CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION Y DESARROLLO, A. C.

ESTUDIO DE LA HIDROFOBICIDAD DE LAS PROTEINAS DE TRIGO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERACCION HIDROFÓBICA EN AGAROSA ALTAMENTE ACETILADA Y SU RELACION CON PROPIEDADES FUNCIONALES

Por

Patricia Isabel Torres Chávez

Tesis aprobada por IH

DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS Al,IMENTOS

Parn Obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

HERMOSil,LO, SONORA **JUNIO 2001**

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de Patricia Isabel Torres Chávez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias, con especialidad en Bioquímica de Proteínas.

Dra. Luz Vázquez Moreno
Directora de Tesis

Dra. Alma Rosa Islas Rubio

Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez

Dr. Gerardo Álvarez Manilla

Dr. Alfonso Gardea Vejar

Dr. Sergio Serna Saldivar

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe de la Dirección de Ciencia de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, 83000, México, para citas más completas o para la reproducción integra del documento para fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.

Atentamente

Patricia Isabel Torres Chávez

RECONOCIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora**, porque por medio de sus programas de superación académica, fruto del esfuerzo de muchas personas, permite que sus profesores e investigadores puedan prepararse para realizar más eficientemente sus funciones.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo**, al que sus investigadores han llevado a los niveles de excelencia que le permiten formar académicos con grado de doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca recibida para la realización de los estudios de doctorado.

Mi más sincero reconocimiento a la **Dra. Luz Vázquez Moreno**, directora de tesis, por su siempre acertada dirección y asesoría y principalmente por brindarme la oportunidad de esta experiencia única.

A la **Dra. Alma Rosa Islas**, miembro del comité de tesis, a quien agradezco en primera instancia su invitación a ingresar al programa de doctorado, además por su asesoría durante la realización de este trabajo.

A los miembros del comité de tesis, **Dr. Gerardo Alvarez Manilla, Dr. Sergio Serna Saldivar, Dr. Miguel Angel Martínez Téllez y Dr. Alfonso Gardea Vejar**, por su asesoría y comentarios, los cuales contribuyeron en gran medida a la realización del trabajo de investigación.

Al **Dr. Benjamín Ramírez Wong**, Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora, por el apoyo económico brindado para la realización de actividades como estancias, presentaciones en congresos, impresión y reproducción de manuscritos.

A el **Q.B. Roberto Flores, la M.C. Refugio Robles y la M.C. Alma Rosa Bustamante** por sus observaciones y sugerencias.

A la **M.C. Ana Irene Ledesma** de la Universidad de Sonora, por su ayuda con el análisis de calidad de muestras de trigo y análisis estadístico.

A los **Miembros de el Área de Reología** del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, por proporcionarme parte de las muestras de harinas que se usaron en el presente estudio y datos de calidad de éstas.

A la **M.C. Elizabeth Carvajal y M.C. Agustín Rascón** de CIAD Cuauhtemoc, por la ayuda con la microcalorimetría de proteínas.

Al **Dr. George Lookhart**. Investigador de la USDA en Manhattan Kansas, por recibirme en su laboratorio y permitir sin egoísmo que aprendiera las técnicas de punta de análisis de proteínas de cereales que se están desarrollando en su laboratorio. Lo mismo que a **Scott Bean**, por su paciencia y tiempo dedicado.

Al **Dr. Miguel Camacho** del INIFAP y al **M.C. Alfonso Álvarez** de la Universidad de Sonora, por la ayuda en la selección de las muestras de trigo.

A la **Q.B. Luz María Matuz** del Molino La Fama por su ayuda con análisis reológicos de masas.

A la **Dra. Isabel Silveira y al Dr. Mario Cortez** del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, así como al **Dr. Francisco Goycoolea** del CIAD.

Recibí apoyo de tantas personas que muy probablemente estoy dejando fuera a alguien en la lista de reconocimientos. Gracias.

DEDICATORIAS

A mi esposo

Benjamín Ramírez Wong

A la memoria de mi padres

Gustavo Adolfo Torres McCall
Maria Luisa Chávez Parra

A mis hijos

Flor, Gabriela y Benjamín Ramírez Torres

A mis otros hijos

Gaspar Méndez Celaya y Gasparcito Méndez Ramírez
Jemina Ayala Villarreal y Janeth Ramírez Ayala
Rafael Peralta Velásquez

Cuando han finalizado los demás ejercicios, se recoge su fruto con trabajo, pero en la filosofía el goce coincide con el conocimiento, pues no se disfruta después de haber aprendido sino el hecho de aprender y el placer existen al mismo tiempo.

Epicuro

CONTENIDO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS..... xiii

LISTA DE TABLAS..... xv

LISTA DE FIGURAS..... xvii

RESUMEN..... xxii

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO I, SÍNTESIS BIBLIOGRÁFICA..... 5

Proteínas de Gluten de Trigo..... 5

Constitución Genética de los Trigos Panaderos..... 5

Proteínas de Almacenamiento..... 6

Localización Cromosómica de los Genes de las Proteínas de Almacenamiento..... 8

Variación de la Proteínas de Almacenamiento y Calidad de Panificación..... 10

Interacciones Hidrofóbicas..... 14

Fuerzas Entrópicas..... 14

Efectos de Solvente..... 14

Efecto de Sales..... 15

Métodos para Medir Hidrofobicidad..... 16

CAPITULO II, SEPARACIÓN DE SUBUNIDADES DE GLUTENINAS USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERACCION HIDROFÓBICA EN AGAROSA ALTAMENTE ACETILADA..... 19

Resumen..... 19
Introducción..... 20
Materiales y Métodos..... 22
Extracción y Estabilización de Gluteninas..... 22
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica..... 23
Electroforesis..... 23
RP-HPLC..... 23
Resultados..... 24
Discusión..... 31

CAPÍTULO III, SEPARACIÓN DE GLIADINAS USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA EN AGAROSA ALTAMENTE ACETILADA..... 33

Resumen..... 33
Introducción..... 34
Materiales y Métodos..... 35
Extracción de Gliadinas..... 35
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica..... 36
Electroforesis..... 36
Cromatografía de Fase Reversa de Alta Presión..... 36
Resultados..... 36
Conclusiones..... 46

CAPÍTULO IV, ESTUDIO CALORIMÉTRICO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE GLIADINAS Y GLUTENINAS ESTABILIZADAS..... 50

Resumen..... 50
Introducción..... 51
Materiales y Métodos..... 52
Extracción de las Proteínas..... 52
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica..... 53

Electroforesis..... 53
Cromatografía de Fase Reversa de Alta Presión..... 54
Calorimetría..... 54
Análisis Estadístico..... 54
Resultados y Discusión..... 55
Gliadinas..... 55
Gluteninas Estabilizadas..... 60
Entalpía de las Transiciones..... 65
Conclusiones..... 65

CAPÍTULO V, TRANSICIÓN EN LA REGIÓN VÍTREA DE GLUTEN CONTENIDO BAJO DE HUMEDAD, DETERMINADA POR MICROCALORIMETRÍA Y RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE SUS PROTEÍNAS..... 67
Resumen..... 67
Introducción..... 68
Materiales y Métodos..... 70
Obtención del Gluten..... 71
Electroforesis Capilar..... 71
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica..... 73
Contenido de Proteína Polimérica Insoluble..... 74
Cromatografía de Exclusión Molecular..... 74
Temperatura de Transición Vítrea..... 75
Análisis Estadístico..... 75
Resultados..... 75
Temperatura de Transición Vítrea..... 75
Composición de Subunidades de Gluteninas de Masa Molecular Alta..... 80
Hidrofobicidad Superficial de Gluteninas Solubles..... 80
Tamaño Molecular..... 84

Discusión..... 91
Conclusiones..... 93

CAPÍTULO VI, CONTRIBUTION OF HYDROPHOBIC SOLUBLE GLUTEN PROTEINS, FRACTIONATED BY HYDROPHPOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY IN HIGHLY ACETYLATED AGAROSE, TO DOUGH RHEOLOGICAL PROPERTIES..... 95

CONCLUSIONES GENERALES..... 96

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO..... 98

REFERENCIAS..... 99

ANEXO

Datos de calidad de las harinas de las variedades de trigo Estudiadas..... 109

LISTA DE ABREVIATURAS

AAH	Asociación Agrícola Hermosillense.
ABS	Absorción farinográfica.
ANS	1-anilino-8-naftaleno.
A-PAGE	Electroforesis ácida en geles de poliacrilamida.
Å	Ángstrom.
Cm	Concentración de soluto en la fase móvil.
Cp	Capacidad calorífica.
Cs	Concentración de soluto en la fase estacionaria.
DT	Tiempo de desarrollo.
DTT	Ditiotreitol.
FZCE	Electroforesis capilar de zona libre.
G	Índice de hinchamiento, medido con el alveógrafo.
HA	Agarosa altamente acetilada.
HGLI	Índice de hidrofobicidad de gliadinas.
HGLUS	Índice de hidrofobicidad de gluteninas solubles.
HIC	Cromatrografía de interacción hidrofóbica.
HMW-GS	Subunidades de glutenina de masa molecular alta.
HMWGS-x	Subunidades de gluteninas de masa molecular alta tipo x.
HMWGS-y	Subunidades de gluteninas de masa molecular alta tipo y.
IDA	Ácido iminodiacético.
I-glutenins	Gluteninas insolubles.
I-GLUT	Cantidad de gluteninas insolubles extraídas.
INIFAP	Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.
IPP	Proteína polimérica insoluble.
kv	Kilovolts.
LMW-GS	Subunidades de gluteninas de masa molecular baja.
μJ	Microjouls.
P	Tenacidad, medida con el alveógrafo.
P/G	Simetría de la curva alveográfica.

PROT	Contenido de proteína (%).
PRT	Proteína extraída (%).
RP-HPLC	Cromatografía de fase reversa de alta presión.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida, desnaturalizante.
SE-HPLC	Cromatografía de exclusión molecular de alta presión.
S-glutenins	Gluteninas solubles.
S-GLUT	Cantidad de gluteninas solubles extraídas.
ST	Estabilidad de la masa, medida con el farinógrafo.
Tg	Temperatura de transición vítrea.
VY	Valle del Yaqui.
W	Fuerza de la masa medida con el alveógrafo.

LISTA DE TABLAS
Capítulos 1-5

Tabla		Página
I.	Calificación de Calidad (Score Glu 1) Asignado a Subunidades de Gluteninas de Masa Molecular Alta.....	12
II.	Distribución de Proteína en las Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	26
III.	Distribución de Proteína en las Diferentes Fracciones Cromatográficas, cuando las Gliadinas de las variedades de Trigo Oasis y Karl se Separaron por HIC.....	41
IV.	Proporción de Subclases de Gliadinas de Oasis en las Fracciones Cromatográficas, Determinada por Electroforesis Capilar.....	43
V.	Proporción de Subclases de Gliadinas de Karl en las Fracciones Cromatográficas, Determinada por Electroforesis Capilar.....	45
VI.	Temperatura y Calor de Desnaturalización de Gliadinas de Oasis Contenidas en Fracciones De cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	57
VII.	Proporción de las Subclases de Gliadinas de Oasis Eluídas en Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica y Analizadas por Electroforesis Capilar de Zona Libre.....	59
VIII.	Temperatura y Calor de Desnaturalización de Gluteninas de Oasis Contenidas en Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	64
IX.	Proporción de Gliadinas, Gluteninas Poliméricas Solubles y Gluteninas Poliméricas Insolubles de las Proteínas del Gluten.....	89

LISTA DE TABLAS
Capitulo 6

Table Página

I. Mean Values and Variation of Flour Quality Parameters of Wheat 95

II. Correlation Coefficients Between Dough Rheological Properties and Biochemical Characteristics of Gluten Proteins..... 95

III. Determination Coefficients for the Models and Partials for the Farinograph Variables..... 95

IV. Determination Coefficients for the Model and Partials for the Alveograph Variables..... 95

LISTA DE FIGURAS
Capítulos 1-5

Figura | Página

1. Representación esquemática de las subunidades de glutenina de masa molecular alta **x** y **y** (HMW-x y HMW-y, respectivamente), subunidades de masa molecular baja (LMW) gliadinas tipo γ y gliadinas tipo α..... 9

2. Variación alélica en subunidades de gluteninas de masa molecular alta y su relación con calidad de panificación..... 13

3. Perfil de elución en cromatografía de interacción Hidrofóbica de subunidades de gluteninas estabilizadas por alquilación..... 25

4. Subunidades de gluteninas separadas por Electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE)..... 27

5. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gluteninas estabilizadas de la variedad de trigo Oasis (A) y Karl (B) 28

6. Cromatogramas de gluteninas de las variedades de trigo Karl y Oasis, separadas por cromatografía de fase reversa de alta Resolución (RP-HPLC)..... 30

7. Separación de subclases de gliadinas en electroforesis ácida en geles de poliacrilamida (A-PAGE)..... 38

8. Perfil de elución de gliadinas de las variedades Karl y Oasis en cromatografía de interacción hidrofóbica..... 39

9. Electroforesis capilar de zona libre (FZCE) de fracciones de cromatografía de interacción Hidrofóbica (HIC) de gliadinas de Oasis..... 42

10. Electroforesis capilar de zona libre (FZCE) de Fracciones de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas de Karl..... 44

11. Cromatogramas de gliadinas de las variedades de trigo Karl y Oasis, separadas por cromatografía de fase reversa de alta presión (RP-HPLC)..... 47

12. Composición de la fracción no retenida de cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas, obtenida por electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE) de gliadinas..... 48

13. Composición (SDS-PAGE) de las proteínas que forman la fracción de gliadinas de las variedades 1) Karl y 2) Oasis eluídas con urea 8M en cromatografía de interacción hidrofóbica..... 49

14. Termogramas obtenidos con microcalorimetría de Barrido diferencial y deconvolución gausiana de fracciones de gliadinas de la variedad de trigo Oasis, separadas por cromatografía de interacción hidrofóbica..... 56

15. Composición (FZCE) de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas de Oasis..... 58

16. Composición (SDS-PAGE) de la fracción de cromatografía de interacción hidrofóbica, eluída con urea 8M de gliadinas de Oasis 61

17. Perfil de elución de gliadinas completas de Oasis analizadas por cromatografía de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC)..... 62

18. Termogramas obtenidos con microcalorimetría de barrido diferencial y deconvolución gausiana de fracciones de gluteninas de la variedad de trigo Oasis separadas por cromatografía de interacción hidrofóbica..... 63

19. Composición (SDS-PAGE) de las fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas de Oasis estudiadas por calorimetría de barrido diferencial..... 66

20. Diagrama de la experimentación. Determinación de transición vítrea del gluten y características químicas de sus proteínas..... 72

21. Primera derivada de los termogramas de gluten con un contenido de humedad de 8%, calentado de –20 a 110°C..... 76

22. Termogramas de gluten de trigo, obtenidos con microcalorimetría de barrido diferencial, recortado a partir de 30°C y la gráfica reescalada..... 78

23. Temperatura de la transición de segundo orden observada a baja temperatura en barridos calorimétricos de gluten con 4 y 8% de humedad..... 79

24. Separación de las proteínas de la fracción insoluble de gluteninas de 4 variedades de trigo con electroforesis capilar..... 81

25. Perfil de elución de gliadinas de 4 variedades de trigo en cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada y eludias en pasos con buffer de acetato de sodio 7mM, pH 3.6, con concentraciones crecientes de propanol..... 82

26. Perfil de elución de las gluteninas solubles en ácido 4 variedades de trigo en cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada y eludias en pasos con buffer de acetato de sodio 7mM, pH 3.6, con concentraciones crecientes de propanol..... 83

27. Índice de hidrofobicidad superficial (proteína eluída en las fracciones mas hidrofóbicas en HIC) de 4 variedades de trigo..... 85

28. Relación entre la pendiente (transición sub Tg/ contenido de humedad del gluten) e índice de hidrofobicidad de gluteninas solubles (HGLUS)..... 86

29. Separación de las proteínas solubles de trigo de 4 variedades de trigo por cromatografía de exclusión molecular de alta presión (SE-HPLC)..... 87

30 Relación de la temperatura de transición sub Tg medida con el calorímetro de barrido diferencial y proteína polimérica insoluble..... 90

LISTA DE FIGURAS
Capítulo 6

Figura | Página

1. Distribution of the values (mg/g) of extracted gliadins, soluble glutenins (s-glutenins) and Acid Insoluble glutenins (i-glutenins)..... 95

2. Hydrophobic interaction chromatography elution Profiles..... 95

3. Distribution of the estimated surface hydrophobicity Indexes of gliadins and soluble glutenins..... 95

4. A, surface hydrophobicity index of gliadins (HGLI) and surface hydrophobicity index of soluble glutenins on farinograph water absorption; B, insoluble polymeric protein (IPP) and surface hydrophobicity index of gliadins (HGLI) on dough farinograph stability..... 95

5. A, sedimentation value and surface hydrophobicity index of soluble glutenins (HGLUS) on swelling index (G); B, insoluble polymeric protein (IPP) and surface hydrophobicity index of gliadins on alveograph work of deformation (W)..... 95

RESUMEN

Con el fin de estudiar la hidrofobicidad superficial de las proteínas del gluten, se utilizó cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada (HA), una matriz de baja hidrofobicidad, sintetizada en el laboratorio. El buffer de equilibrio fue acetato de sodio pH 3.6 y la

elución se hizo en pasos incrementando las proporciones de propanol.

Se fraccionaron las subunidades de gluteninas y las gliadinas de dos variedades de trigo y las fracciones se analizaron por electroforesis

desnaturalizante y reductora y electroforesis capilar de zona libre,

respectivamente. Se encontró que la subunidad 10 presenta una gran

afinidad por la matriz. La alta hidrofobicidad de esta subunidad puede

ayudar a explicar su funcionalidad y su estabilidad a la desnaturalización química. El comportamiento de gliadinas en HIC difirió entre las variedades de trigo del cual provienen. Además, la proporción de subclases de gliadinas (α, β, γ y ω) entre fracciones fue cambiando al irse incrementando la concentración de propanol durante la elución. Proteínas pertenecientes a la subclase de gliadinas α-β mostraron mayor afinidad por la matriz que las otras subclases. Los resultados obtenidos para gliadinas y subunidades de gluteninas difiere del comportamiento de estas proteínas en cromatografía de fase reversa de alta presión (RP-HPLC).

