del

reactivo utilizado, ya que era di-hidroclorado. También se consideró buscar las mejores condiciones en un sistema más sencillo primero, es decir usando gluten en lugar de la harina de trigo completa. Así, se buscó el mejor pH de reacción (entre 7 y 9) en las condiciones: 1 M de L-Lys, 0.8 U/mL de TGm, 50 °C (Fig. 3).

Tabla 2. Contenido de gluten “reactivo” en masa de harina de trigo modificada por transpeptidación con TGm para unirle Lys.

Condiciones de la Modificación	Tiempo de fermentación (min)	Gluten (ppm)*
0.8 U/mL TGm + 1 M MELys	0	14 000 ^a
0.8 U/mL TGm + 1 M MELys	60	11 000 ^b

*Cuantificado por ELISA-R5. Promedio de duplicados. Literales distintas indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

A pH 8 se unió una mayor ($p < 0.05$) concentración de L-Lys al gluten, que a pH 7 y 9, a los diferentes tiempos de reacción. Entre los 40 y 50 min de reacción se unió la mayor cantidad de L-Lys, en cualquiera de los 3 tratamientos. Mientras que a partir de los 70 min disminuyó la unión del aminoácido, lo cual pudiera indicar que la reacción continuó a hidrólisis. Estas mismas condiciones (0.8 U/mL de TGm, 1 M L-Lys, pH 8), se escalaron directamente sobre la masa y se realizaron pruebas de panificación. Los resultados se describen en la sección “Propiedades reológicas de los panes modificados” (pp. 30-36).

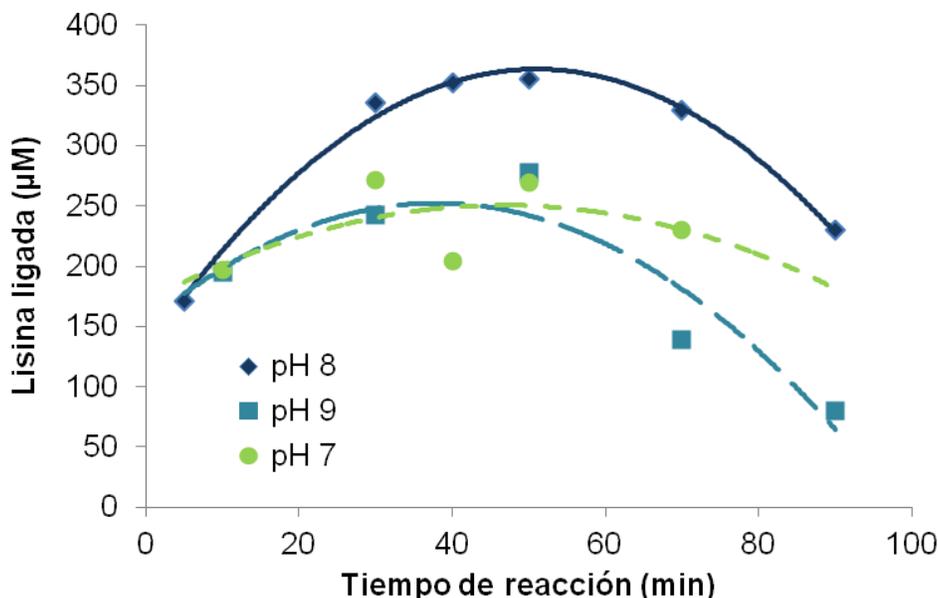


Figura 3. Efecto del pH en la unión de L-lisina a gluten al 30% (p/v) en agua destilada. Promedio de duplicados.

Modificación con Quimiotripsina

En la Fig. 4, se muestra el efecto del pH en la cantidad de valina ligada al gluten de trigo en el sistema de reacción, utilizando 5% de ME-Val. Los resultados indican que existe un mayor ($p < 0.05$) rendimiento de unión a pH 5, que a pH 8 y 10, a los diferentes tiempos de reacción.

Una vez establecido el pH óptimo de reacción, se prosiguió a probar una mayor concentración de ME-Val, agregando el doble de lo agregado anteriormente, 10% ME-Val (p/p, AAs/gluten). En la Fig. 5, se muestra el efecto de la concentración del aminoácido a través de 70 min de reacción. A menor concentración de ME-Val (5%, p/v) se unió una mayor ($p < 0.05$) concentración de valina al gluten, que al añadir el doble del aminoácido a los diferentes tiempos de reacción. La mayor concentración de Val ligada en la síntesis con 10 % de Me-Val fue a los 70 min de reacción. Estas condiciones (5% de ME-Val, pH 5) se utilizaron para la modificación de pan durante el proceso de amasado.

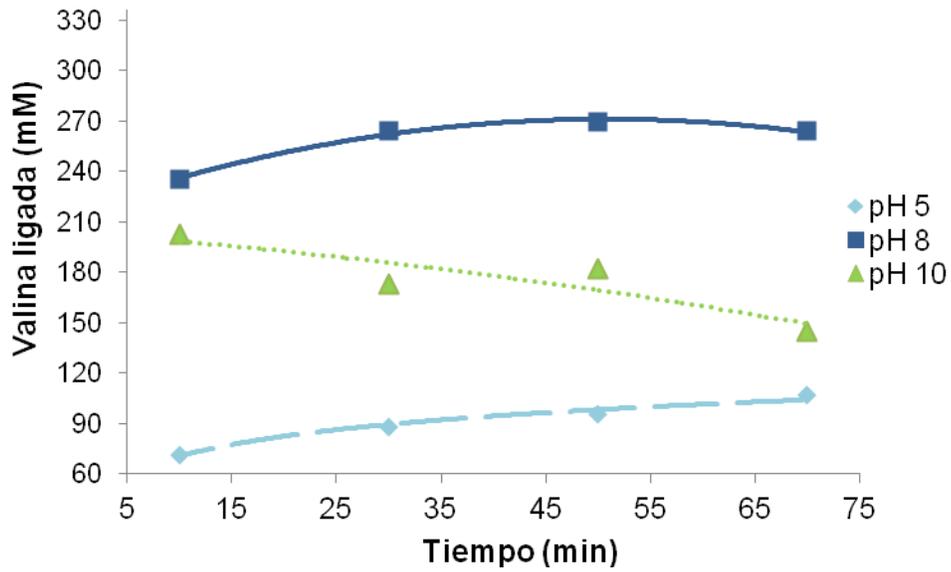


Figura 4. Efecto del pH en la unión de ME-Val a gluten al 30% (p/v) en glicerol 3 M. Promedio de duplicados.