Se fraccionaron también las gliadinas y gluteninas solubles en ácido acético de 20 variedades de trigo. Análisis de regresión múltiple con el

modelo lineal general y la técnica en pasos se usó para relacionar el índice de hidrofobicidad superficial con las propiedades reológicas de las masas. Los índices de hidrofobicidad superficial definidos para gliadinas y gluteninas solubles explicaron parte de la variabilidad del índice de hinchamiento, extensibilidad y fuerza de la masa medidos con el alveógrafo, explicaron también parte de la variabilidad en absorción de agua, medida con el farinógrafo, pero no mostraron ninguna relación con el tiempo de mezclado.

1:.dveógnifo, explicaron también p::irte de lrci variabilidad en absorción de 1:igua, niedida con el fadnógn1úJ, pero no mostraron ninguna relación con el tiempo de m.ezclado.

La combinación de las tócnicas, cn:imatogniJfo de interacción hidrofóbk:a y calorirr1etria de lx,rrido diferencial perrnitieron conocer de In rchición de las propiecfodes quimicHs, especialrnente hidnifobicid111d s11.pcrfici11J de las proteínas del gluten con sus prcipiedades l:errnodinámkas. Se deterrninanm las temperaturas de desnaturalización de gliadinu.s y subunidndes de gluteninas en solución, encontrándose una relación positiva entre las estabilidad térrnica e hidro!é.ibiddnd superficial de estas protd.1.rns.

Li:1 ngarosn ultnment:e rJcetilai.fa 1J1ostró ser una motriz útil para el estudio de la hidrofobicidad superfi.cial de las pnit:cín11s del gluten con c1.·omnt:ogniJfa de interacción hidrofóbica . Comparando los rcsuJtn.dos con los reportados previamente, HA mostró una mejor selectividad y cr,i.p¡:¡ddad de discrirninación que motrices cornerciales.

INTRODUCCIÓN

Los granos de los cereales proveen una gran proporción de la proteína consumida por el hombre y animales de granja. Además, la funcionalidad de las proteínas de almacenamiento, como en el caso del gluten de trigo ha sido clave para el desarrollo y la preparación de alimentos básicos en diferentes pueblos y culturas. En el trigo y otros cereales, las proteínas de almacenamiento han evolucionado para cumplir un papel totalmente diferente al que el hombre les ha asignado, como es el de servir de reserva de nitrógeno para cubrir las necesidades de la nueva planta durante la germinación y las primeras etapas del desarrollo. Coherente con su función de reserva, las proteínas de almacenamiento tienen en su composición de aminoácidos gran proporción de amidas, glutamina y/o asparagina (Spencer 1984).

Las proteínas de almacenamiento de los cereales son muy numerosas; además, como resultado de la duplicación de genes, se tiene la presencia de grupos fuertemente unidos dentro del genoma (Bietz y Kruger 1994). Los genes resultantes expresan un gran número de proteínas altamente homólogas. En trigo, esta complejidad se incrementa por la poliploidia, triplicando potencialmente el número de proteínas presentes.

Al fraccionar estas proteínas se produce un patrón o huella dactilar que es altamente específico para cada genotipo. Por lo que el análisis de estas proteínas puede ser usado para identificar variedades o líneas en forma más precisa de lo que es posible a través del análisis de su fenotipo (Bietz y Kruger 1994).

Las principales proteínas del gluten de trigo, gliadinas y gluteninas, tienen como característica importante su baja solubilidad y sus propiedades de agregación. Gliadinas y gluteninas son prolaminas (Shewry y Col. 1992) en la clasificación de Osborne (1907) y por lo tanto son solubles en soluciones alcohólicas. Además, las gluteninas ocurren como polímeros lo que reduce también su solubilidad en alcohol. Las proteínas del gluten tienen en su composición a los aminoácidos prolina, glutamina y glicina en gran proporción. La presencia de los aminoácidos hidrofóbicos y de glutamina hace posibles las interacciones hidrofóbicas y la formación de puentes de hidrógeno, respectivamente (MacRitchie 1992). Además las moléculas de glutenina contienen cisteínas en las regiones carboxi y aminoterminales que pueden formar enlaces disulfuro entre proteínas (Shewry y Tatham 1997) .

Además de la heterogeneidad, las características de agregación y baja solubilidad de estas proteínas hacen difícil su estudio. Es necesario el uso de solventes orgánicos, ácidos o bases, desnaturalizantes, o detergentes para poder romper las interacciones no covalentes (Bietz y Kruger 1994). La mayoría de las técnicas se han desarrollado para el estudio de proteínas solubles y éstas no se pueden aplicar directa y fácilmente al estudio de las proteínas del gluten. Esto ha hecho que los avances en el conocimiento de la estructura de estas proteínas no esté a la par del que se tiene de las proteínas solubles.

La hidrofobicidad de las proteínas del gluten se ha estudiado usando sondas hidrofóbicas (Greene y Kasarda 1971, Popineau y Pineau 1987), cromatografía de fase reversa de alta presión (Van Lonkhuijsen 1992, Huebner y Bietz 1994, Burnouf y Bietz 1985) y cromatografía de interacción hidrofóbica usando octil y fenil-Sefarosa (Caldwell 1979, Chung y Pomeranz 1979, Popineau y Godon 1982, Popineau y Pineau 1987, Magnus y Khan 1992). Se ha encontrado que la hidrofobicidad varía

grandemente entre clases y subclases de proteínas y en general, las gluteninas son más hidrofóbicas que las gliadinas. En los estudios en donde se usó cromatografía de interacción hidrofóbica, se concluyó que las proteínas de gluten de trigos de buena calidad panadera son más hidrofóbicas que aquellas de menor calidad.

En el presente estudio se empleó agarosa altamente acetilada para estudiar la hidrofobicidad superficial de las proteínas del gluten y relacionarla con propiedades funcionales y de calidad de trigo.

Hipótesis: Las cadenas cortas de baja hidrofobicidad de los grupos acetilo unidos a agarosa y la alta densidad de sustitución, hacen de la agarosa altamente acetilada una matriz apropiada para estudiar la hidrofobicidad superficial de las proteínas del gluten. Mas contactos de baja intensidad proporcionarán una mejor selectividad en cromatografía de interacción hidrofóbica. Además, la hidrofobicidad superficial, siendo parcialmente responsable de las propiedades de agregación de las proteínas del gluten, se relaciona con sus propiedades funcionales y consecuentemente con la calidad de los trigos panaderos. Estas hipótesis fueron probadas en los diferentes capítulos que comprenden esta tesis.

El trabajo de tesis consta de 6 capítulos. En el primero se hace una síntesis bibliográfica que trata de las características de las proteínas del gluten y de las interacciones hidrofóbicas, ya que éstas son importantes en la definición de las propiedades de agregación de las proteínas de gluten. El segundo y tercer capítulo tratan de la separación de gluteninas y gliadinas por cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada. Se hizo buscando una alternativa de fraccionación basada en hidrofobicidad, distinta a las utilizadas hasta el momento. Se encontró que los resultados de los trabajos coinciden con información

reciente sobre interacción no covalente y estabilidad de proteínas de gluten (Ornebro y Col. 1999, Lafiandra y Col. 1999).

El cuarto capítulo es un estudio de desnaturalización o desdoblamiento de estructura remanente de gliadinas y gluteninas estabilizadas. El uso de una técnica calorimétrica de alta sensibilidad, junto con deconvolución gausiana del termograma, hizo posible que se lograran identificar algunas temperaturas de desnaturalización en el rango de 45 a 85°C, siendo esta información la primera reportada para proteínas de gluten en solución. El quinto capítulo es un estudio calorimétrico de la transición vítrea del gluten con contenidos bajos de humedad. Se detectó una transición a temperaturas más bajas que la temperatura de transición vítrea y se relacionó con las características químicas, especialmente hidrofobicidad superficial de las proteínas del gluten.

Se observó en estudios preliminares una clara relación de las fracciones más hidrofóbicas de las proteínas separadas por cromatografía de interacción hidrofóbica con propiedades reológicas de las masas, por lo que se decidió estudiar un número mayor de muestras, resultados que se presentan en el sexto capítulo. En este último capítulo, se definió un índice de hidrofobicidad superficial de gliadinas y gluteninas solubles, de acuerdo al comportamiento de estas proteínas en cromatografía de interacción hidrofóbica. Este índice se relacionó con características reológicas de las masas y de calidad de trigos panaderos, usando la técnica estadística de regresión múltiple con selección de variables.

Por último, se enumera lo que en opinión del autor son las contribuciones más importantes del trabajo de investigación al conocimiento científico.

CAPÍTULO I

SÍNTESIS BIBLIOGRÁFICA

Proteínas de Gluten de Trigo

Constitución Genética de los Trigos Panaderos

Los trigos panaderos (*Triticum aestivium*) son hexaploides, contienen tres genomas diploides diferentes llamados AA, BB y DD. Los tres genomas están muy relacionados y se sabe que los donadores originales de los genomas fueron especies diploides de *Triticum* y *Aegilops* (Riley 1965). Cada genoma consiste de siete pares de cromosomas, dando un total de 21 pares en el núcleo. A cada par de cromosoma se le da un número seguido de una letra, la letra se refiere al genoma del cual el par es heredado. A los cromosomas de los diferentes genomas que son genéticamente similares u homólogos entre ellos se les da el mismo número; por ejemplo, cromosoma 1A, 1B y 1D. Los genomas A, B y D codifican juegos de proteínas de almacenamiento que son distinguibles entre ellos por electroforesis, debido a las mutaciones que han sufrido sus genes estructurales y la divergencia resultante de los ancestros (Payne y Col. 1984).

Como los cromosomas de los trigos hexaploides están triplicados, las deleciones parciales o totales de un cromosoma generalmente no son letales, por que los genes esenciales en los cromosomas eliminados están también presentes en sus homólogos (Payne y Col. 1984). Las líneas aneuploides (caracterizadas por faltarles parte del material genético) han sido de valor invaluable en el análisis genético de las proteínas de almacenamiento, particularmente en el estudio de la localización y ligamiento de los genes (Sears 1954).

Proteínas de Almacenamiento

Se reconocen generalmente dos grupos de proteinas de almacenamiento en trigo: gliadinas y gluteninas, aunque su composición puede cambiar de acuerdo a la forma en que se extraen. Basados en la clasificación de Osborne (1907), el grupo de gliadinas se define como el grupo de proteínas solubles en etanol al 70% a temperatura ambiente y el grupo de gluteninas como las que son insolubles en soluciones alcohólicas, pero solubles en medios disociantes como mezclas de ácido acético diluido, urea y detergentes iónicos. Se prefiere, sin embargo, clasificar a estos grupos de proteinas de acuerdo a su estado de agregación y no a su solubilidad. Las gliadinas son un grupo de polipéptidos monoméricos, mientras que las gluteninas son polimeros de subunidades que están unidas principalmente por medio de enlaces disulfuro. Para esta clasificación, gliadinas y gluteninas se separan efectivamente por cromatografía de exclusión molecular (MacRitchie 1992).

La composición de gliadinas y gluteninas de trigo es similar, contienen cantidades relativamente altas de ácido glutámico en forma amidada y de prolina. Las gliadinas contienen más prolina y menos glicina que las gluteninas. La principal diferencia entre ellas, es la capacidad de las gluteninas de polimerizar a través de enlaces disulfuro (MacRitchie 1992).

Las proteinas de gluten tienen como característica distintiva sus propiedades de agregación, la presencia de residuos de glutamina favorecen la interacción entre polipéptidos a través de puentes de hidrógeno, asi mismo la presencia de aminoácidos con residuos hidrofóbicos permiten la interacción hidrofóbica. Sin embargo, son principalmente los enlaces covalentes (disulfuro) entre subunidades de gluteninas los que definen en gran medida la agregación y propiedades elásticas del gluten (MacRitchie y Col. 1990).

Las gluteninas en su estado nativo no se resuelven por electroforesis. Las moléculas grandes o no entran al gel o forman un barrido cercano al origen. Después de la reducción de los enlaces disulfuro con mercaptoetanol o ditiotreitol se observan cuatro grupos de subunidades. A el grupo de subunidades de gluteninas que muestra la mas baja movilidad se les llama subunidades de peso molecular alto o A. Sus masas moleculares estimadas por SDS-PAGE están en el rango de 80 000 a 120 000, aunque otras estimaciones, como la obtenida por secuenciación de aminoácidos muestran un rango menor (60 000 a 90 000), (Anderson y Col. 1988). A las subunidades de gluteninas restantes se les llama gluteninas de bajo peso molecular y se clasifican a su vez como B y C, siendo el último grupo el de más alta movilidad. Las gluteninas de peso molecular bajo se traslapan con las gliadinas cuando se analizan por SDS-PAGE, por lo que es necesario remover estas proteínas monoméricas antes de el análisis de gluteninas. Existe además una región en el electroforegrama llamada D, en donde se pueden encontrar las gliadinas ω y las gluteninas D (Masci y Col. 1993, Kasarda y Col. 1998).

Cuatro grupos de gliadinas se distinguen cuando se separan por electroforesis ácida en gel de poliacrilamida (APAGE). Estas son α, β, γ y ω en orden decreciente de movilidad y por lo tanto creciente en tamaño molecular. Esta nomenclatura se basa en la movilidad de las gliadinas en geles de almidón a pH 3. Las gliadinas ω, el grupo de más alto peso molecular son las prolaminas pobres en azufre (Shewry y Col. 1986). Estas gliadinas ω se separan de las otras gliadinas en SDS-PAGE, mientras que se observa un traslape entre las gliadinas α, β y γ. Las gliadinas presentan enlaces disulfuro, pero estos son aparentemente intramoleculares (MacRitchie 1992).

El conocimiento que se tiene de la estructura de las gliadinas y gluteninas proviene del conocimiento de la secuencia de sus aminoácidos (Anderson y Col. 1988, Anderson y Greene 1989, Shewry y Tatham 1997),

estudios espectroscópicos, viscométricos (Tatham y Col. 1990), y de microscopía (Shewry y Col. 1997, Humphris y Col. 2000). Las gliadinas y gluteninas están formadas por una región repetitiva (Fig 1) y en el caso de las gluteninas dos regiones no repetitivas en las regiones amino y carboxi terminales. La región repetitiva comprende hexapéptidos y nonapéptidos (en las subunidades x) y regiones tripeptídicas. Las diferencias en el tamaño molecular de la subunidad resulta en la variación de la región repetitiva. Estudios espectroscópicos de la región repetitiva muestran la presencia de diferentes tipos de giros β. La forma de bacilo formada por la región repetitiva es coincidente con una espiral basada en giros β. Las regiones carboxi y amino terminales no repetitivas pueden ser globulares (Shewry y Col. 1992).

Localización Cromosómica de los Genes de las Proteínas de Almacenamiento

La electroforesis ácida (pH de 3.2) en geles de almidón, la electroforesis ácida en geles de poliacrilamida, la electoforesis en dos dimensiones, el enfoque isoeléctrico, y la electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE) junto con el uso de líneas de trigo aneuploides fueron los métodos que se utilizaron para conocer la localización cromosomal de los genes de estas proteínas (Payne y Col. 1984). Los genes de las subunidades de masa molecular alta se encuentran en el brazo largo de los cromosomas 1A, 1B y 1D. (Payne y Col. 1984). Estos *loci* se designan *Glu-A1, Glu-B1* y *Glu-D1,* respectivamente. Estudios electroforéticos han mostrado que existe un polimorfismo en el número y movilidad de las subunidades de peso molecular alto en diferentes variedades de trigo. Esto es que los genes en el brazo largo del cromosoma 1 muestran alelismo múltiple. Las subunidades se catalogan por la nomenclatura introducida por Payne y Lawrence (1983). Basados en estudios electroforéticos , Payne y Col. (1981) propusieron dos tipos principales de subunidades , las tipo x y las tipo y, siendo las primeras de

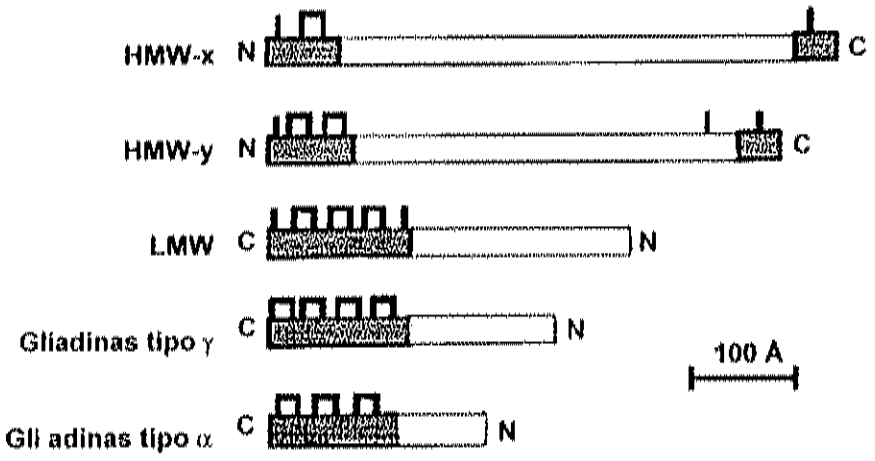

Fig. 1. Representación esquemática de las subunidades de glutenina de masa molecular alta **x** y **y** (HMW-x y HMW-y, respectivamente), subunidades de masa molecular baja (LMW), gliadinas tipo γ y gliadinas tipo α. Áreas sombreadas, sequencia única; areas blancas, secuencias repetitivas; barras negras, enlaces disulfuro intermoleculares; barras unidas, enlaces disulfuro intramoleculares. Fuente: Kasarda (1990). Nota: Figura incluida con permiso del autor.

peso molecular relativamente más alto. Una subunidad en particular se nombra por su cromosoma, seguido por su clasificación x o y, finalmente el número que designa la subunidad. Así, la variedad "Chinese Spring", en la cual se han realizado la mayoría de los estudios genéticos tiene la composición de gluteninas de peso molecular alto como sigue: 1Bx7, 1By8, 1Dx2, 1Dy12 (siendo nulo el locus *Glu-A1*), (MacRitchie 1992).

Los genes de las subunidades de gluteninas de masa molecular baja y los de las gliadinas ω, γ y de algunas de las gliadinas β se encuentran en el brazo corto de los cromosomas 1A, 1B y 1D y los genes de las gliadinas α, β y algunas de las gliadinas γ se encuentran en el brazo corto de los cromosomas 6A, 6B y 6C (Payne y Col. 1984).

Variación de las Proteínas de Almacenamiento y la Calidad de Panificación de los Trigos

El trigo presenta como característica única entre los cereales su capacidad de formar una masa viscoelástica que es la que permite la preparación de los diferentes productos de panificación. Las características reológicas de las masas, principalmente las relacionadas con fuerza y extensibilidad se reflejan en la calidad de los productos finales, especialmente el pan. Al ser lavada la masa con agua, hasta remover la mayor parte del almidón, queda el gluten, material proteináceo que es el responsable de la viscoelasticidad de la masa. El principal componente del gluten es proteína y de las proteínas las que conforman la mayor proporción son las de almacenamiento, gliadinas y gluteninas. Se ha relacionado a las gliadinas como responsables del componente viscoso y a las gluteninas con la elasticidad de las masas (MacRichie 1992).