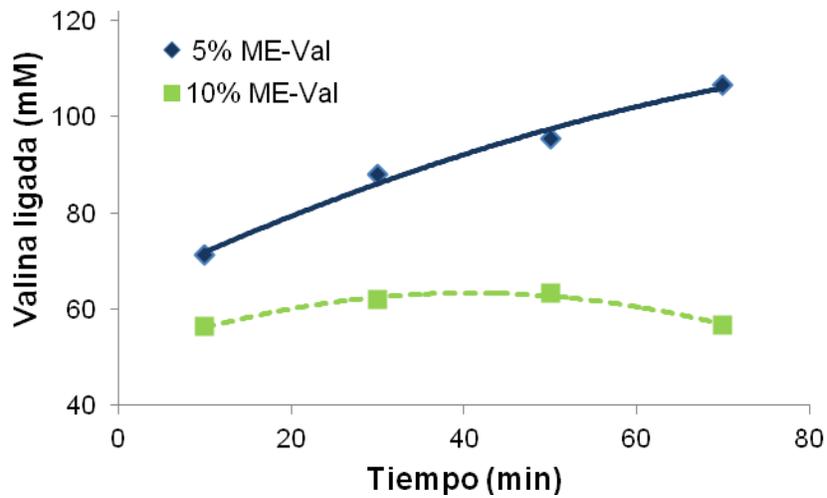


Figura 5. Efecto de la concentración de ME-Val en la unión a gluten al 30% (p/v) en glicerol 3 M. Promedio de duplicados.

Así mismo, se probó la unión de Lys, por transpeptidación con QT. En la Fig. 6, se muestra el efecto de la concentración de Lys añadida al sistema en el

rendimiento de unión al gluten de trigo. Al agregar el 20% de Lys en el sistema no se encontraron diferencias ($p>0.05$) en la concentración del aminoácido ligado al gluten a los diferentes tiempos de reacción. Mientras que al agregar la mitad de Lys (10%), se observó un aumento ($p<0.05$) en la cantidad de Lys ligada. Por tanto, se decidió aplicar estas condiciones para la modificación directamente sobre la masa, sin realizar modificaciones en el pH.

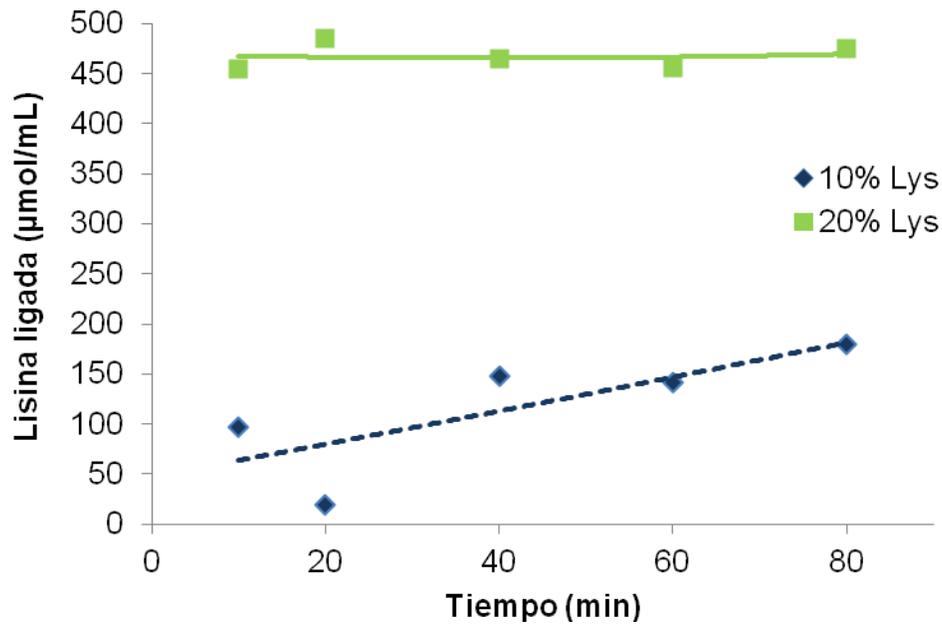


Figura 6. Efecto de la concentración de Lys en la unión a gluten al 30% (p/v) en glicerol 3M. Promedio de duplicados.

En base a los resultados obtenidos en los modelos de las modificaciones de gluten, se establecieron las condiciones de reacción que se aplicaron para la elaboración de los panes. La utilización de este tipo de modelos, hizo posible llevar las modificaciones a mayor escala, de forma práctica y eficiente, ahorrando tiempo, materiales y reactivos.

Propiedades Reológicas de las Masas y Evaluación de los Panes Modificados

De acuerdo a los resultados obtenidos en los modelos anteriores, se aplicaron en lo posible las condiciones de reacción al proceso de panificación. Primeramente, se realizaron mixogramas aplicando cada uno de los tratamientos, para determinar las condiciones óptimas de amasado y la estabilidad de la masa. Los mixogramas grafican la resistencia que opone la masa al movimiento del brazo del mixógrafo. El pico máximo de la gráfica corresponde al punto en el que la masa tiene la máxima resistencia al amasado, lo cual indica el tiempo necesario de amasado en minutos, para producir un pan (Hoseney, 1995; Gaido y Dubois, 2008).

En la Fig. 7, se muestran los mixogramas obtenidos para los 4 tratamientos aplicados con TGm y QT, así como el control. En el mixograma 7b, en donde se utilizaron niveles altos de TGm y de Lys, la altura máxima en el pico de la curva se alcanzó a los 14 min y 30 seg, registrándose incremento en la fuerza de la masa durante más de 30 min de amasado (no mostrado). El tiempo de desarrollo de la masa fue 11 min y 15 seg mayor que el control (3 min 15 seg; Fig. 7a). Este incremento en el tiempo de desarrollo y estabilidad de la masa, pudo deberse al posible entrecruzamiento de las proteínas catalizado por los altos niveles de TGm añadidos en este tratamiento. No obstante, al aplicar niveles bajos de TGm y Lys (Fig. 7c) el tiempo óptimo de amasado fue de 5 min y 30 seg, observándose una mayor fuerza de la masa comparada con el control, pero menor que al agregar niveles altos de la enzima.

Por otra parte, en las figuras 7d y 7e, se muestran los tratamientos catalizados por la QT con la adición de ME-Val y Lys, respectivamente. En el tratamiento con ME-Val, el tiempo óptimo de desarrollo de la masa fue de 2 min, mientras que al añadir Lys el tiempo óptimo fue de 3 min y 45 seg, con un comportamiento muy similar al control.

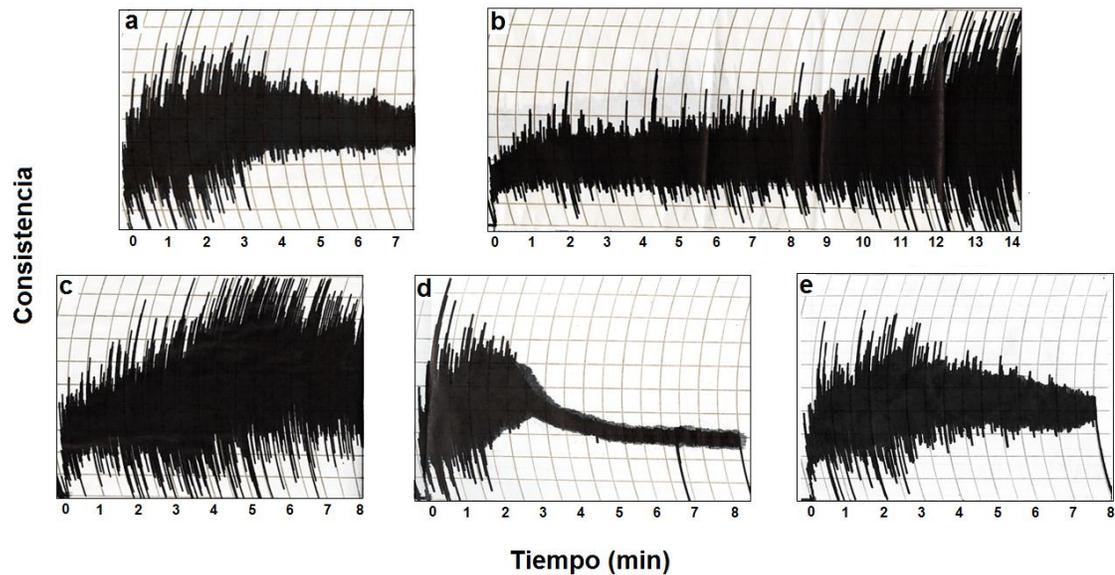


Figura 7. Mixogramas de harina de trigo y masas modificadas. a) agua (control), b) 0.8 U/mL de TGm y Lys 1 M, c) 0.4 U/mL de TGm y Lys 0.2 M, d) QT y ME-Val al 5% (p/p), y e) QT y Lys 10% (p/p).

Al comparar ambos tratamientos (con ME-Val y Lys), se observa que con la adición de ME-Val a partir de los 3 min de amasado, la resistencia de la masa al mezclado cae drásticamente, es decir el gluten se debilita. Esto pudiera deberse a la diferencia de pH entre ambos sistemas, ya que con la adición de Lys el pH era alcalino, mientras que con ME-Val fue ácido. Además, a diferencia de las modificaciones realizadas en gluten aislado, para la panificación no se añadió glicerol para reducir la actividad de agua en el sistema. Así, pudo verse favorecida la hidrólisis de las proteínas colapsando la red de gluten, reduciendo el peso molecular de sus proteínas y la elasticidad de la masa (Stoica et al., 2009). Las proteínas resultantes se hidratan con mayor facilidad (Hoseney, 1995), lo cual explica el menor tiempo de amasado requerido para el tratamiento con ME-Val (2 min) comparado con el tratamiento al que se unió Lys (3 min 45 seg) y el control.

Una vez obtenidos los tiempos óptimos de amasado, se elaboraron 8 panes, un pan control (sin modificación) y 7 panes con masa modificada. Los panes modificados y el control se elaboraron siguiendo el proceso convencional de panificación (AACC International, 2000), excepto en el tratamiento con ME-Val. Esto, debido a que la viscosidad de la masa aumentó considerablemente posterior al primer ponchado, de tal forma que fue imposible su manipulación para continuar el proceso. Por otra parte, se elaboraron panes con los mismos tratamientos, incluyendo el de ME-Val omitiendo el proceso de ponchado y fermentando durante 45 min. Esto porque fue el tiempo óptimo de reacción para unir la Lys a las proteínas en los ensayos previos.