Siendo el gluten una mezcla tan compleja de proteínas, es la interacción entre ellas la que define sus características viscoelásticas. Sin embargo, se ha logrado relacionar la presencia de ciertas proteínas

específicas en una variedad de trigo con la calidad de panificación, principalmente subunidades de gluteninas de masa molecular alta y en cierta medida algunas gliadinas.

El problema para relacionar gliadinas específicas con características de calidad y poder verificar estas relaciones, ha sido la diferencia en nomenclatura en los diferentes laboratorios (Skerrit 1998). Se ha usado cromatografía de alta presión en fase reversa (RP-HPLC) para relacionar composición de gliadinas y calidad. Van Lonkhuijsen y Col. (1992) encontraron una relación negativa entre tres fracciones (picos) de ω gliadinas y una positiva entre una γ gliadina y volumen de pan. Huebner y Col. (1997) también obtuvieron una relación significativa entre las cantidades de una γ gliadina y el volumen de pan. Algunos estudios han relacionado algunas gliadinas con la fuerza de la masa, pero en realidad éstos han sido indicadores y no responsables de la característica (Cressey y Col. 1987).

En el caso de las subunidades de gluteninas de masa molecular alta, Payne y Col. (1981) examinaron la progenie de seis cruzas, estimando la calidad de panificación con el volumen de sedimentación como índice. Los resultados enfocaron la atención a las subunidades 5 + 10 (heredadas siempre juntas) como asociadas con una mejor calidad y superior en este aspecto a las subunidades 2 +12. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en estudios que incluyeron panificación. Los estudios de Payne y Col. (1981) y Payne (1987) permitieron formalizar la relación de la composición de las subunidades de gluteninas de peso molecular alto en forma de una calificación de calidad (Glu 1 score), (TABLA I) y en cuadro en donde se ordenan las subunidades en función del efecto del alelo en la calidad panadera (Fig. 2).

TABLA I

Calificación de Calidad (Score Glu 1) Asignado a Subunidades de Gluteninas de Masa Molecular Alta

Calificación	Cromosoma		
	1A	1B	1D
4	...	...	5+10
3	1	17+18	...
3	2*	7+8	...
3	...	13+16	...
2	...	7+9	2+12
2	...	...	3+12
1	Nulo	7	4+12
1	...	6+8	...
1	...	20	...

Nota: Para obtener la calificación Glu 1, se suman las calificaciones señaladas en la tabla por la presencia de las subunidades de masa molecular alta.

Fuente: MacRitchie y Col. (1990).

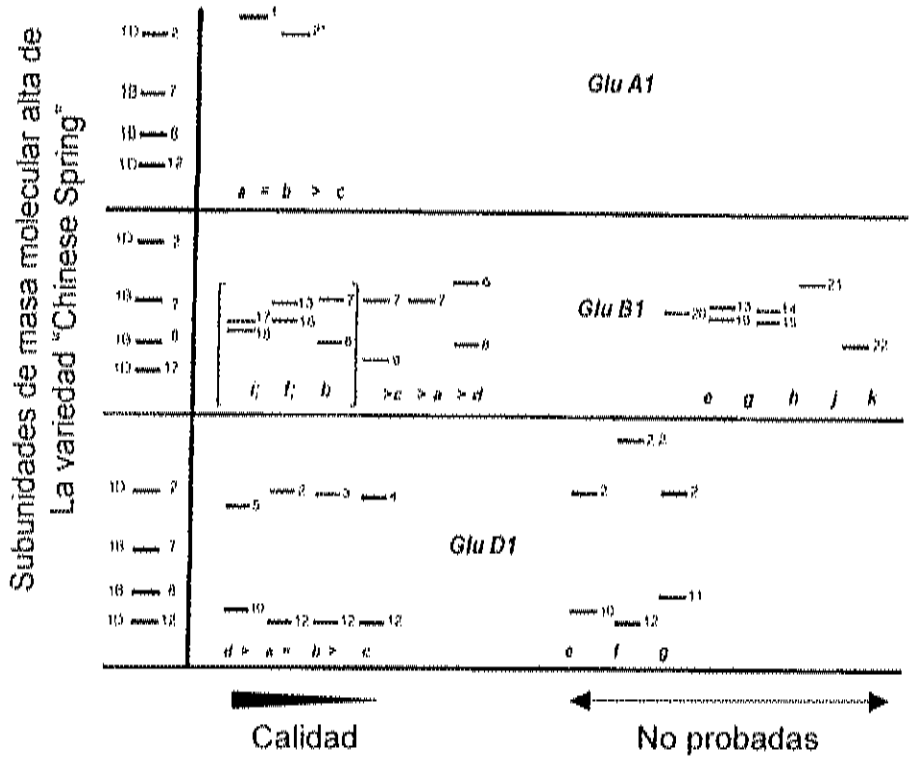

Fig. 2. Variación alélica en subunidades de gluteninas de masa molecular alta y su relación con calidad de panificación. Las subunidades se fraccionaron por SDS-PAGE. En el lado izquierdo se encuentran las subunidades de masa molecular alta estándar de la variedad "Chinese Spring". Las subunidades se separaron en tres grupos de acuerdo a los genes que las controlan: 1A, 1B, 1D. La letra que está debajo de cada grupo alélico, representa la designación alélica. Fuente: Payne y Col. (1984).
Nota: Figura incluida con permiso del autor.

Interacciones Hidrofóbicas

Hay dos escuelas de pensamiento para interpretar el fenómeno hidrofóbico. Una explica la interacción hidrofóbica como fuerzas entrópicas (Tanford 1980), mientras que otra la explica como una forma especial de atracción de van der Waals cuando las moléculas se colocan en algún solvente (Van Oss y Col. 1986) .

Fuerzas Entrópicas

El efecto hidrofóbico surge de las interacciones no favorables entre moléculas de agua y los residuos no polares de una proteína. Cuando una molécula de hidrocarburo se introduce en agua, ésta induce cambios en la estructura del agua, reduciendo su entropía. Para minimizar este cambio desfavorable de entropía, las moléculas se forzan a coalescer juntas formando gotas o glóbulos. En el caso de la proteína, ésta se ve forzada a doblarse en una estructura micelar con los residuos hidrofóbicos hacia dentro y los hidrofílicos hacia fuera.

La remoción de los residuos no polares del contacto con el agua hace una contribución mayor a la energía de estabilización conformacional. Así, en la teoría del efecto hidrofóbico, éste es puramente el resultado de la fobia del agua al contacto con los hidrocarburos, no es debido a la afinidad mutua entre las cadenas no polares a través de las fuerzas de van der Waals.

Efectos de Solvente

Nakai (1988), haciendo un tratamiento teórico del comportamiento de macromoléculas en solución y usando el modelo de enrejado (Lattice) aplicado por Flory and Huggins, junto con el coeficiente de Hamaker, llegó a las siguientes conclusiones. La fuerza neta debida a las fuerzas de

dispersión es siempre atractiva si las partículas son del mismo material. Además, el agua puede interactuar con los materiales no polares únicamente por dispersión. Consecuentemente, la contribución de orientación e inducción es insignificante. Por lo que las fuerzas de dispersión hacen una contribución importante a la interacción de materiales no polares en agua.

Dos materiales no polares van a desarrollar mayores fuerzas de atracción de van der Waals entre ellos, cuando el medio en que se encuentran es agua, que cuando el medio es no polar.

Efecto de Sales

De acuerdo a Melander y Horvath (1977), la solubilidad de proteínas en soluciones de sal de cierta molaridad, puede expresarse en función de el cambio neto de energía debido a las interacciones electrostáticas, de la superficie no polar, que es también la reducción del área de la proteína por agregación y el incremento de la tensión superficial debido a la sal. El primer término (interacción electrostática) es función de la sal.

Las sales han sido tradicionalmente ordenadas en la serie de Hofmesiter (liotrópica) de acuerdo a su habilidad de precipitar proteínas. El efecto de sales en la polimerización de agregados de proteínas puede describirse cuantitativamente en términos de los incrementos molares de tensión superficial. Melander and Horvath (1977) propusieron que la tensión superficial de las sales representa cuantitativamente las series liotrópicas empíricas que regularon la asociación y disociación de las moléculas de proteína.

El fuerte campo eléctrico de los cationes, junto con su tendencia de asociarse con los átomos de oxígeno, resulta en el rompimiento de la estructura normal del agua en la presencia de éstos. Las estructuras tridimensionales que resultan de la fuerte orientación de las moléculas del

agua hacia los cationes, forma una estructura que es más organizada que la estructura normal del agua. Cationes y aniones juntos, forman una estructura de iones múltiples, más organizada, que tiene más enlaces de hidrógeno que el agua normal. Por lo tanto, las moléculas de agua se mantienen unidas por fuerzas de orientación, inducción y de dispersión y la solución se caracteriza por una tensión superficial mayor.

Por el contrario, los aniones grandes, debido a su tamaño, rompen la estructura normal del agua pero son incapaces de formar sus propios ensambles, debido a que el campo eléctrico es débil. El rompimiento de estructura ocurre también cuando los iones como el tiocianato de guanidina consistentemente promueven ensambles bidimensionales, en lugar de los tridimensionales del agua pura. Así, las soluciones de iones que rompen estructura tendrán más ensambles bidimensionales y se caracterizarán por una tensión superficial más baja (Melander y Horvath 1977).

Métodos para Medir Hidrofobicidad

Una revisión extensa y un análisis crítico de los métodos para una estimación cuantitativa de la hidrofobicidad de proteínas en alimentos se puede encontrar en Nakai (1988). La información vertida a continuación es un resumen de lo ahí publicado, con algunas adiciones resultantes de la experiencia obtenida.

Una forma de predecir la hidrofobicidad de una proteína es a través del uso de escalas de hidrofobicidad de aminoácidos. Las escalas publicadas pueden dividirse en dos grupos, aquellas derivadas de mediciones de solubilidad y aquellas calculadas empíricamente por la estructura molecular. Generalmente los dos tipos de escalas concuerdan. Cuando se observan desviaciones, éstas son debidas a la presencia de residuos hidrofóbicos en la superficie y a que los residuos hidrofóbicos están escondidos en la proteína.

Se ha utilizado también la fluorescencia intrinseca y la extinción de fluorescencia para investigar la relación entre proteínas y lipidos. Estos métodos miden el comportamiento de los residuos aromáticos en las moléculas de proteinas y no se relacionan directamente a la hidrofobicidad total de las proteinas.

Las sondas hidrofóbicas , especialmente 1-anilinonaftaleno-8-sulfonato (ANS) son las más utilizadas para estimar la hidrofobicidad superficial de proteinas. El método se basa en la regla de que la emisión de fluorescencia depende críticamente del ambiente. Mientras que son muy fluorescentes en un solvente no polar, las emisiones de fluorescencia se extinguen considerablemente en agua. Otra sonda es el ácido cis-parinárico (CPA), útil para el estudio de fluidez de membranas, por su caracteristica similar a los ácidos grasos que ocurren naturalmente. Otra sonda hidrofóbica es el 2-p-toluidilnaftaleno-6-sulfonato (TNS).

La cromatografía hidrofóbica en sus dos versiones fase reversa e interacción hidrofóbica es útil para el estudio de la hidrofobicidad de las proteinas, pero los resultados que se obtienen con cada una de ellas son diferentes.

En la cromatografía de partición, el coeficiente de partición (k) es el principal factor que contribuye a la separación cromatográfica, siendo k= Cs/Cm, en donde Cs y Cm son las concentraciones de soluto en las fases estacionaria y móvil respectivamente. Un soluto con coeficiente de partición alto en cromatografía hidrofóbica se puede considerar que es hidrofóbico, mientras que un soluto con un coeficiente bajo se considera hidrofílico.

El que se hayan podido unir cadenas de grupos alquilo de diferente longitud y grupos arilo a los materiales para cromatografía hizo que la cromatografía de fase reversa se convirtiera en un método útil para la separación de compuestos. Para eluir solutos, la polaridad de los eluentes

se reduce, incrementando la proporción de solventes no polares miscibles en el eluente acuoso. En el caso de proteínas, para eluir los compuestos y evitar la desnaturalización por el uso de solventes orgánicos, se reduce la fuerza iónica reduciendo la concentración de sal en el eluente; a esta técnica se le llama cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

Los resultados que se obtienen con cromatografía de fase reversa de péptidos, concuerdan con los valores de hidrofobicidad calculados por la composición de aminoácidos. En el caso de proteínas completas es más complicado. Las condiciones de cromatografía de fase reversa son generalmente desnaturalizantes. La dureza de la matriz, la densidad de substitución de las cadenas de alquilo y la naturaleza orgánica de los eluentes hace que las proteínas se desnaturalicen. En el caso de cromatografía de alta resolución de fase reversa para separar gliadinas y gluteninas, existe una condición desnaturalizante extra. Estas proteínas requieren de temperaturas relativamente altas (70°C) para separarse (Bietz y Cobb 1985).

En otro método para estimar la hidrofobicidad, se mide la capacidad de una proteína de unir el compuesto hidrofóbico. Entre los métodos que se basan en la unión hidrofóbica, tenemos los que usan hidrocarburos, dodecil sulfato de sodio (SDS) o triglicéridos, todos ellos han demostrado ser útiles, especialmente el método que utiliza triglicéridos, para proteínas de alimentos (Nakai 1988).

CAPÍTULO II

SEPARACIÓN DE SUBUNIDADES DE GLUTENINAS USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

Resumen

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es útil para el estudio de la hidrofobicidad superficial de las proteínas de gluten y para detectar cambios en conformación. La adsorción en fases estacionarias hidrofóbicas débiles depende de los residuos de aminoácidos accesibles y la interacción matriz-proteína produce únicamente cambios sutiles y reversibles. Las subunidades de glutenina de dos trigos hexaploides, extraídas con 50% propanol conteniendo β-mercaptoetanol como agente reductor y estabilizadas por alquilación con 4- vinil-piridina, se fraccionaron por cromatografía de interacción hidrofóbica con agarosa altamente acetilada como matriz hidrofóbica y acetato de sodio a pH 3.6 como *buffer* de equilibrio. La elución se llevó a cabo en pasos, incrementando las concentraciones de propanol. El polimorfismo conformacional se dedujo por el comportamiento cromatográfico de las subunidades, evaluado a través del análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones cromatográficas. Se observaron diferencias entre las subunidades de gluteninas de alto y bajo peso molecular, así como las subunidades tipo x y tipo y. La subunidad de glutenina de masa molecular alta 10 mostró mayor afinidad por la matriz hidrofóbica que la subunidad 5 y fueron separadas en diferentes fracciones. El polimorfismo conformacional mostrado por las subunidades de glutenina, puede ser una consecuencia de su estabilidad relativa inicial y es importante que se

considere cuando se estudie la funcionalidad de los polímeros de glutenina.

Introducción

La importancia de la funcionalidad de las gluteninas en trigos panaderos ha sido probada más allá de cualquier duda. La composición de las gluteninas de peso molecular alto se ha relacionado con calidad en gluten. La presencia del par de alelos 5+10 se ha encontrado o ha sido frecuentemente observado en trigos de buena calidad panadera, mientras que las subunidades 2+12 en trigos de baja calidad (Payne y Col.1979). El polímero de glutenina y el polímero insoluble de glutenina han sido relacionados con fuerza de la masa y tenacidad respectivamente (MacRitchie 1992). El entrecruzamiento a través de los enlaces disulfuro, la formación de enlaces de hidrógeno adicionales por la gran cantidad de glutamina presente en su composición y las interacciones hidrofóbicas le confieren a estas moléculas sus propiedades de agregación y propiedades funcionales.

El efecto mejorador de la presencia de las subunidades 5+10 ha sido explicado con la presencia de una cisteína extra en la región amino terminal de la subunidad 5, que le confiere a esta subunidad una capacidad mayor de polimerizar (D'Ovidio y Col. 1997). Otra hipótesis ha sido el patrón más regular de giros β en la región repetitiva de la subunidad 10, lo cual le proporciona mejores propiedades elásticas a esta subunidad (Shewry y Col. 1992).

La presencia de varias formas de la misma proteína ha sido reportada anteriormente para subunidades de glutenina. Con la finalidad de detectar polimorfismo conformacional, Lafiandra y Col. (1999) estudiaron el comportamiento de las subunidades de masa molecular alta

tipos **x** y **y** en electroforesis de poliacrilamida con un gradiente transversal de urea. Las diferencias entre los dos tipos de subunidades sugiere la presencia de varios intermediarios de diferente conformación en las subunidades tipo **x**. En el mismo trabajo, Lafiandra y Col. (1999), mostraron un comportamiento diferente de la subunidad 10 en relación a las otras subunidades de glutenina de masa molecular alta; la subunidad 10 mostró ser más estable a la desnaturalización química.

El estudio de la hidrofobicidad superficial de las subunidades de glutenina estabilizadas, puede ayudar a entender el papel de las interacciones no covalentes en la funcionalidad de estas proteínas. Las cromatografías de interacción hidrofóbica (HIC) y de fase reversa de alta presión (RP-HPLC) han sido utilizadas para estudiar la hidrofobicidad de gluteninas. Debido a la alta hidrofobicidad de la matriz, los *buffer* utilizados y las altas temperaturas de análisis necesarias para el análisis de las proteínas de gluten, RP-HPLC puede considerarse como una técnica que desnaturaliza las proteínas. La hidrofobicidad estimada con RP-HPLC correlaciona con la hidrofobicidad calculada a través de la composición de aminoácidos. Se piensa que es la cadena extendida la que interacciona con la matriz. Por el contrario, HIC es una técnica que no desnaturaliza debido a la baja hidrofobicidad de las matrices. Únicamente los aminoácidos accesibles, aquellos que están en la superficie son los que interaccionan. Esta técnica es capaz de detectar cambios sutiles en conformación (Popineau 1994).

Magnus y Khan (1992) fraccionaron subunidades de gluteninas estabilizadas usando fenil-Sefarosa. Ellos encontraron que las subunidades de glutenina de variedades de trigo de mejor calidad fueron más hidrofóbicas.

El objetivo del presente trabajo fue fraccionar y estudiar la hidrofobicidad superficial de las subunidades estabilizadas de glutenina usando HIC en agarosa altamente acetilada.