En la Fig. 8, se muestran las imágenes digitales de las cortezas de los panes y sus cortes transversales. La estructura de la miga, así como el volumen de los panes son características importantes para el consumidor, ya que las percibe y asocia a calidad. En general, los panes modificados con QT (Fig. 8f, 8g y 8h) presentaron una miga con una estructura mas o menos regular y homogénea, con mayor similitud a la del control. Por otra parte, en los panes tratados con TGm, la miga fue menos homogénea, presentó fisuras y un aspecto más denso. Esto pudo deberse al incremento en la fuerza de la masa, lo cual afecta al balance entre la fuerza y extensibilidad de la masa, presentando una menor capacidad de retención de gas y menor expansión durante la fermentación. Así, el volumen específico de los panes también se ve afectado (Sciarini et al., 2011).

La homogeneidad de la corteza en la mayoría de los panes obtenidos fue similar a la del control, excepto en 2 panes. La excepción fueron los modificados con 0.8 U/mL de TGm con 45 min de fermentación (Fig. 8c) y con 0.4 U/mL de TGm elaborado con el proceso convencional (Fig. 8d). En ambos casos, la corteza fue poco homogénea y quebradiza.

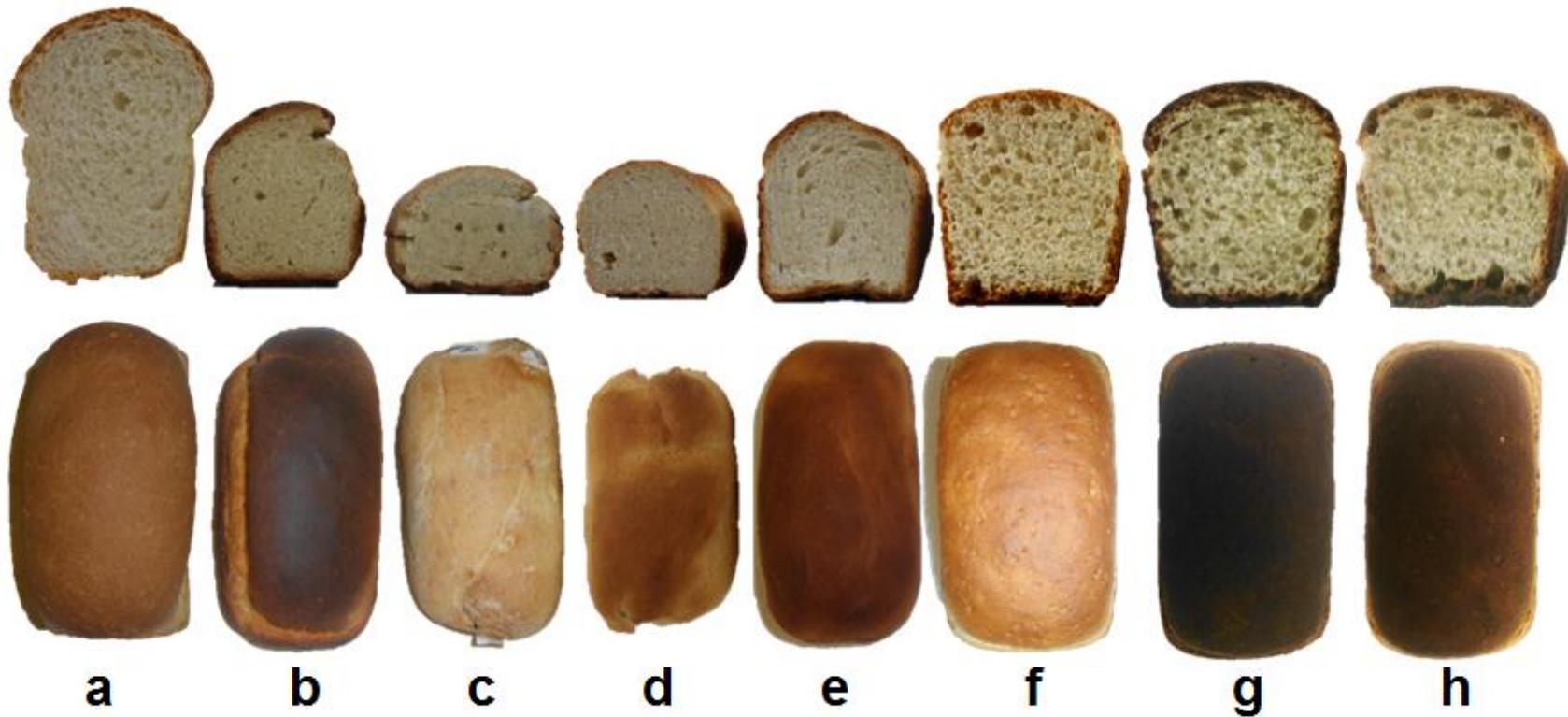


Figura 8. Corte transversal de las piezas de pan. a) control, modificados con b) 0.8 U/mL TGm y Lys 1 M con proceso de panificación convencional y, c) con 45 min de fermentación; d) 0.4 U/mL TGm y Lys 0.2 M con proceso de panificación convencional y, e) con 45 min de fermentación; f) QT y ME-Val al 5% (p/p) con proceso de panificación convencional, g) QT y Lys al 10% (p/p) con proceso convencional de panificación y, h) con 45 min de fermentación.

Por otra parte, tres de los panes obtenidos, el modificado con 0.8 U/mL de TGm con proceso convencional (Fig. 8b), y los modificados con QT y Lys con proceso convencional (Fig. 8g) y con 45 min de fermentación (Fig. 8h), presentaron una apariencia más oscura de la corteza. Esto pudo deberse a reacciones de oscurecimiento no enzimático (reacciones de Maillard), las cuales se llevan a cabo entre el grupo carbonilo de azúcares reductores y el grupo amino de los aminoácidos. La reacción de Maillard, se ve favorecida por la presencia de aminoácidos básicos, especialmente la lisina, así como también por el calor aplicado durante el horneado (Hernández y Sastre, 1999). Los panes con la apariencia más tostada en la Fig. 8, fueron los que contenían más lisina.

Los resultados de la evaluación del volumen específico de los panes una hora después del horneado, se muestran en la Tabla 3. El pan modificado con 0.8 U/mL de TGm con 45 min de fermentación presentó los valores mas bajos de volumen específico con 1.23 cm³/g, mientras que el valor más alto (2.66 cm³/g) se observó en los panes tratados con TGm (0.4 U/mL de enzima con 45 min de fermentación). Estos panes modificados tuvieron un menor ($p < 0.05$) volumen específico que el pan control (4.62 cm³/g). Además, fueron menores comparados a los valores reportados para panes libres de gluten, que van de 1.40-2.71 cm³/g (Marco y Rosell, 2008; Brites et al, 2010). Así, este parámetro se vió afectado por el incremento en la fuerza de la masa.

Los panes modificados con QT presentaron los valores más altos de volumen específico. En los panes a los cuales se les adicionó Lys con 45 min de fermentación y el elaborado con ME-Val presentaron valores iguales ($p > 0.05$) entre sí, pero menores al control ($p < 0.05$). Sin embargo, el pan elaborado con 10% Lys con proceso de panificación convencional, tuvo un volumen específico igual al control ($p > 0.05$), de 4.25 cm³/g. En base a esto, es posible inferir que la modificación realizada con QT, compromete mucho menos las características funcionales de las proteínas del gluten, que con la adición de TGm.

En la Tabla 3 se presentan los resultados del contenido de gluten inmuno-reactivo. En los panes tratados con niveles bajos de TGm y de Lys, con el proceso de panificación convencional, hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de gluten, comparado con el pan en donde se omitieron los ponchados. Esto puede deberse a que después de los 45 min de fermentación, el sustrato ya no tenía Lys para enlazar y se favoreció la reacción de desaminación. Esta reacción es capaz de afectar los epítopes involucrados en la EC (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2010), debido a la conversión de glutamina a ácido glutámico. Por el contrario, en los panes tratados con niveles altos de TGm y Lys, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre los elaborados con el proceso convencional y el de 45 min de fermentación.

Tabla 3. Volumen específico y contenido de gluten en panes.

Tratamientos	Volumen específico (cm ³ /g)*	Gluten (ppm)
Control	4.62 ± 0.01 ^a	104 750 ^a
0.4 U/mL TGm y 0.2 M Lys (PC)	1.81 ± 0.04 ^b	117 489 ^b
0.4 U/mL TGm y 0.2 M Lys (P45)	2.66 ± 0.06 ^c	60 921 ^c
0.8 U/mL TGm y 1 M Lys (PC)	2.17 ± 0.07 ^b	105 306 ^a
0.8 U/mL TGm y 1 M Lys (P45)	1.23 ± 0.26 ^d	100 912 ^a
QT y 10% Lys (PC)	4.25 ± 0.21 ^a	84 854 ^d
QT y 10% Lys (P45)	3.38 ± 0.07 ^e	50 042 ^e
QT y 5% ME-Val (P45)	3.34 ± 0.14 ^e	78 326 ^d

PC: Proceso convencional de panificación; P45: Proceso con 45 min de fermentación. Literales distintas indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

* Medias ± DE.

El pan modificado con niveles bajos de TGm y Lys sin la etapa de ponchado, presentó una reducción del 42% del contenido de gluten reactivo respecto al control. Esta reducción en los niveles de gluten detectados representa menos de la mitad de lo reportado por Mazzarella et al. (2012), quienes presentaron una reducción del 98%. No obstante, las condiciones utilizadas por Mazzarella

et al. para la modificación fueron muy diferentes a los del presente estudio. Ellos realizaron la modificación en una suspensión de harina de trigo y posteriormente, elaboraron pan con un proceso de doble horneado, además no evaluaron las propiedades reológicas de la masa, ni la calidad del pan y no lo comparan con un pan convencional.

Los panes modificados con QT, tanto con la unión de valina como con Lys, tuvieron una menor ($p < 0.05$) concentración de gluten “reactivo” que el control. En los panes tratados con QT y Lys, se redujo mejor el gluten reactivo cuando se sometió a 45 min de fermentación, comparado con el elaborado por el método convencional. Así, en el pan modificado con QT y Lys con 45 min de fermentación, disminuyó 52% el gluten reactivo, respecto al control. Cabrera-Chavéz et al. (2010), lograron disminuir el contenido de gluten reactivo en pan a 57 ppm, al unir Met utilizando QT. Su modificación fue realizada en gluten aislado bajo un sistema de reacción más controlado, pero se les presentaron muchas dificultades para la elaboración de pan.

En general, el contenido de gluten reactivo de los panes modificados en este estudio fue mayor que el indicado (*Codex Alimentarius*, 2008). Esta comisión establece niveles de 20 a 100 ppm de gluten, para denominar a los alimentos como reducidos en gluten.

Aminoácidos Ligados a Gliadinas y Gluteninas en los Panes Modificados

Las gliadinas y gluteninas que conforman al gluten son de gran importancia, ya que determinan la calidad de panificación. Aunque ambos tipos de proteínas son necesarios, las gluteninas ejercen una mayor influencia sobre la fuerza del gluten (O-Olán et al., 2006). Por ello, se evaluó en qué proporción se modificó cada una de las fracciones proteicas, en el proceso de panificación, utilizando TGm o QT.