Materiales y Métodos

Trigos

Se usaron harinas de las variedades de trigo Oasis del grupo 1 (gluten fuerte, Norma Oficial Mexicana NMX-ff-036-1996-SCFI) cosechado en 1998, así como la variedad Karl 92, trigo rojo fuerte invernal, cosecha 1996.

Extracción y Estabilización de Gluteninas

Con el fin de remover las proteínas solubles, cuatro viales conteniendo 250 mg de harina se extrajeron con 1 ml de 50% propanol. Las muestras se agitaron continuamente por 5 min, usando un agitador vortex equipado para contener 30 viales (Vortex Genie2, Scientific Industries, Bohemia, NY) y se centrifugaron posteriormente en una centrífuga Eppendorf 5415C a 8160 x g por 2 min. La remoción completa de las proteínas solubles se hizo con tres extracciones (Bean y Col. 1998). Las gluteninas se extrajeron del *pellet* resultante con 1 ml de 50% propanol conteniendo 5% β mercaptoetanol, agitando por 30 min con el equipo y condiciones mencionadas anteriormente. Las gluteninas se estabilizaron por alquilación con 4 vinilpiridina. La solución de alquilación contenía urea 4 M, 25% propanol y 50% vinilpiridina (Lew y Col. 1992). Se usaron para alquilar, 50 µl de la solución alquilante por cada 500 µl del extracto.

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada se usó para fraccionar las gluteninas estabilizadas. La matriz se sintetizó en el laboratorio, usando agarosa entrecruzada (6B, Pharmacia; Upsala, Suecia), anhidrido acético y piridina (Vázquez-Moreno y Col. 1992). Se usaron 5 ml de matriz en una columna de 1.5 cm de diámetro. El *buffer* de equilibrio fue acetato de sodio, pH 3.6. El flujo de los *buffer* fue de 0.5 ml/min. Las proteínas se alimentaron a la columna en cantidades de 30 mg (6 mg de proteína por ml de matriz). La elución se realizó por pasos con el buffer de acetato de sodio pH 3.6, incrementando la concentración de propanol en una secuencia similar a la reportada por Magnus y Khan (1992).

El contenido de proteína de las soluciones se determinó con el procedimiento de Bradford (1976).

Electroforesis

Para conocer la composición y la distribución de las subunidades de glutenina en las fracciones cromatográficas, se usó electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE), con el procedimiento descrito por Bean y Lookhart (1998). Se usaron geles homogéneos, de 1.5 ml de grosor y tamaño de 14 x 16 cm. Los pHs de los geles superior y de corrida fueron 6.8 y 8.5 respectivamente. Los geles se tiñeron con azul de Comassie.

RP-HPLC

Para la cromatografía de fase reversa de alta presión se usó una columna Vydac C18 de 150 x 2 mm de tamaño, de 5 μ de tamaño de

partícula y de 300 Å de poro. Para la elución se usó un gradiente en pasos de agua y acetonitrilo, en presencia de ácido trifluoroacético al 0.1%. La detección fue a 210 nm (Bean y Lookhart 1997).

Resultados

La Fig. 3 muestra el perfil de elución de las gliadinas estabilizadas de las variedades de trigo Oasis y Karl. La gráfica se realizó colectando fracciones de 1 ml durante la cromatografía y analizándolas por el procedimiento colorimétrico de Bradford (1976). En la primera parte del cromatograma, en las primeras fracciones eluídas, se pueden observar diferencias en el comportamiento de subunidades de gluteninas en las dos variedades estudiadas. Las gluteninas de la variedad Oasis mostraron una fracción no retenida (fracción 1) mayor que las gluteninas de Karl 92. Para las dos variedades, una gran proporción de las proteínas se unieron fuertemente a la matriz, ya que fue necesario usar urea 8M para eluírlas. En la TABLA II se muestran los porcentajes de proteína eluída en cada una de las fracciones. En ambos casos, la mayor cantidad de proteínas se eluyó en las fracciones más hidrofóbicas.

En la Figura 4 se observa la composición de gluteninas de las variedades estudiadas. Las dos variedades tienen la misma composición de gluteninas de masa molecular alta y contienen el par de alelos 5 + 10, relacionado con buena calidad de panificación.

La Figura 5 muestra la composición de las fracciones cromatográficas para las dos variedades estudiadas, analizadas por electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE). Las gluteninas de Karl eluídas en la fracción no retenida no se analizaron, por la poca cantidad de proteína eluída. Las dos variedades tuvieron una distribución similar de las proteínas en las fracciones cromatográficas. Las

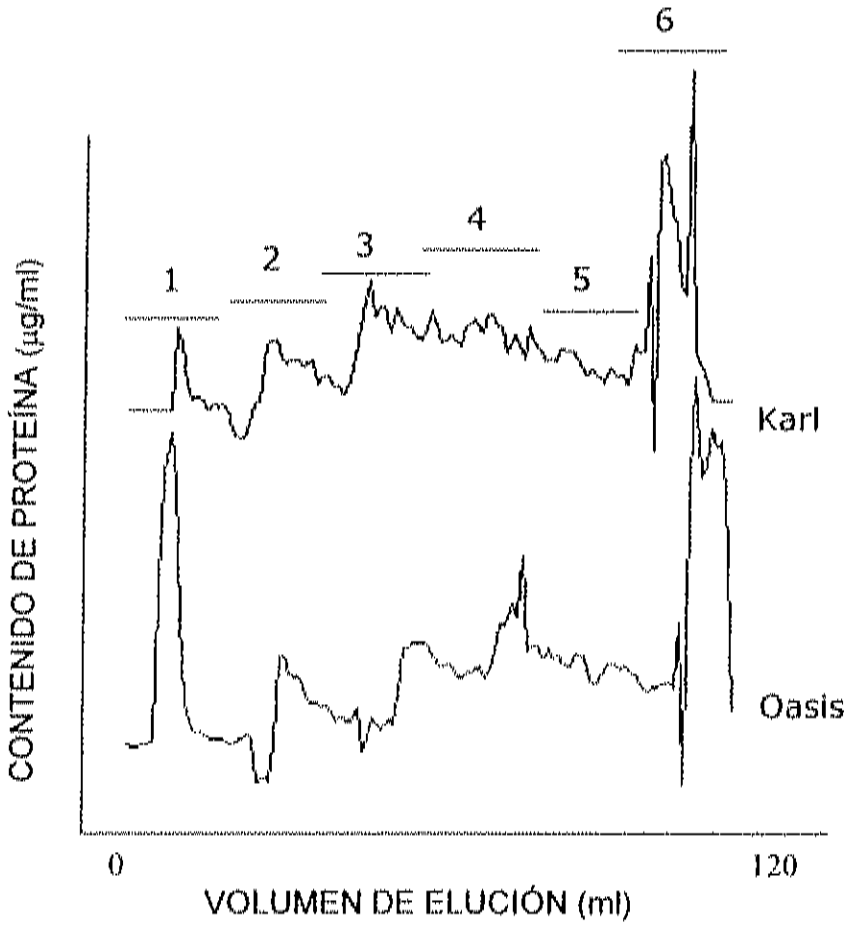

Fig. 3. Perfil de elución en cromatografía de interacción hidrofóbica de subunidades de gluteninas estabilizadas por alquilación. La elución se hizo con *buffer* de acetato de sodio (pH 3.6) con concentraciones crecientes de propanol. 1, Fracción no retenida; 2, 30% propanol; 3, 35% propanol; 4, 40% propanol; 5, 50% propanol; 6, Urea 8M.

TABLA II
Distribución de Proteína en las Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

	Recuperación	
Fracción	Oasis	Karl
No retenida	14.45	1.38
30% propanol	8.23	9.21
35% propanol	16.91	22.16
40% propanol	20.40	22.29
50% propanol	13.15	13.76
8M Urea	26.83	31.17

Nota: Recuperación fue entre 85 y 110%, los porcentajes son en función de una recuperación corregida del 100%. Error estándar entre corridas cromatográficas repetidas fueron entre 2 y 3.5%.

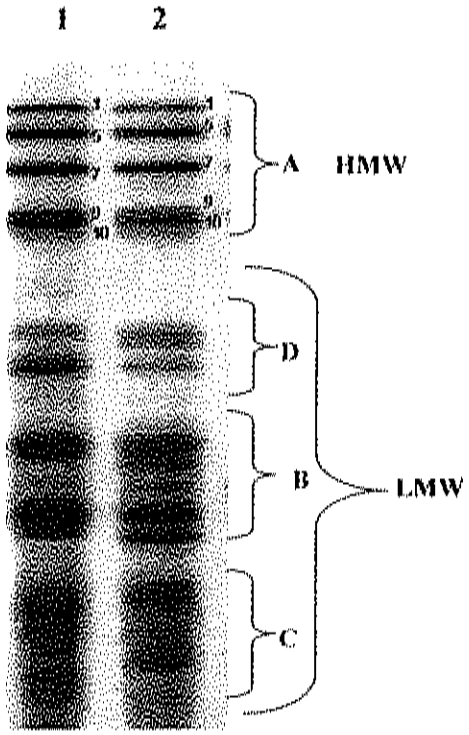

Fig. 4. Subunidades de gluteninas separadas por electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE). HMW, subunidades de glutenina de masa molecular alta; LMW, subunidades de masa molecular baja. 1, Variedad de trigo Oasis; 2, variedad de trigo Karl.

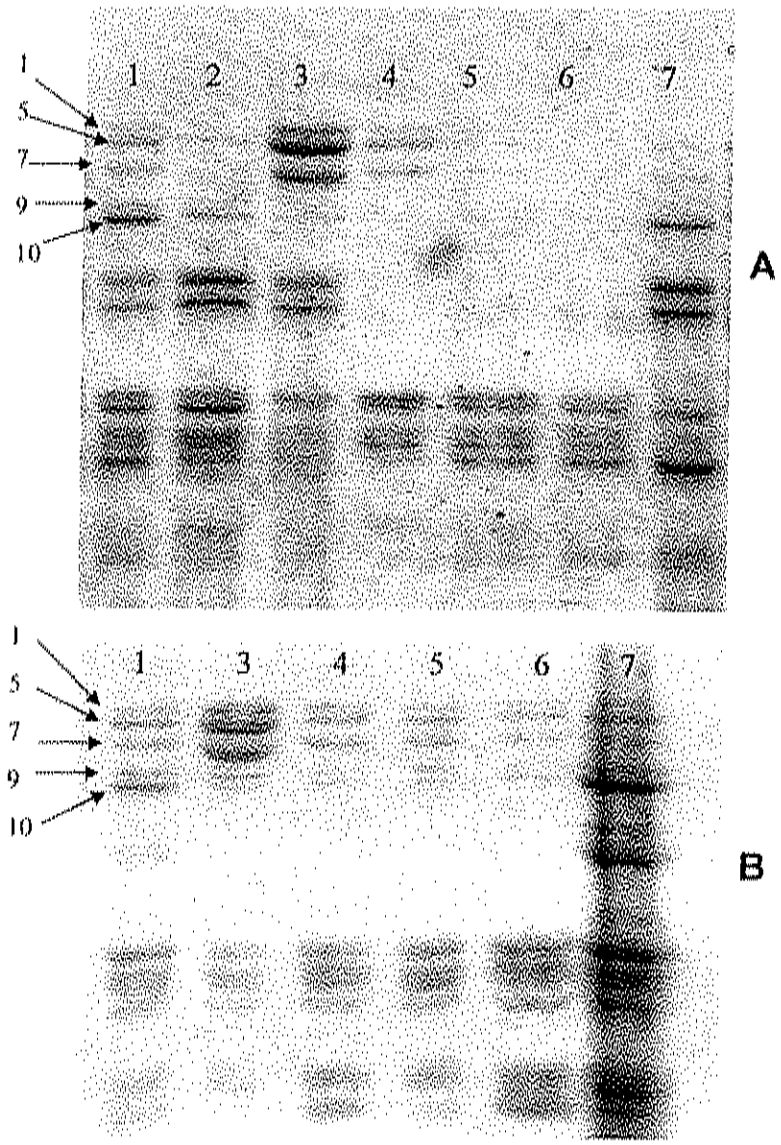

Fig. 5. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gluteninas estabilizadas de las variedades de trigo Oasis (A) y Karl (B) 1, Completa; 2, no retenida; 3, Propanol 30%; 4, Propanol 35%; 5, Propanol 40%; 6, Propanol 50%; 7, Urea 8M.

subunidades **x**, 1, 5 y 7 se encontraron en la fracción eluída con 30% propanol. La subunidad **y**, 9, se distribuyó en todas las fracciones y la subunidad **y** 10 se eluyó en la fracción de urea 8M y en menor cantidad en la fracción no retenida en el caso de la variedad Oasis. Las gluteninas de masa molecular baja se encontraron distribuidas en todas las fracciones . Sin embargo, la fracción eluída con 30% propanol presentó una proporción reducida de estas subunidades. Algunas subunidades de masa molecular baja se eluyeron en las fracciones de urea 8M y no fueron las mismas para las dos variedades.

Se observaron en la región de gliadinas ω, unas bandas conspicuas para la variedad Oasis. Habiéndose extraído las proteínas solubles con 50% propanol, se puede esperar poca contaminación con gliadinas. La presencia de estas bandas en la región de las gliadinas ω indica la presencia de gluteninas D que son gliadinas ω mutadas, con una cisteína que hace posible que se integren a el polímero de gluteninas. Éstas actúan como terminadores de cadena (Masci y Col. 1993). Estas subunidades D se distribuyeron en las fracciones no retenida, 30% propanol y Urea 8M. En las proteínas de Karl, se observaron estas bandas únicamente en la fracción de urea 8M. En este caso, muy probablemente si es contaminación con gliadinas ω, aunque no se descarta la presencia de subunidades de glutenina D en muy pequeñas cantidades.

Para comparar los resultados de cromatografía de interacción hidrofóbica con los de fase reversa, se incluyen cromatogramas de las gluteninas separadas por cromatografía de fase reversa de alta presión (RP-HPLC), (Fig. 6). Las subunidades de gluteninas de masa molecular alta se eluyen en las fracciones menos hidrofóbicas y las de masa molecular baja en las fracciones mas hidrofóbicas.

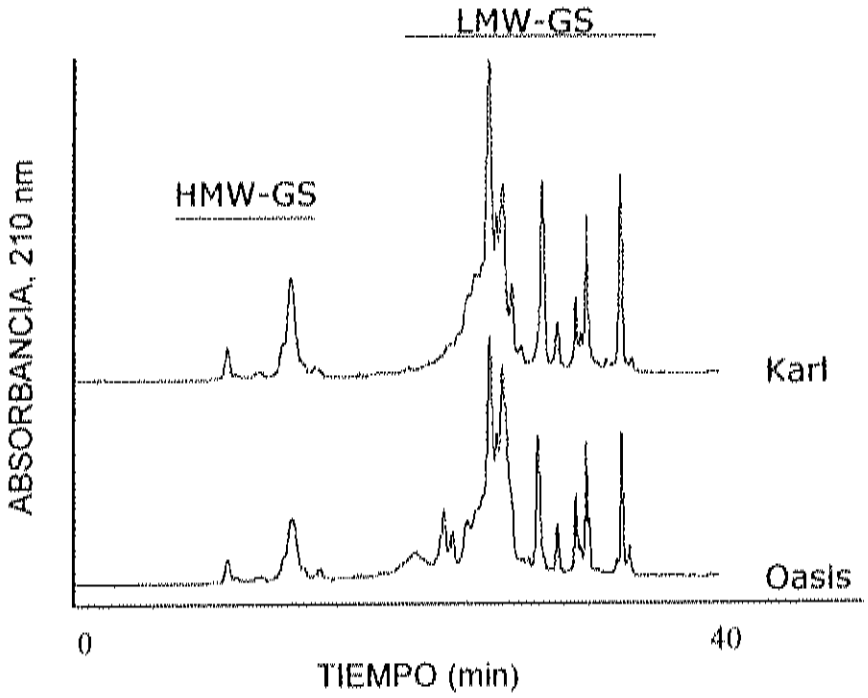

Fig. 6. Cromatogramas de gluteninas de las variedades de trigo Karl y Oasis, separadas por cromatografía de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC). HMW-GS, subunidades de glutenina de masa molecular alta; LMW-GS, subunidades de glutenina de masa molecular baja.

Discusión

La elución de una subunidad de glutenina en varias fracciones de diferente hidrofobicidad, es probablemente causado por la presencia de diferentes formas de la misma proteína o por agregación que llevó a formas con hidrofobicidad superficial relativa reducida. La cromatografía de interacción hidrofóbica usando agarosa altamente acetilada mostró una mejor selectividad y capacidad de discriminación que fenil-Sefarosa (resultados reportados por Magnus y Khan 1992).

Aún para una conformación tan estable como la esperada para las proteínas del gluten, la extracción y manejo de las gluteninas para la estabilización produce desnaturalización. Aunque las condiciones de adsorción en cromatografía de interacción hidrofóbica no son desnaturalizantes, la elución con propanol pudo haber producido algunos cambios conformacionales en las subunidades de glutenina eluída o adsorbida (Katzentein y Col. 1986).

Las diferencias observadas entre los tipos de subunidades de masa molecular alta **x** y **y** en el comportamiento cromatográfico y observado en SDS-PAGE, pueden deberse a diferencias estructurales entre estas subunidades de glutenina. Las tipo **x** tienen en su composición un tripéptido, que no se encuentra en las tipo **y**, así mismo, el número de cadenas repetidas es diferente en los dos tipos de subunidades (Lafiandra y Col. 1999) . El comportamiento cromatográfico de la subunidad 10 apoya lo reportado por Lafianfra y Col. (1999) en donde mostró, usando electroforesis con gradiente transversal de urea, que la subunidad 10 es más estable a la desnaturalización química que las otras subunidades de glutenina de masa molecular alta.

La subunidad 10 muestra un comportamiento diferente al de las otras gluteninas de masa molecular alta, también en HIC. El que la subunidad 10 se eluya en la fracción de urea 8M (más hidrofóbica) y que se encuentre únicamente en proporciones importantes en la fracción no retenida, muestra que la subunidad 10 es más estable. La presencia de la subunidad en la fracción no retenida, puede explicarse con la formación de agregados de reducida hidrofobicidad que no interaccionan con la columna.

La cromatografía de fase reversa de alta presión (RP-HPLC), una técnica muy utilizada para caracterizar proteínas de gluten, separa las proteínas de gluten en forma diferente que la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). La hidrofobicidad estimada a través de RP-HPLC correlaciona con la hidrofobicidad calculada a través de la composición de aminoácidos, lo que no sucede con la hidrofobicidad estimada por HIC. Por ejemplo, en proteínas modificadas de la subunidad 5, en donde se obtuvieron diferentes longitudes de la región repetitiva, las proteínas con la región repetitiva más larga fueron menos hidrofóbicas que las más cortas, ésto estimado por fase reversa (D'Ovidio y Col. 1997).