En la Fig. 9, se muestra el contenido de lisina en las gliadinas y gluteninas extraídas del pan modificado con 0.4 U/mL de TGm y Lys 0.2 M. En el análisis se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de Lys en las gliadinas del pan modificado, comparado con el control. Por su parte, en las gluteninas no se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) al evaluar el contenido de Lys.

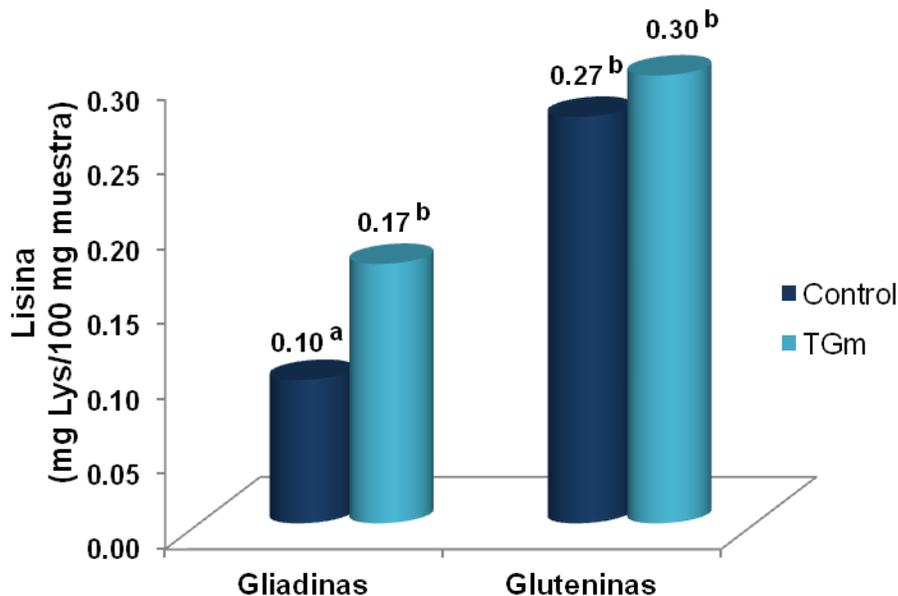


Figura 9. Contenido de lisina ligada a gliadinas y gluteninas en panes modificados con TGm. Promedio de duplicados. Letras distintas en el mismo grupo indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Estos resultados difieren un poco de los de Mazzarella et al. (2012), quienes encontraron un aumento en la concentración de Lys en ambas fracciones proteicas. Sin embargo, ellos realizaron el tratamiento en una suspensión de harina de trigo en agua, utilizando TGm a mayor concentración. Así, estimaron el contenido de lisina como grupos α -amino libres en el sistema de reacción por el método de ninhidrina. De tal manera, que estas diferencias pueden deberse a los distintos métodos de análisis, las condiciones de reacción, así como el tipo

de muestra analizada, ya que en el presente estudio se analizaron estas fracciones en el producto final (pan modificado).

De igual manera, al analizar el contenido de valina en el pan modificado con QT, se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el contenido del aminoácido en las gliadinas, sin embargo no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en las gluteninas (Fig. 10). Con estos resultados, es posible contrastar los datos obtenidos en la cuantificación de gluten reactivo, corroborando la efectividad de los tratamientos al unir aminoácidos en los residuos de glutaminas de las proteínas, específicamente en las gliadinas. Así, podemos inferir que las modificaciones por unión de aminoácidos conllevan a una reducción en el reconocimiento de los epítopes reactivos del gluten por el pentapéptido R5, comparado con el control.

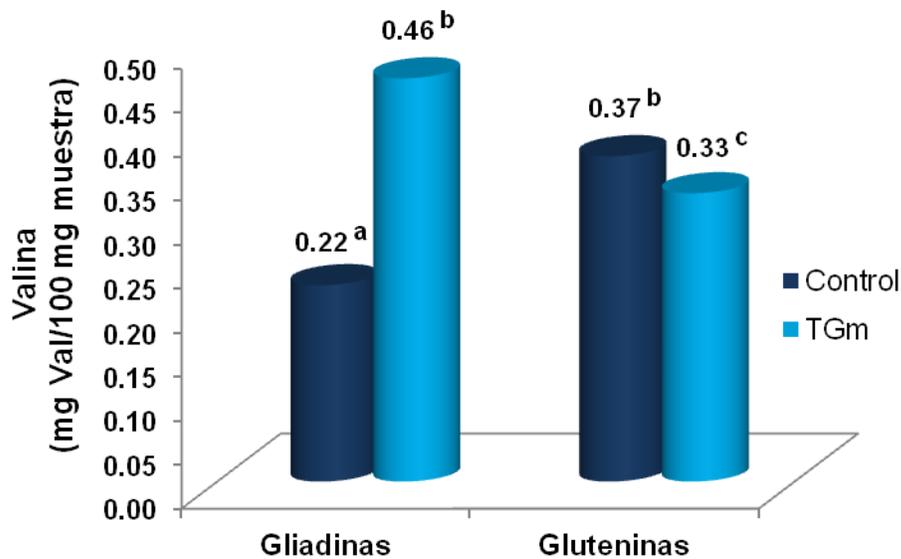


Figura 10. Contenido de valina ligada a gliadinas y gluteninas en panes modificados con QT. Promedio de duplicados. Letras distintas en el mismo grupo indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

El hecho de que la modificación se realizara sobre las gliadinas y no en las gluteninas en el caso de la modificación con QT, permitió que la masa conservara en mayor medida el balance entre la elasticidad y extensibilidad, característica deseable para la elaboración de pan. En los panes modificados con TGm, tampoco se modificaron las gluteninas, pero el posible entrecruzamiento de las proteínas catalizado por la enzima, ocasionó un incremento en la fuerza de la masa, afectado en mayor proporción su funcionalidad.