Se puede concluir, que la cromatografía de interacción hidrofóbica usando una matriz de baja hidrofobicidad como la agarosa altamente acetilada, es útil para estudiar la hidrofobicidad superficial de las subunidades estabilizadas de glutenina. El comportamiento cromatográfico puede servir para detectar diferentes formas de la misma proteína y puede relacionarse con estabilidad.

CAPÍTULO III

SEPARACIÓN DE GLIADINAS USANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA EN AGAROSA ALTAMENTE ACETILADA

Resumen

Gliadinas extraídas con etanol al 70% se fraccionaron por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) usando agarosa altamente acetilada como matriz. El buffer de equilibrio fue acetato de sodio pH 3.6 y la elución se hizo con un gradiente en pasos incrementando la concentración de propanol en el *buffer* de elución. La composición de las fracciones se analizó con electroforesis capilar de zona libre y electroforesis desnaturalizante y reductora.

El comportamiento de gliadinas en HIC difirió entre las variedades de trigo del cual provienen. Mostrando mayor afinidad por la matriz las gliadinas de una variedad que las de la otra. La proporción de subclases de gliadinas (α, β, γ y ω) entre fracciones fue cambiando al irse incrementando la concentración de propanol durante la elución. Las proteínas pertenecientes a la subclase de gliadinas α–β en la variedad Oasis y las γ, en la variedad Karl, mostraron mayor afinidad por la matriz que las otras subclases, resultado que difiere en parte del comportamiento de gliadinas en cromatografía de fase reversa de alta presión (RP-HPLC). Las gliadinas γ se eluyen en las fracciones más hidrofóbicas cuando se separan por RP-HPLC.

Introducción

La hidrofobicidad superficial de las proteínas del gluten ha sido reconocida como un factor importante para la interacción con otras proteínas y con componentes de la harina para formar la red de gluten hidratado (Hoseney y Col. 1970, Kobrehel y Bushuk 1977, Bekes y Col. 1983, Zawitowska y Col. 1985, Uthayakumaran y Col. 2001). Se ha reportado que las proteínas de las harinas de mejor calidad de panificación interaccionan más fuertemente con los lípidos (Chung y Pomeranz 1979).

En el caso de gliadinas, la importancia de la hidrofobicidad en las interacciones entre cadenas se demostró en el trabajo de Popineau y Pineau (1987), en donde se utilizó cromatografía de filtración en gel para detectar cambios en la conformación y una sonda hidrofóbica (2-p-toluidinil naftaleno 6 sulfonato) para medir hifrofobicidad superficial. El doblado y la agregación de gliadinas se acompañan por cambios en la hidrofobicidad superficial. La forma expandida es a la que le corresponde el mayor número de sitios hidrofóbicos accesibles. El doblado redujo ligeramente el número de sitios. Por otro lado, en condiciones que promueven agregación, la reducción del número de sitios hidrofóbicos fue muy grande. Esto indica la importancia de las interacciones hidrofóbicas entre monómeros.

La cromatografía de interacción hidrofóbica es una técnica útil para fraccionar proteínas de hidrofobicidad diferente (Popineau y Pineau 1987). Caldwell (1979) obtuvo buenos resultados con octil y fenil sefarosa separando gliadinas. Popineau y Pineau (1987) compararon la cromatografía de interacción hidrofóbica con cromatografía de fase reversa

de alta presión y con el uso de sondas hidrofóbicas para estimar hidrofobicidad superficial de gliadinas. Como una de las conclusiones mencionan que la retención de gliadinas en HIC no se relaciona a las hidrofobicidades promedio calculada a través de la composición de aminoácidos. Así que la retención de las gliadinas durante la cromatografía de interacción hidrofóbica, es probablemente debida a la localización de los residuos no polares, a su accesibilidad y a la conformación de las proteínas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento y la separación de gliadinas de dos trigos panaderos en cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada.

Materiales y Métodos

Se estudiaron las gliadinas de las variedades de trigo Oasis (grupo 1, gluten fuerte) y Karl , (trigo fuerte invernal, clasificado en los Estados Unidos, equivalente al grupo 1 de la clasificación Mexicana).

Extracción de las Gliadinas

Dos gramos de harina se extrajeron con 20 ml de ácido acético 0.7M, dejando la muestra y el solvente en contacto por dos horas, agitando cada media hora. Los tubos se centrifugaron (2700 x g) x 25 min con la centrifuga refrigerada Beckman (J2-M1 Beckman Instruments, Inc., California). Gliadinas y gluteninas se precipitaron con NaCl 0.25 M, se centrifugaron los tubos por 25 min en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Las gliadinas se extrajeron del pellet con 70% (v/v) alcohol etílico.

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Se usó 1 ml de matriz en una columna de 0.7 cm de diámetro, con los materiales y condiciones descritas en el capítulo II. Las fracciones se dializaron contra ácido acético 0.01 M y se liofilizaron.

Para preparar las proteínas para cromatografía, éstas se dializaron en el *buffer* de equilibrio y los contenidos de proteína de soluciones se determinaron por el método de Bradford (1976).

Electroforesis

Para conocer la composición de las gliadinas de las variedades de trigo estudiadas, se utilizó electroforesis ácida en geles de poliacrilamida (A-PAGE), con el procedimiento descrito por Clements (1987). Se usaron geles homogéneos de 12.5% de poliacrilamida , con un pH de 2.6, de 14 X 16 cm y de 1.5 mm de grosor. El *buffer* de la cámara superior fue lactato de aluminio con un pH de 3.1 y el de la cámara inferior una solución de ácido láctico con un pH de 2.6. Los geles se tiñeron con azul de Comassie.

Para conocer la composición y la distribución de las subclases de gliadinas en las fracciones cromatográficas, se usó electroforesis capilar y electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE).

Para SDS-PAGE, se usó el procedimiento descrito por Bean y Lookhart (1998). Se usaron geles homogéneos (12T, 1.35C), de 1.0 mm de grosor y tamaño de 10 x 10 cm. Los pHs de los geles superior y de corrida fueron 6.8 y 8.5 respectivamente. Los geles se tiñeron con azul de Comassie.

La electroforesis capilar de las fracciones de gliadinas se realizó con el instrumento de Beckman PACE 5510, empleando capilares de sílice sin recubrimiento de 7 μm x 27 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ). El buffer fue 50 mM de ácido iminodiacético (IDA) y 20% acetonitrilo. Las condiciones de electroforesis incluyeron: una corriente de 30 Kv y temperatura de 45 °C. Las muestras se inyectaron a 0.5 psi por 2-6 seg.

Cromatografía de Fase Reversa de Alta Presión

Para el análisis de gliadinas se utilizó una columna Zorbax SB C8 de 4.6 mm x 15 cm y un gradiente lineal (agua y actonitrilo, conteniendo cada uno 0.1% de ácido trifluoroacético) para la elución. La temperatura se mantuvo a 50°C. Se detectó a 210 nm usando un detector UV.

Resultados

La Fig. 7 muestra la composición de gliadinas de las variedades de trigo estudiadas, separadas por A-PAGE. Puede distinguirse claramente el patrón de bandas o composición tan diferente para las dos variedades en las tres regiones del gel, donde se separan las gliadinas ω, γ, α y β. Las gliadinas de la variedad de trigo Arowa se utilizaron como estándar para la identificación de las subclases de gliadinas.

En la Fig. 8, se muestra el perfil de elución de las gliadinas en HIC. El comportamiento en cromatografía de interacción hidrofóbica de las gliadinas de las variedades Karl y Oasis fue muy diferente. Las gliadinas de Oasis se distribuyeron en varias fracciones. Por el contrario, las gliadinas de Karl muestran una fracción grande de proteína no retenida y no se empieza a eluir proteína en forma importante hasta la fracción con 40% propanol. Estas diferencias observadas sugieren que la variabilidad

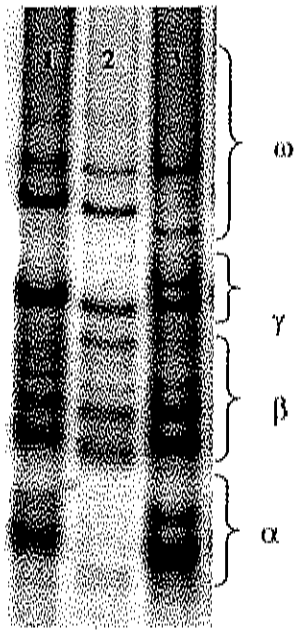

Fig. 7. Separación de subclases de gliadinas en electroforesis ácida en geles de poliacrilamida (A-PAGE). Variedades: 1, Karl; 2, Oasis; 3, Arowa (estándar).

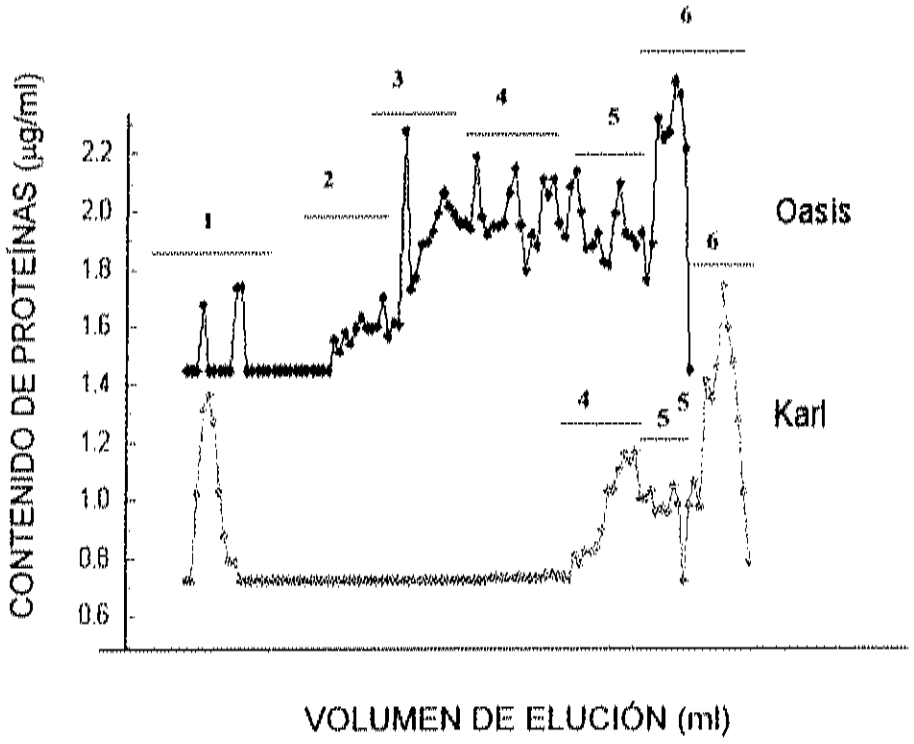

Fig. 8. Perfil de elución de gliadinas de las variedades de trigo Karl y Oasis en cromatografía de interacción hidrofóbica.

en la hidrofobicidad superficial puede tener influencia en la variación de calidad de los trigos. En la TABLA III, se muestra la proporción de las proteínas eluídas en las fracciones cromatográficas. Podemos decir, que las gliadinas de Karl tienen una hidrofobicidad superficial mayor que las de Oasis, ya que su fracción no retenida fue mayor y las proteínas se eluyeron en las fracciones con las concentraciones más altas de propanol y en la fracción de urea 8M. Para la variedad Oasis, la composición de gliadinas en las fracciones hasta la eluída con 35% propanol son muy similares, con excepción de la fracción no retenida, como lo podemos observar en los electroforegramas (Fig.9). A partir de esa concentración de propanol, la reducción de el número de proteínas es evidente.

La composición de subclases de gliadinas fue cambiando al ir aumentando la concentración de propanol para eluírlas de la columna (TABLA IV). En la composición de las gliadinas eluídas con 50% propanol, una de las más hidrofóbicas, se observa un enriquecimiento de las gliadinas α–β y una reducción de las gliadinas γ y ω. Estos resultados coinciden con los de Ornebro y Col. (1999) en donde, usando la técnica de elipsometría observaron que las gliadinas α se absorben más fácilmente a una superficie hidrofóbica que las otras subclases de gliadinas.

Para la variedad Karl, el comportamiento fue diferente. Se observa también una reducción en el número de proteínas (Fig.10) al ir aumentando la concentración de propanol en las fracciones. Sin embargo en este caso fue la fracción de gliadinas γ la que se enriqueció o aumentó en proporción en las fracciones más hidrofóbicas (TABLA V).

No concuerdan los resultados de HIC, especialmente para las gliadinas de la variedad Oasis cuando se separan por cromatografía de alta

TABLA III

Distribución de Proteína en las Diferentes Fracciones Cromatográficas, cuando las Gliadinas de las Variedades de Trigo Oasis y Karl se Separaron por HIC.

	Proteína eluída (%)[a]		
Fracción	Oasis	Karl	Fracción
No retenida	5.4	18.5	1
30% propanol	5.7	0.1	2
35% propanol	33.4	1.2	3
40% propanol	28.4	26.3	4
50% propanol	16.9	14.9	5
Urea 8M	10.1	39.1	6

[a] Porcentaje de la proteína eluída.

Nota: Recuperación fue entre 85 y 110%, error estándar entre corridas cromatográficas repetidas fue entre 2 y 3.5%.

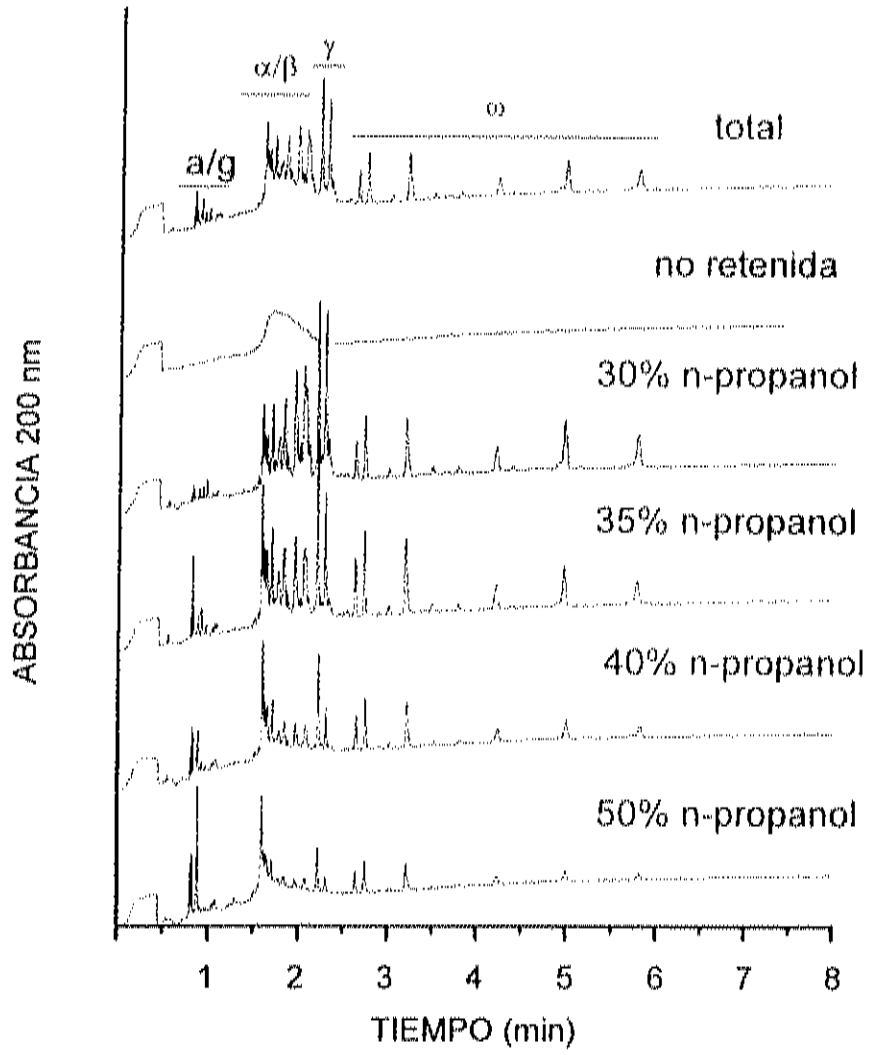

Fig. 9. Electroforesis capilar de zona libre (FZCE) de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) de gliadinas de Oasis.

TABLA IV

Proporción de Subclases de Gliadinas de Oasis en las Fracciones Cromatográficas, Determinada por Electroforesis Capilar.

	Subclases de gliadinas (%)[a]		
Muestra	α/β	γ	ω
Total	68.24	17.05	14.17
30% propanol	58.91	23.1	17.99
35% propanol	60.02	18.57	21.41
40% propanol	67.88	15.39	16.76
50% propanol	78.88	9.90	11.23

[a] Determinados por electroforesis capilar de zona libre.

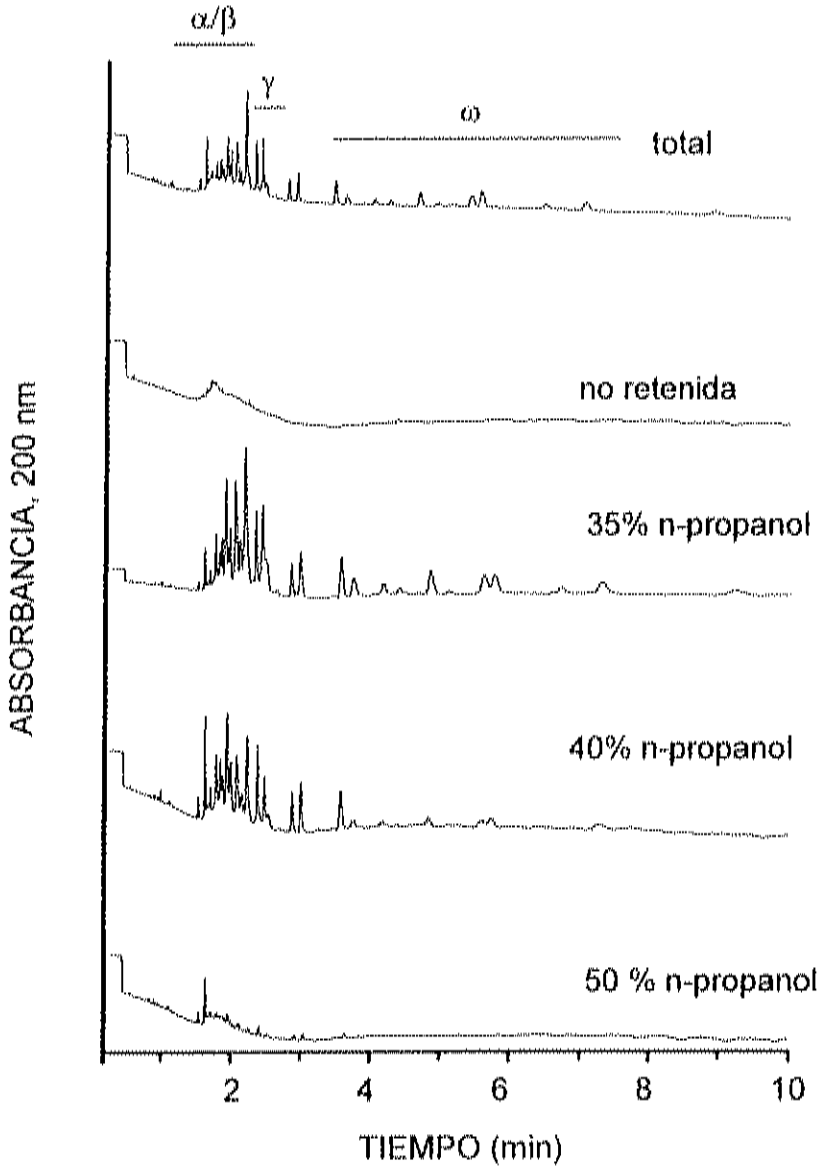

Fig.10. Electroforesis capilar de zona libre (FZCE) de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas de Karl.

TABLA V

Proporción de Subclases de Gliadinas de Karl en las Fracciones Cromatográficas, Determinada por Electroforesis Capilar.

	Subclases de gliadinas (%)[a]		
Muestra	α/β	γ	ω
Total	86.0	4.0	10.0
35% propanol	80.4	5.1	14.5
40% propanol	86.9	6.1	7.0
50% propanol	79.9	9.6	10.5

[a] Determinados por electroforesis capilar de zona libre.

presión de fase reversa (RP-HPLC), (Fig.11), lo que sugiere que HIC separa en función de la hidrofobicidad superficial, lo que no sucede con RP-HPLC.

Analizando las fracciones restantes: la fracción no retenida está formada por gliadinas y gluteninas agregadas, en donde evidentemente las subunidades de gluteninas de masa molecular alta están presentes (Fig.12). La fracción de urea (Fig.13), tiene en su composición todas las subclases de gliadinas, pero hay diferencias entre las variedades. La fracción de urea de Oasis muestra una banda muy definida en la región de las gliadinas ω. Se observa también que están presentes en pequeña proporción las subunidades de gluteninas de masa molecular alta.

Conclusiones

Las gliadinas de las variedades de trigo Karl y Oasis tienen en su composición proteínas con diferente hidrofobicidad superficial, como es evidente en su comportamiento en cromatografía de interacción hidrofóbica y posterior análisis por electroforesis. Estas diferencias entre variedades tienen indudablemente una fundamentación genética.

Las subclases de gliadinas α-β para la variedad de trigo Oasis y las γ para la de Karl se eluyeron preferentemente en las fracciones más hidrofóbicas de HIC.

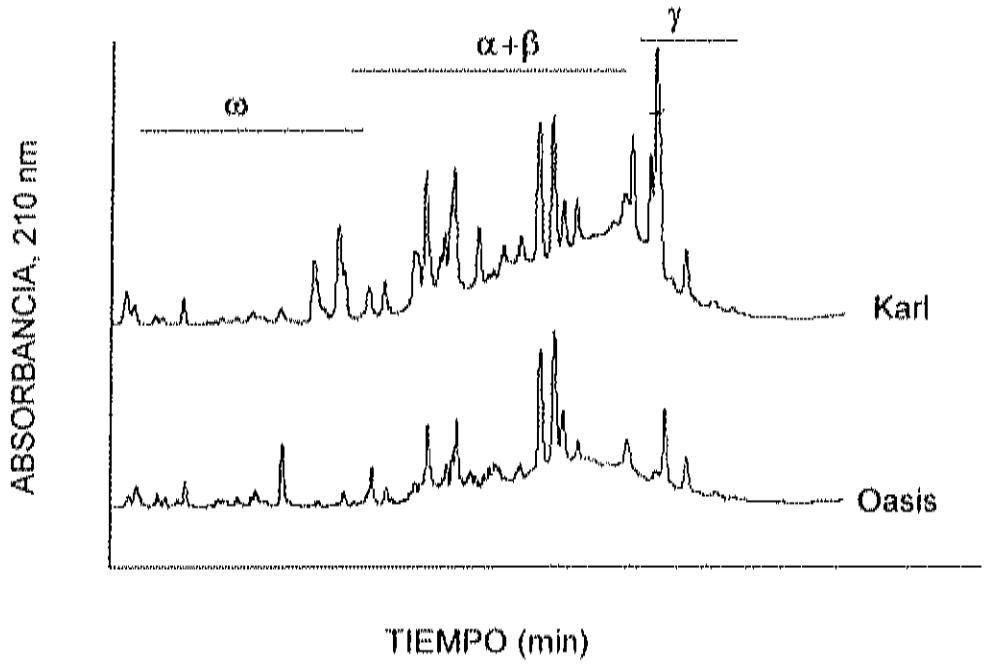

Fig. 11. Cromatogramas de gliadinas de las variedades de trigo Karl y Oasis, separadas por cromatografía de fase reversa de alta presión (RP-HPLC).

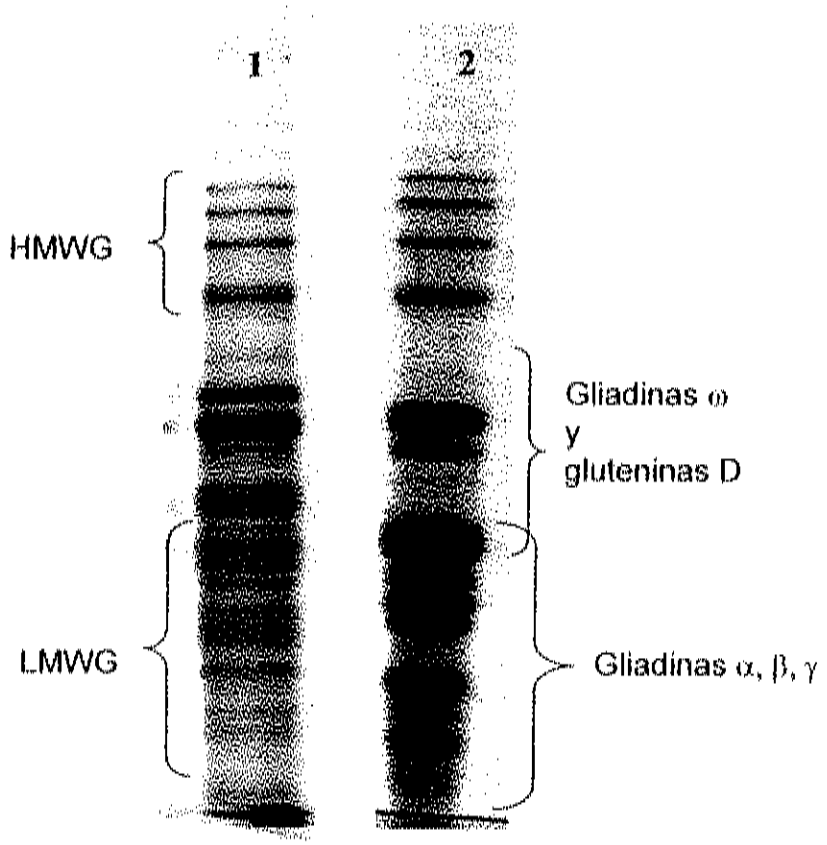

Fig. 12. Composición de la fracción no retenida de cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas, obtenida por electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE). 1) Karl, 2) Oasis. HMWG, subunidades de gluteninas de masa molecular alta; LMWG, subunidades de gluteninas de masa molecular baja.

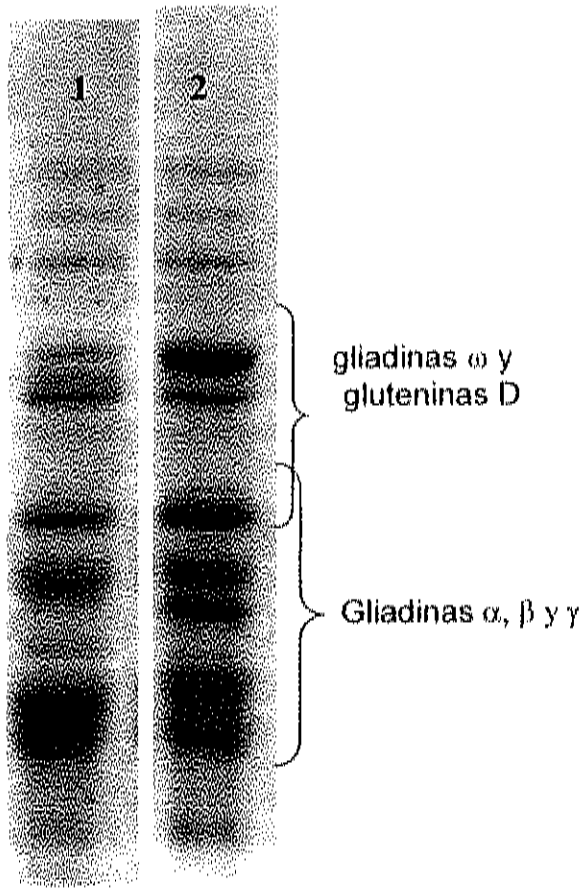

Fig. 13. Composición (SDS-PAGE) de las proteínas que forman la fracción de gliadínas de las variedades 1) Karl y 2) Oasis, eluídas con urea 8 M en cromatografía de interacción hidrofóbica.

CAPÍTULO IV

ESTUDIO CALORIMÉTRICO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE GLIADINAS Y GLUTENINAS ESTABILIZADAS DE LA VARIEDAD DE TRIGO OASIS

Resumen

Fracciones obtenidas por cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas y subunidades de gluteninas estabilizadas por alquilación, de la variedad de trigo Oasis, fueron estudiadas por microcalorimetría de barrido diferencial con el fin de relacionar la hidrofobicidad superficial de estas proteínas con su estabilidad térmica.

Las proteínas se encontraban en solución acuosa en donde se ajustó el pH a 3.0 con ácido acético. Las concentraciones de las soluciones estuvieron entre 26 y 130 μg/ml. Los barridos calorimétricos se hicieron de 20 a 110°C a una velocidad de 10°C/min. Se analizaron los termogramas en la región de 45 a 85°C, que fue en donde se obtuvo reproducibilidad.

Se midieron las temperaturas de las transiciones endotérmicas, que pueden asignarse a desdoblamiento o desnaturalización de proteínas. Sin embargo, las entalpías (ΔH) de las transiciones en su conjunto, fueron relativamente bajas, lo que puede significar que no se detectaron todos los eventos térmicos en la región del termograma que se estudió.

Las temperaturas de desnaturalización encontradas arriba de los 45 °C y hasta 81°C, muestran que, como es de esperarse por la composición de aminoácidos de las proteínas del gluten, éstas son muy estables a la desnaturalización térmica.

Introducción

La desnaturalización de una proteína es cualquier modificación que no involucra el rompimiento de enlaces peptídicos. Por otro lado, la estabilidad conformacional es la habilidad de una proteína de conservar su conformación nativa bajo la influencia de varios factores desnaturalizantes (calor, agentes desnaturalizantes, pH extremo). La forma más común de medir estabilidad conformacional de una proteína es a través de la medición de la energía libre de desnaturalización, que es la diferencia entre las energías libres de los estados nativo y el desnaturalizado (Grinberg y Col. 1989). Pocas referencias relacionadas a la estabilidad conformacional de las proteínas de gluten de trigo se pueden encontrar en la literatura. Esto indica quizá las dificultades experimentales que conlleva este trabajo. La principal dificultad es la baja solubilidad general de estas proteínas y sus propiedades de agregación (Bietz y Kruger 1994). Durante la desnaturalización, la tendencia de la proteína a agregarse aumenta considerablemente y esto sucede con liberación de calor. Como resultado, no se estima correctamente la capacidad calorífica de la solución. Es posible evitar esta situación usando soluciones extremadamente diluídas y un pH lo más alejado de su punto isoeléctrico (Privalov y Khechinashvili 1974). El desarrollo de la calorimetría de alta sensibilidad permite el uso de bajas concentraciones de proteína (Privalov y Khechinashvili 1974). Es muy importante el uso de un equipo de alta sensibilidad para detectar los cambios de calor producidos durante la desnaturalización. Debido a las fuertes propiedades de agregación de las proteínas de trigo (Halverson y Zeleny 1988) y a que las interacciones hidrofóbicas, las cuales son muy importantes en la estabilidad de las proteínas del gluten, son dirigidas por la entropía, contribuyen poco a la entalpía de desnaturalización,

Analizando la estructura primaria de las proteínas del gluten, es razonable pensar que éstas tienen una conformación muy estable. La

presencia de glutamina en grandes proporciones permite la formación de puentes de hidrógeno (Brock 1991). La alta proporción de aminoácidos no polares favorece la interacción hidrofóbica. Además, la presencia de puentes disulfuro intramoleculares (Tatham y Shewry 1990) puede proporcionar una estabilidad adicional. Sin embargo, con el fin de estudiar la desnaturalización térmica usando calorimetría, es necesario estabilizar los grupos sulfidrilo. Ésto para poder mantener las subunidades glutenina en solución y evitar los problemas que se presentan por la oxidación-reducción de los grupos sulfidrilo (Martínez y Col. 1995). La estabilización de estos grupos y las condiciones del procedimiento van a producir cambios, reduciendo la estabilidad e introduciendo probablemente modificaciones en la conformación.

La hidrofobicidad de una proteína es el resultado del contenido y arreglo de los aminoácidos. Considerando la hidrofobicidad superficial como una consecuencia de la hidrofobicidad total, la hipótesis del presente trabajo es que las fracciones de proteína con hidrofobicidad superficial más alta serán conformacionalmente más estables. Considerando más estables, las que presenten mayores temperaturas de desnaturalización. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la estabilidad térmica de fracciones de gliadinas y gluteninas estabilizadas, usando calorimetría de alta sensibilidad y su relación con la hidrofobicidad superficial estimada por HIC.

Materiales y Métodos

Se estudiaron las gliadinas y gluteninas de la variedad Oasis. Esta variedad de trigo está clasificada como del grupo 1, de gluten fuerte y destinado a panificación.

Extracción de las Proteínas

Con el fin de remover albúminas y globulinas, 250 mg de harina se extrajeron con una solución salina que contenía 0.05 M tris-HCL, 100 mM KCl y 0.005 EDTA (Bean y Lookhart 1998). Las muestras se

agitaron continuamente por 5 min usando un agitador vortex equipado para contener 30 viales (Vortex Genie2, Scientific Industries, Bohemia, NY) y se centrifugaron posteriormente en una centrifuga (Eppendorf 5415C) a 8160 x g por 2 min. La extracción se realizó con soluciones frías (5 °C) dos veces usando la solución salina y una vez con agua fría (5 °C). Las gliadinas se extrajeron del *pellet* resultante de la extracción anterior usando 1 ml de 50% propanol, se agitó por 5 min y se centrifugó por 2 min. La remoción completa de gliadinas se realizó con tres extracciones iguales (Bean y Col. 1998). Las gluteninas se extrajeron del residuo de las dos extracciones anteriores con 1 ml de 50% propanol conteniendo 5% β mercaptoetanol, agitando por 30 min con el equipo y condiciones mencionadas anteriormente . Las gluteninas se estabilizaron por alquilación con 4 vinilpiridina (Lew y Col. 1992). La solución de alquilación contenía urea 4 M, 25% propanol y 50% vinilpiridina. Se usaron 50 µl de la solución por cada 500 µl del extracto. Para preparar las proteínas para la cromatografía, éstas se dializaron en el buffer de equilibrio (acetato de sodio, pH 3.6).

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Se usaron los procedimientos descritos en los capítulos II y III para subunidades de gluteninas y gliadinas respectivamente. El contenido de proteína de las fracciones y de las soluciones de proteína fue determinado por el procedimiento de Bradford (1976).

Electroforesis

Los procedimientos electroforéticos, SDS-PAGE para subunidades de gluteninas y fracciones de gliadinas eluídas con urea 8M y electroforesis capilar de zona libre para gliadinas, son los que se describen en los capítulos II y III respectivamente.

Cromatografía de Fase Reversa de Alta Presión

Los procedimientos de cromatografía de fase reversa son los que se describen en los capítulos II y III para las gluteninas y gliadinas respectivamente.

Calorimetría

Las soluciones de gliadinas y gluteninas estabilizadas se dializaron exhaustivamente en soluciones de ácido acético, pH 3.0 para prepararlas para las corridas calorimétricas. Las proteinas tuvieron una concentración entre 26 y 130 μg/l estimado por el procedimiento de Bradford. Además, se colocaron 0.5 ml en cada celda del calorímetro.

Se utilizó un microcalorímetro de barrido diferencial (Calorimetry Sciences Corp. CSC, Utah), cuyas características incluyen cuatro celdas herméticas de 1 cc, una línea base de ± 1μW y una capacidad de barrido de -30 a 110°C . Los barridos calorimétricos se realizaron de 10 a 110 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, aunque los termogramas solo se pudieron analizar en el rango de 45 a 85 °C, en donde produjeron resultados reproducibles y sin interferencias. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Para analizar los termogramas se utilizó el programa PeakFit, versión 4. Para identificar los picos de absorción endotérmica, se utilizó deconvolución gausiana, usando el mismo programa PeakFit.

Análisis Estadístico

Se realizó estadística descriptiva utilizando el paquete estadístico STATISTICA (StatSoft, Inc. 1995).

Resultados y Discusión

La hidrofobicidad superficial de las proteínas que forman una fracción de HIC, se espera que sea similar. Sin embargo, es importante considerar que las proteínas que forman la fracción son diferentes, por lo que es de esperarse que sucedan en un mismo termograma varios eventos térmicos.

Gliadinas

La Fig. 14 muestra los termogramas y la identificación de picos por deconvolución gausiana. Los termogramas se analizaron en la región de temperatura de 45 a 85°C. Ésta fue la región en donde hubo reproducibilidad y no se observaron grandes transiciones exotérmicas que pudieran enmascarar la presencia de transiciones endotérmicas, resultantes de cambios debidos a la desnaturalización de proteínas. Las transiciones observadas pueden asignarse al desdoblamiento de la estructura remanente, después de los procesos desnaturalizantes de extracción y cromatografía. Pueden ser también una estructura formada durante la exposición a la solución ácida durante la diálisis.