CONCLUSIONES

Con este trabajo se puede comprobar que la transpeptidación de proteínas durante el amasado representa una tecnología prometedora para la elaboración de productos de panificación con harina de trigo, para enfermos celíacos.

Los modelos de las modificaciones de gluten a menor escala, representan una herramienta útil y práctica para la búsqueda de condiciones de reacción a aplicar en el proceso de panificación. Las condiciones establecidas fueron aplicadas en la elaboración de pan, obteniéndose panes con características similares e incluso mejores a otros panes libres de gluten.

Las características reológicas de la masa, así como la apariencia y volumen específico del pan, se ven más afectadas en los panes modificados con TGm que aquellos modificados con QT. Se encontró una mayor reducción en la concentración de gluten reactivo en los panes modificados con QT, excepto en el pan elaborado con niveles bajos de TGm y Lys, con 45 min de fermentación.

En general, se observó una mejor disminución en la reactividad del gluten (52% respecto al control), en los panes elaborados con 45 min de fermentación que los obtenidos con el proceso convencional de panificación. Los valores más bajos en el contenido de gluten reactivo, corresponden al pan modificado con QT y Lys con 45 min de fermentación.

REFERENCIAS

- Abadie, V., Sollid, L., Barreiro, L., Jabri, B. 2011. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annual Review of Immunology* 29, 493-525.
- AACC International. 2000. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, 10th ed. AACC, St. Paul, MN.
- Berti, C., Trovato, C., Bardella, M., Forlani, F. 2003. IgA anti-gliadin antibody immunoreactivity to food proteins. *Food and Agricultural Immunology* 15, 217-223.
- Brites, C., Trigo, M., Santos, C., Collar, C., Rosell, C. 2010. Maize-based gluten-free bread: influence of processing parameters on sensory and instrumental quality. *Food and Bioprocess Technology* 3, 707-715.
- Buchert, J., Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R., Kruus, K. 2010. Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annual Review of Food Science and Technology* 1, 113-138.
- Cabrera-Chávez, F., Calderón de la Barca, A., 2010. Trends in wheat technology and modification of gluten proteins for dietary treatment of celiac disease patients. *Journal of Cereal Science* 52, 337-341.
- Cabrera-Chávez, F., Islas, A., Rouzaud, O., Sotelo, N., Calderón de la Barca, A. 2010. Modification of gluten by methionine binding to prepare wheat bread with reduced reactivity to serum IgA of celiac disease patients. *Journal of Cereal Science* 53, 310-313.
- Cabrera-Chávez, F., Rouzaud, O., Sotelo, N., Calderón de la Barca, A. 2009. Bovine milk caseins and transglutaminase-treated cereal prolamins are differentially recognized by IgA of celiac disease patients according to their age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3754-3759.
- Calderón de la Barca, A., Ruíz, R., Jara, M. 2000. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *Journal of Food Science* 65, 246-253.
- Catassi, C., Bearzi, I., Holmes, G. 2005. Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology* 128 (4), S79-S86.
- Catassi, C., Kryszak, D., Louis-Jacques, O., Duerksen, D., Hill, I., Crowe, S., Brow, A., Procaccini, N., Wonderly, B., Hartley, P., Moreci, J., Bennett, N., Horvath, K., Burk, M., Fasano, A. 2007. Detection of celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. *American Journal of Gastroenterology* 102, 1454-1460.
- Codex Alimentarius. 2008. Draft revised standard for gluten-free foods. <http://www.codexalimentarius.net>.

- Curotto, E., Dondero, M., Muñoz, C., Álvarez, L. 2007. Extracción, caracterización parcial y termoestabilidad de la enzima transglutaminasa en surimi, en músculo blanco de jurel y en miofibrillas de carne de vacuno. *Información Tecnológica* 18, 3-12.
- De Angelis, M., Cassone, A., Rizzello, C., Gagliardi, F., Minervini, F., Calasso, M., Di Cagno, R., Francavilla, R., Gobbetti, M. 2010. Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by sourdough *Lactobacilli* and fungal proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 508-518.
- Gaido, Z., Dubois, M. 2008. Influencia del estrés térmico en la calidad panadera del trigo: progenies con diferentes niveles de sensibilidad. *Agriscientia XXV* (2), 89-96.
- Gallagher, E. 2009. Improving gluten-free bread quality through the application of enzymes. *AgroFOOD industry hi-tech* 20, 34-37.
- Gessendorfer, B., Koehler, P., Wieser, H. 2009. Preparation and characterization of enzymatically hydrolyzed prolamins from wheat, rye, and barley as references for the immunochemical quantitation of partially hydrolyzed gluten. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 395, 1721-1728.
- Gianfrani, C., Siciliano, R., Facchiano, A., Camarca, A., Mazzeo, M., Costantini, S., Salvati, V., Maurano, F., Mazzarella, G., Iaquinto, G., Bergamo, P., Rossi, M. 2007. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Journal of Gastroenterology* 133, 780-789.
- Gobbetti, M., Rizzello, C., Di Cagno, R., De Angelis, M. 2007. Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiology* 24, 187-196.
- Green, P., Jabri, B. 2006. Celiac disease. *Annual Reviews Medicine* 57, 207-221.
- Guzman, F., Barberis, S., e Illanez, A. 2007. Peptide synthesis; chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology* 10 (2), 279-314.
- Hernández, M., Sastre, A. 1999. *Tratado de Nutrición*. Ed. Díaz de Santos 453-454.
- Hoseney, R. 1994. *Principles of Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemistry, Inc., St Paul, MN., 197.
- Huttner, E., Arendt, E. 2010. Recent advances in gluten-free baking and the current status of oats. *Trends in Food Science & Technology* 21, 303-312.
- Kasche, V. 1989. Proteases in peptide synthesis. En: Beynon, R. Bond, J., *Proteolytic enzymes a practical approach*. IRL Press, Oxford, England, 125-143.
- Kapoerchan, V., Wiesner, M., Hillaert, U., Drijfhout, J., Overhand, M., Alard, P., van der Marel, G., Koning, F. 2010. Design, synthesis and evaluation of high-affinity binders for the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. *Molecular Immunology* 42, 1091-1097.
- Kapoerchan, V., Wiesner, M., Overhand, M., van der Marel, G. Koning, F., Overkleeft, H. 2008. Design of azidoproline containing gluten peptides to suppress CD4+ T-cell responses associated with celiac disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 2053-2062.