En la Fig.14, A,B y C puede observarse que hay picos que se repiten en los termogramas de las fracciones cromatográficas eluídas con 30 y 40% propanol y Urea 8M. Los picos que se repiten son a 59, 65, 71 y 81 °C, aunque la proporción del calor con que contribuyen al calor total de desnaturalización es diferente para cada fracción (TABLA VI). Los picos más importantes en relación al calor absorbido en la transición de la fracción de 30% propanol fueron 71, 76 y 81 °C, aunque se observaron transiciones a partir de los 52 °C. En la fracción de 40% propanol los picos más importantes fueron a 55 y 59°C, aunque se observa un pequeño pico a los 81 °C. En el caso de la fracción de urea 8M, la transición a 81 °C es la más importante, se observan otras dos transiciones a 65 y 71 °C. Podemos observar en la Fig, 15 y TABLA VII como cambian las subclases de gliadinas en las fracciones eluídas

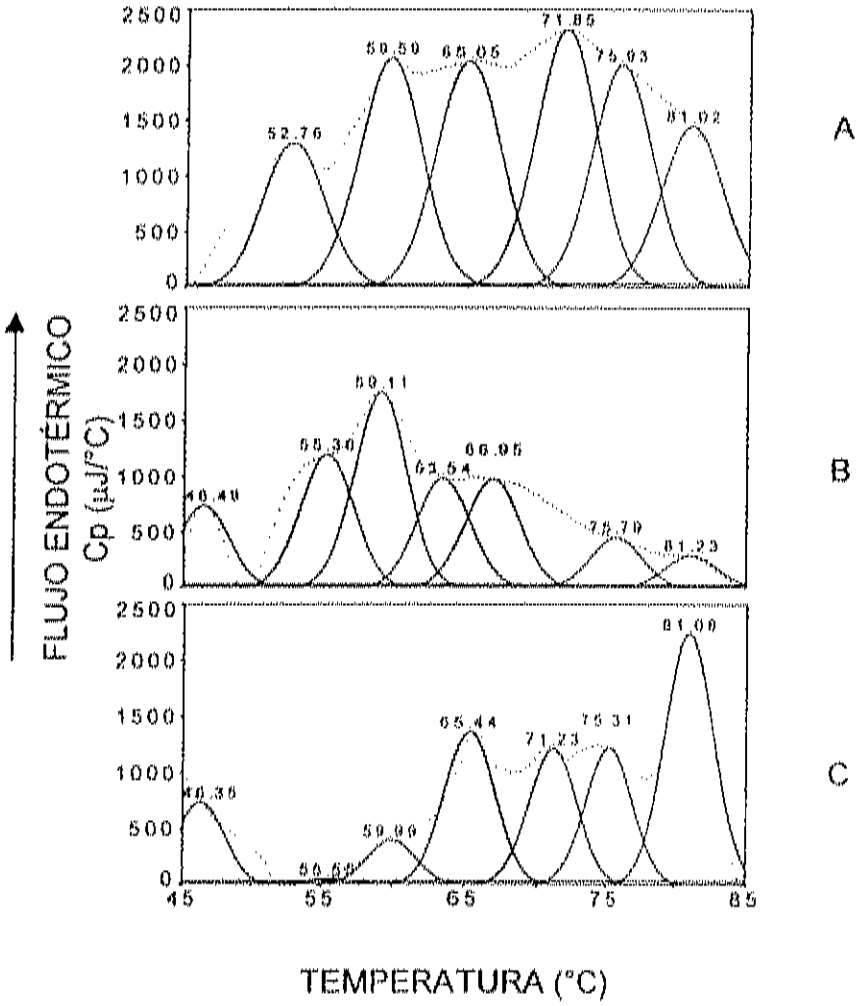

Fig. 14. Termogramas obtenidos con microcalorimetría de barrido diferencial y deconvolución gausiana de fracciones de gliadinas de la variedad de trigo Oasis, separadas por cromatografía de interacción hidrofóbica. A, eluídas en la fracción de 30% propanol; B, eluídas en la fracción de 40% propanol y C, eluídas con urea 8M.

TABLA VI

Temperatura y Calor de Desnaturalización de Gliadinas de Oasis Contenidas en Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

Fracción	Pico	n[a]	Δ Q (Joules)[b] x10^3	ds[c] x10^3
30% propanol				
	52.8	3	0.2	0.1
	59.6	2	2.5	1.5
	65.1	1	3.1	
	71.9	2	10.1	1.0
	76.3	2	11.8	0.9
	81.0	1	46.0	
40% propanol				
	55.4	3	2.6	1.5
	59.1	3	2.7	0.6
	81.2	3	0.2	0.3
Urea 8M				
	65.8	2	0.5	0.5
	71.2	2	1.4	1.6
	76.3	1	1.8	
	81.1	2	4.0	2.8

[a] Frecuencia de aparición del pico en tres repeticiones.

[b] Calor de desnaturalización.

[c] Desviación estándar.

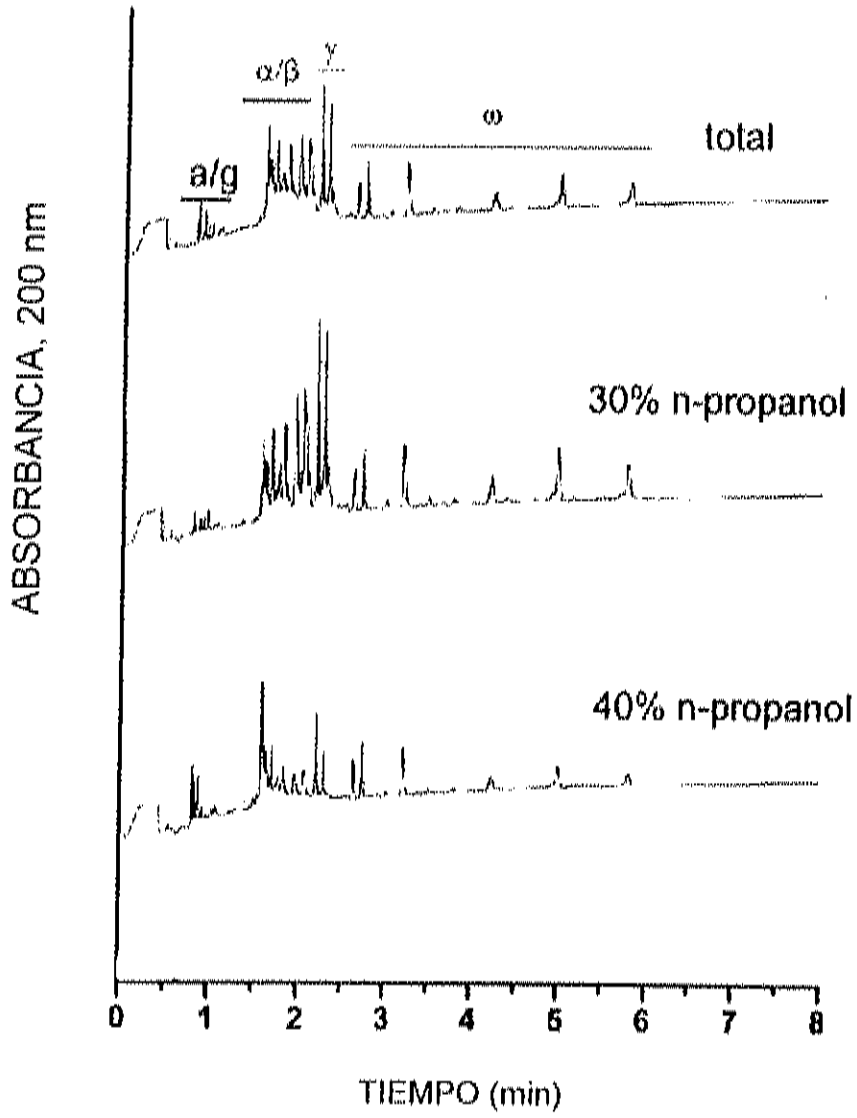

Fig. 15. Composición (FZCE) de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gliadinas de Oasis. a/g, albúminas y globulinas; α, β, γ, ω, subclases de gliadinas.

Tabla VII
Proporción de las Subclases de Gliadinas de Oasis Eluídas en Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica y Analizadas por Electroforesis Capilar de Zona Libre.

	Subclases de gliadinas (%)[a]		
Fracción	α+β	γ	ω
30% propanol	58.91	23.1	17.99
40% propanol	67.85	15.39	16.76

[a] Determinada por la proporción en la respuesta del detector UV, cuando fueron separadas por electroforesis capilar de zona libre.

con 30 y 40% propanol. La proporción de las gliadinas α y β aumentan en la fracción eluída con 40% propanol y las gliadinas γ disminuyen. Las gliadinas ω redujeron mínimamente su concentración. La fracción eluída con urea 8M (Fig. 16), contiene proteínas en las regiones de las cuatro subclases de gliadinas. Esta fracción contiene las gliadinas con las temperaturas más altas de transición.

Comparando los picos que reducen la proporción de calor con que contribuyen al calor total de desnaturalización y la reducción de las subclases de gliadinas en las fracciones eluídas 30 y 40% propanol, podemos presumir que las gliadinas γ son las proteínas con mayor temperatura de desnaturalización. Si esto es cierto, este comportamiento tendría más relación con la hidrofobicidad estimada por cromatografía de fase reversa de alta presión. Las gliadinas γ son las que se eluyen en las fracciones mas hidrofóbicas (Fig. 17). Muy probablemente los picos observados a 55 y 59°C corresponden a las gliadinas α y β, porque estas subclases de gliadinas son las que incrementaron su concentración en la fracción eluída con 40% propanol, y son los picos que están en el rango de temperatura 50 – 59°C los que contribuyen en mayor proporción al calor absorbido durante la desnaturalización de las proteínas de esta fracción.

Gluteninas Estabilizadas

En el caso de las gluteninas estabilizadas, aunque se observan picos repetidos en las fracciones estudiadas, el número de éstos es menor que en el caso de gliadinas. El que más notoriamente se repitió en las tres fracciones fue el de 81 °C (Fig. 18 A, B y C). Los picos más importantes, los que más contribuyen al calor de desnaturalización de la fracción eluída con 30% propanol son 76 y 81°C, aunque se observaron picos a 55, 65 y 69 °C (Fig. 18, A y TABLA VIII).

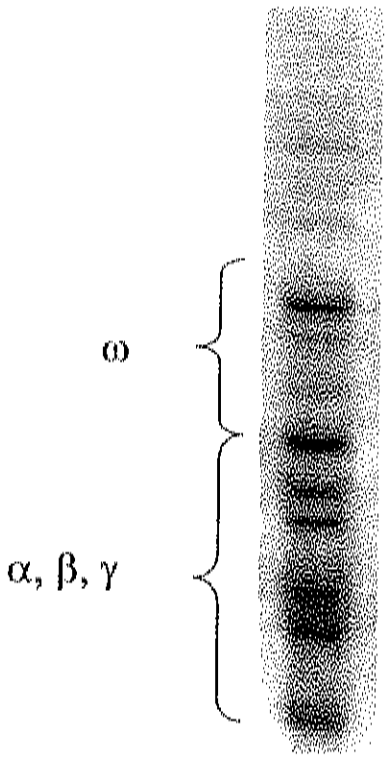

Fig. 16. Composición (SDS-PAGE) de la fracción de cromatografía de interacción hidrofóbica, eluída con urea 8M de gliadinas de Oasis.

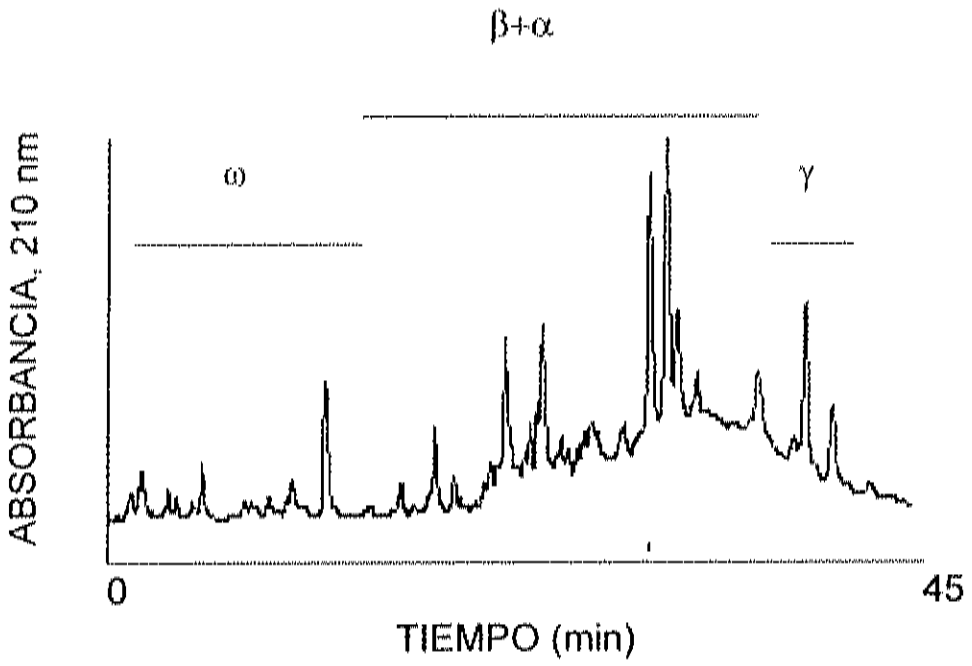

Fig. 17. Perfil de elución de gliadinas completas de Oasis analizadas por cromatografía de fase reversa de alta resolución (RP-HPLC).

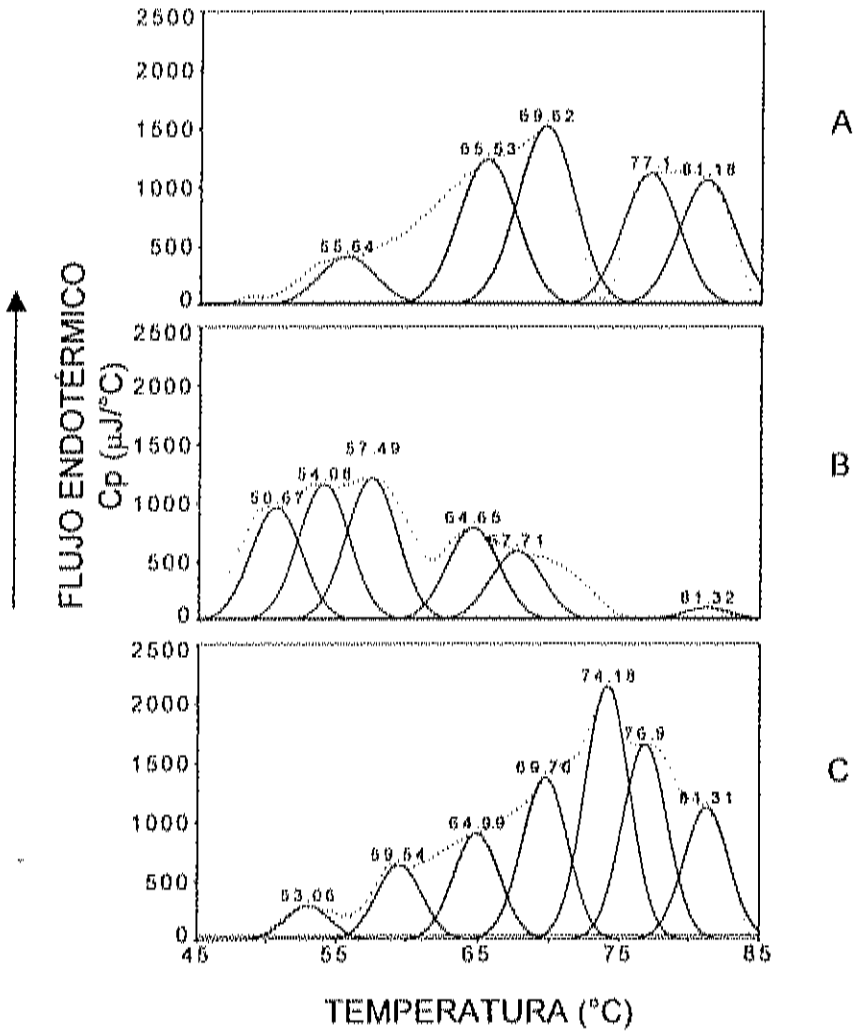

Fig. 18. Termogramas obtenidos con microcalorimetría de barrido diferencial y deconvolución gausiana de fracciones de gluteninas de la variedad de trigo Oasis, separadas por cromatografía de interacción hidrofóbica. A, eluídas en la fracción de 30% propanol; B, eluídas en la fracción de 40% propanol y C, eluídas con urea 8M.

TABLA VIII

Temperatura y Calor de Desnaturalización de Gluteninas de Oasis Contenidas en Fracciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

Fracción	Pico	n[a]	Δ Q (Joules)[b] x 10^3	ds[c] x 10^3
30% propanol				
	55.6	2	2.9	3.9
	65.5	2	5.8	0.2
	69.6	2	5.5	2.1
	76.8	1	10.0	
	81.2	1	9.0	
40% propanol				
	50.7	2	2.6	0.4
	54.1	1	0.6	
	57.5	3	0.0	1.5
	64.3	1	1.3	
	67.7	1	1.0	
	81.3	2	1.6	2.0
Urea 8M				
	53.1	1	0.5	
	59.5	2	1.1	1.1
	69.8	1	2.3	
	74.2	2	3.6	0.6
	81.1	3	3.0	0.2

[a] Frecuencia de aparición del pico en tres repeticiones.

[b] Calor de desnaturalización.

[c] Desviación estándar.

Para la fracción de 40% propanol, las gluteninas presentaron un comportamiento similar al de las gliadinas . Los picos más importantes ocurrieron a temperaturas más bajas. Para la fracción de Urea 8M, se observó una distribución de las temperaturas de las transiciones en forma muy similar entre sí (TABLA VIII). Observando la composición de las fracciones de gluteninas en análisis electroforético (Fig. 19), podemos asumir que las temperaturas de transición altas observadas en la fracción de 30% propanol, corresponden a las subunidades de masa molecular alta tipo x y las temperaturas más bajas a gluteninas de masa molecular baja.

Entalpía de las Transiciones

La entalpía de las transiciones para gliadinas fueron de 0.003, 0.008 y 0.002 kJ/g, para las fracciones eluídas con 30, y 40 % propanol y Urea 8M, repectivamente. En el caso de las gluteninas los valores fueron 0.004, 0.001 y 0.002 kJ/g . Estos valores se calcularon tomando en cuenta todos los eventos térmicos detectados. Éstos son muy bajos en relación a los reportados para otras proteínas; lo que puede significar que no se detectaron todos los eventos térmicos.