- Kristjánsson G, Högman M, Venge P, Hällgren R. 2005. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: Studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. *Gut* 54, 769–774
- Lerner, A. 2010. New therapeutic strategies for celiac disease. *Autoimmunity Reviews* 9, 144-147.
- Leszczyńska, J., Lacka, A., Bryszewska, M. 2006. The use of transglutaminase in the reduction of immunoreactivity of wheat flour. *Food and Agricultural Immunology*, 1-9.
- Lundin, K., Nilsen, E., Scott, H., Løberg, E., Gjøen, A., Bratlie, J., Skar, V., Mendez, E., Løvik, A., Kett, K. 2003. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* 52, 1649-1652.
- McAllister, C.S., Kagnoff, M.F. 2012. The immunopathogenesis of celiac disease reveals possible therapies beyond the gluten-free diet. *Seminars in Immunopathology*. doi;10.1007/s00281-012-0318-8.
- Malandain, H. 2005. Transglutaminases: A meeting point for wheat allergy, celiac disease, and food safety. *European annals of allergy and clinical immunology* 37, 397-403.
- Marco, C., Rosell, C. 2008. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *European Food Research and Technology* 227, 1205-1213.
- Matthias, T., Pfeiffer, S., Selmi, C., Gershwin, M. 2010. Diagnostic challenges in celiac disease and the role of the tissue transglutaminase-neo-epitope. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 38, 298-301.
- Mazzarella, G., Salvati, V., Iaquinto, G., Stefanile, R., Capobianco, F., Luongo, D., Bergamo, P., Maurano, F., Giardullo, N., Malamisura, B., Rossi, M. 2012. Reintroduction of gluten following flour transamidation in adult celiac patients: a randomized, controlled clinical study. *Clinical and Developmental Immunology* doi: 10.1155/CD1.
- O-Olán, M., Espitia-Rangel, E., Molina-Galan, J., Peña-Bautista, R., Santacruz-Varela, A., Villaseñor-Mir, H. 2006. Efecto de diferentes alelos de gluteninas de alto peso molecular sobre las propiedades viscoelásticas de la masa de trigos harineros. *Agrociencia* 40, 461-469.
- Pereira da Silva, M., González, M., Antonius, H., Delerue, C., Santos, A., Costa, A. 2010. Celiac disease diagnosis and gluten-free food analytical control. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 397, 1743-1753.
- Pistón, F., Gil-Humanes, J., Rodríguez-Quijano, J., Barro, F. 2011. Down-regulating γ -gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength. *PLoS ONE* 6(9): e24754. doi:10.1371/journal.pone.0024754.
- Pszczola, D. 2010. Take the next emerging lane. *Food Technology* 64, 73-88.
- Reen, D. 1994. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). En: Walker, J. Basic protein and peptide protocols. *Methods in molecular biology*. Humana Press, Hatfield, UK, 125-143.
- Roessler, P. 2007. Avances inmunológicos en enfermedad celiaca. *Gastroenterología Latinoamericana* 18, 122-125.

- Sánchez, H., González, R. Osella, C., Torres, R., de la Torre, M. 2008. Elaboración de pan sin gluten con harinas de arroz extrudidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6, 109-116.
- Sciarini, L., Perez, G., Lamballerie, M., Leon, A., Ribotta, P. 2011. Partial-baking process on gluten-free bread: impact of hidrocolloid addition. *Food Bioprocess Technology* 5(5), 1724-1732.
- Sciarini, L., Ribotta, P., León, A., Pérez, G. 2010. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. *Food Bioprocess Technology* 3, 577-585.
- Shan, L., Khosla, C. 2007. Chemistry and biology of gluten proteins. *Immunology Endocrine & Metabolic Agents - Medicinal Chemistry* 7, 187-193.
- Schuppan, D., Dennis, M., Kelly, C. 2005. Celiac Disease: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and nutritional management. *Nutrition in Clinical Care* 8, 54-69.
- Segura, M., Rosell, C. 2011. Chemical composition and starch digestibility of different gluten free breads. *Plant Food for Human Nutrition* 66 (3), 224-230.
- Stoica, A., Popescu, E-C., Iordan, M., Barascu, E. 2009. Influence of a fungal protease on the physical properties of bread made from short gluten flours. *Journal of Agroalimentary Process and Technologies* 15 (2), 301-304.
- Tjon, J., van Bergen, J., Koning, F. 2010. Celiac disease: how complicated can it get?. *Inmunogenetics* 62, 641-651.
- Tye, J., Anderson, R. 2008. Immunopathogenesis of celiac disease. *Current Gastroenterology Reports* 10, 458-465.
- Vázquez, F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., & Hernández, G. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *J. Liquid Chromatography*. 18 (10), 2059-2068.
- von Braun, J. 2008. La situación alimentaria mundial: nuevos factores y acciones necesarias. Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias. Washington, D.C., 9-11.