Conclusiones

Se pudieron medir temperaturas de transición que pueden ser atribuídas a desdoblamiento de gliadinas y gluteninas, ésto usando micro-calorimetría de barrido diferencial, lo que no había sido reportado con anterioridad. Las temperaturas para estas transiciones estuvieron entre 45 y 85°C, lo que confirma la estabilidad térmica de estas proteínas. Se observó una relación de la hidrofobicidad superficial y las temperaturas de desnaturalización. Las temperaturas más altas de desnaturalización, que según el criterio antes mencionado son un indicador de estabilidad, las presentaron las proteínas con mayor hidrofobicidad superficial.

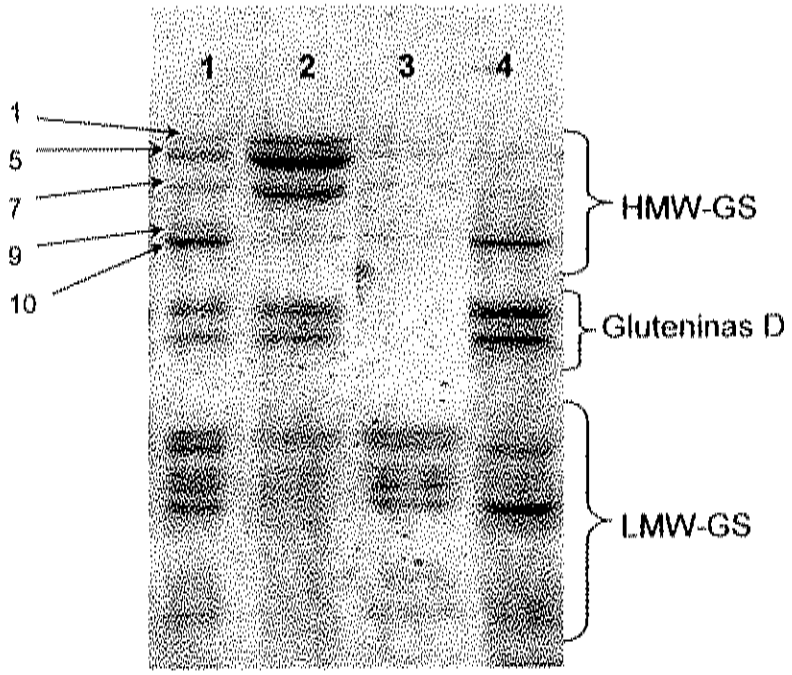

Fig. 19. Composición (SDS-PAGE) de fracciones de cromatografía de interacción hidrofóbica de gluteninas de Oasis, eluidas con diferentes proporciones de propanol en el *buffer* de equilibrio. 1, gluteninas completas; 2, fracción de 30% propanol; 3, fracción de 40% propanol; 4, fracción eluída con urea 8M. HMW-GS, subunidades de glutenina de masa molecular alta; LMW-GS, subunidades de glutenina de masa molecular baja.

CAPITULO V

TRANSICIONES EN LA REGIÓN VÍTREA DE GLUTEN CON CONTENIDO BAJO DE HUMEDAD, DETERMINADA POR MICROCALORIMETRÍA Y RELACION CON LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE SUS PROTEÍNAS

Resumen

Con el fin de relacionar las propiedades quimicas de las proteínas del gluten con las transiciones que ocurren en la región vitrea y la sensibilidad a la plastificación por agua, se determinaron los cambios en la capacidad calorífica cuando el gluten de diferentes variedades con contenidos bajos de humedad (4 y 8%) se calentaron de –20 a 110 °C usando un microcalorímetro de barrido diferencial.

Se fraccionaron las proteínas solubles mediante cromatografía de exclusión molecular de alta presión y se determinó el contenido de proteína polimérica insoluble. Se determinó la composición de la fracción de gluteninas de masa molecular alta por electroforesis capilar. Además se fraccionaron las gliadinas y las gluteninas solubles en ácido acético usando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) con agarosa altamente acetilada como matriz hidrofóbica. Se definió un índice de hidrofobicidad, usando el perfil de elución en HIC, tomando en cuenta las proteínas eluídas en las fracciones mas hidrofóbicas.

No se encontró una relación entre la temperatura de transición vitrea de gluten con 8% de humedad y las características químicas de sus proteínas. Se observó sin embargo, una transición de segundo orden a aproximadamente la temperatura ambiente. Ésta coincide con transiciones reportadas anteriormente para gluten con contenidos similares de humedad y que se relacionan con fenómenos que ocurren a temperaturas menores a la de la transición vítrea (sub-Tg) como relajación, movilidad molecular localizada y cambios reológicos. Esta transición fue sensible a cambios en humedad. Se

observaron mayores temperaturas de esta (sub-Tg) transición en gluten con contenidos de proteína polimérica insoluble mayores. Una sensibilidad más alta a la plastificación por agua se encontró en gluten cuyas gluteninas solubles presentaron un índice de hidrofobicidad mayor. No hubo una relación entre la composición de gluteninas de peso molecular alto y la transición sub Tg determinada, con la excepción de que los glútenes más sensibles al contenido de humedad contuvieron el par de subunidades 5+10.

La medición de las temperaturas de transición en la región vítrea, en gluten con contenidos bajos de humedad, usando microcalorimetría, es una herramienta prometedora no únicamente para predecir la estabilidad y propiedades de alimentos, sino también para avanzar en el conocimiento de la interacción proteína-proteína y proteína-agua en el gluten.

Introducción

El gluten es el material proteinaceo que imparte las propiedades viscoelásticas a las masas y es el responsable de las propiedades únicas de panificación del trigo. El gluten forma la matriz continua en donde los gránulos de almidón se imbiben para formar la masa y es también el componente más importante de la matriz en los productos horneados.

El gluten extraído contiene alrededor de 80% de proteína y el restante 20% se compone de cantidades similares de almidón y lípidos (Tatham y Col. 1990). Las proteínas que componen al gluten pueden dividirse en dos grupos principales: las gliadinas monoméricas y las gluteninas que forman polímeros unidos por enlaces disulfuro. Las subunidades de gluteninas de masa molecular alta son de particular importancia en la variación de la calidad de panificación (Payne 1987) y se ha demostrado su efecto en la formación de los polímeros de masa molecular alta (Popineau y Col. 1994, Gupta y Col. 1995).

La estructura de las subunidades de gluteninas de masa molecular alta comprende tres regiones distintas, una región central repetitiva rodeada por las regiones amino y carboxy terminales no repetitivas. Existe bastante

evidencia basada en estudios espectroscópicos, de microscopía y de predicción de estructura de que la región central repetitiva de las gluteninas consiste de giros β tipo II regularmente repetidos. Esta superestructura en forma de listón se enrolla en forma de hélice para producir una subunidad en forma de bacilo que interacciona con otras subunidades por agregación en paralelo (Shewry y Tatham 1990).

Las interacciones entre subunidades están determinadas en parte por las cadenas laterales de prolina, glicina y glutamina, que dominan la región repetitiva. Las cadenas laterales de prolina y glicina son hidrofóbicas y las cadenas laterales de glutamina son hidrofílicas e hidrofóbicas en parte. Estas últimas contribuyen principalmente a la formación de puentes de hidrógeno (Brock 1991).

Estudios de conformación usando espectroscopía de infrarrojo sugieren que las interacciones entre subunidades en polímeros de glutenina involucran hojas β localizadas en las regiones repetitivas (Popineau y Col. 1994). Estas regiones son ricas en glutamina y pueden formar una red extensa de puentes de hidrógeno.

Una variedad de técnicas como la calorimetría de barrido diferencial (DSC), análisis térmico-mecánico dinámico (DMTA) y resonancia magnética nuclear (RMN) han demostrado que el gluten es un sistema polimérico amorfo que es sensible a la plastificación por agua, pero no soluble en ella (Gontard y Ring 1996 y referencias, Grant y Col. 1999). Levine y Slade (1990) consideraron que los polímeros de alimentos se comportan como polímeros sintéticos, mostrando un estado vítreo. De hecho el gluten así como otros polímeros de alimentos existen en estado amorfo, el cual se define por la falta de orden de largo rango (Roudaut et al 1999).

La temperatura de transición vítrea (Tg) de un polímero amorfo se describe como una transición de vidrio quebradizo a material viscoso o dúctil (Gontard y Ring 1996). La transición vítrea de polímeros se observa en

calorimetría de barrido diferencial como un incremento en forma de escalón de la capacidad calorífica de la muestra durante el calentamiento, esto debido a un incremento de el movimiento molecular del polímero (Hatakeyama 1999). La presencia de compuestos de bajo peso molecular, agua en el caso de polímeros hidrofílicos como el gluten (Grant y Col. 1999) hacen que la Tg se reduzca. Teóricamente, la adición de plastificantes bajo condiciones isotérmicas tiene el mismo efecto en la movilidad molecular que el incremento de temperatura. El agua incrementa el volumen libre y permite por lo tanto la movilidad de los segmentos de la cadena polimérica (Gontard y Ring 1996).

Se han utilizado principalmente calorimetría de barrido diferencial y análisis termomecánico para determinar la temperatura de transición vítrea del gluten (Levine y Slade 1990, Hoseny y Col. 1988, Nichols y Col 1995, Fujio y Lim 1989). Las transiciones que ocurren a temperaturas por debajo de la temperatura de la transición vítrea, que se presume proveen información de la movilidad molecular en los materiales vítreos, se han reconocido recientemente (Kalichevsky y Col. 1993).

En el presente estudio se identificaron relaciones entre las características químicas de las proteínas del gluten de diferentes variedades de trigo con las temperaturas de transición en la región vítrea y se determinó su susceptibilidad a ser plastificado por el agua, usando microcalorimetría de barrido diferencial, que es un método muy sensible para detectar cambios en las condiciones termodinámicas de las muestras.

Materiales y Métodos

El gluten al cual se le hicieron los estudios calorimétricos, se obtuvo a partir de harina. A la misma harina se le extrajeron las proteínas solubles en 50 % propanol (gliadinas y gluteninas solubles) y se analizaron por cromatografía de exclusión molecular de alta resolución. La cantidad de gluteninas insolubles, se analizaron, a través del análisis de nitrógeno por el método de Dumas. Se realizó también un análisis de la composición de subunidades de gluteninas de masa molecular alta usando electroforesis

capilar. Además, las gliadinas y gluteninas solubles se analizaron por cromatografía de interacción hidrofóbica. En la Fig. 20 se muestra el diagrama de la experimentación. Se relacionaron las características químicas de las proteínas del gluten con las transiciones de segundo orden, medidas con calorimetría de alta sensibilidad.

Obtención del Gluten

Se analizaron glutenes de las variedades de trigo, Oasis y Rayón (grupo 1, gluten fuerte, Norma Oficial Mexicana, NMX-FF-036-11996-SCFI), Cucurpe (grupo 3, gluten débil) y de la variedad Karl (trigo fuerte de Invierno). Las variedades Mexicanas fueron de la cosecha 1998, proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Costa de Hermosillo, mientras que la variedad Karl, de la cosecha 1996, fue proporcionada por la Universidad Estatal de Kansas (Manhatan, Kansas).

El gluten se aisló mediante el procedimiento de Khaktar y Col. (1995). La masa con un contenido óptimo de humedad y completamente desarrollada se dejó reposar en agua destilada por 30 min. Posteriormente la masa se lavó con aproximadamente 6.5 L de agua por kg de harina, hasta que el gluten quedó libre aparentemente de almidón.

Electroforesis Capilar

Las gluteninas se extrajeron de la harina (250 mg) con 1 ml de 50% propanol, conteniendo 5% de β-mercaptoetanol (Bean y Lookhart 1999), después de la remoción de las proteínas solubles con tres extracciones de 50% propanol (Bean y Col. 1998).

Se utilizó el instrumento de electroforesis capilar Beckman PACE 5510 para la separación de las subunidades de gluteninas, empleando capilares de sílice sin recubrimiento de 7 μm x 27 cm (Polymicro Technologies, Phoenix,

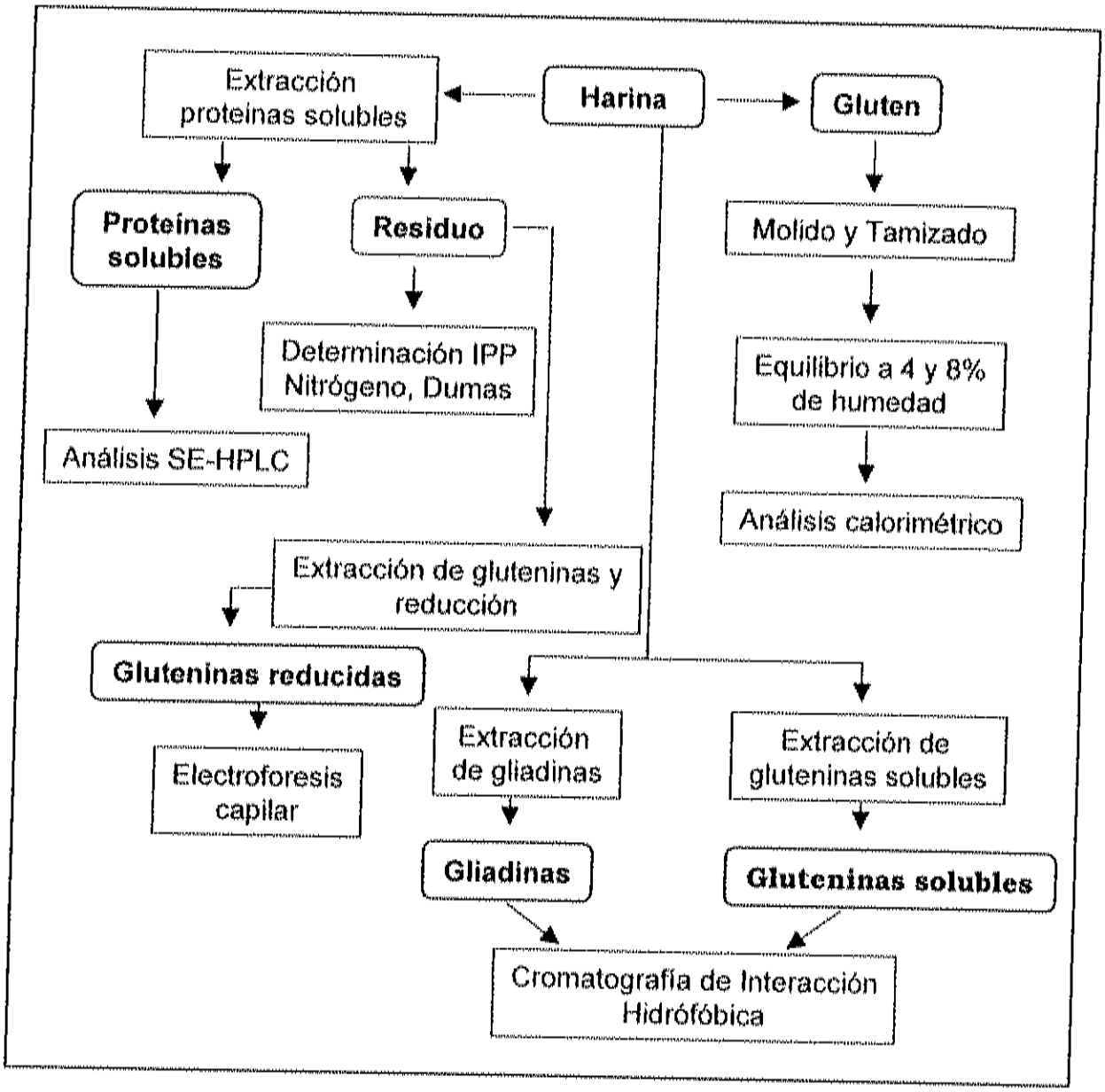

Fig. 20. Diagrama de la experimentación. Determinación de la transición vítrea del gluten y características químicas de sus proteínas. IPP, proteína polimérica insoluble; SE-HPLC, cromatografía de exclusión molecular de alta presión.

AZ). El *buffer* BioRad CE SDS, conteniendo 15 % de etilen glicol. Las condiciones de electroforesis fueron una corriente de 8 Kv, una temperatura de 30 °C y un tiempo de inyección de 15 seg a 0.15 psi (Bean y Lookhart 2000).

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Dos gramos de harina se extrajeron con 10 ml de ácido acético 0.7 M por una hora, agitando cada 30 min. La solución se centrifugó a 10,000 x g a 5°C por 15 min con una centrífuga refrigerada Beckman (J2-M1 Beckman Instruments Inc.). Las gliadinas y las gluteninas solubles se precipitaron con cloruro de sodio 0.25 M, procedimiento reportado por Lew y Col. (1989). Las gliadinas se extrajeron del *pellet* con 70% etanol y las proteínas residuales (gluteninas solubles en ácido) se solubilizaron en ácido acético 0.7M conteniendo 50% propanol y 0.25% ditiotreitol (DTT). Para preparar las proteínas para la cromatografía, estas se dializaron en un *buffer* de acetato de sodio 7 mM, pH 3.6.

Agarosa altamente acetilada (HA) se usó como matriz hidrofóbica. Ésta se sintetizó con agarosa entrecruzada (CL-6B, Pharmacia, Upsala, Suecia) y anhídrido acético con piridina (Vázquez-Moreno y Col. 1992). Un ml de HA se empacó en columnas de 0.7 cm de diámetro. Durante la cromatografía se empleó el sistema controlador y la bomba peristáltica del instrumento "Econo-System" de BIO-RAD. El *buffer* de equilibrio fue acetato de sodio 7 mM a pH 3.6. Las gliadinas y gluteninas solubles se aplicaron a la columna en cantidades de 2 mg. La elución se llevó a cabo en pasos, con el *buffer* de acetato de sodio de pH 3.6, incrementando las concentraciones de propanol en una secuencia similar a la reportada por Magnus y Khan (1992). El último fue *buffer* Tris 0.015M en Urea 8M.

El contenido de proteína de las fracciones y de las soluciones de proteína fue determinado por el procedimiento de Bradford (1976).

Se le llamó índice de hidrofobicidad (HGLI y HGLUS para gliadinas y gluteninas solubles respectivamente) a la proporción de proteína eluída en las fracciones juntas, desde la que contenía 40% propanol hasta la que contenía Urea 8M.

Contenido de Proteína Polimérica Insoluble

Se utilizó el procedimiento reportado por Bean y Col (1998). Las harinas (250 mg) se extrajeron tres veces con 1 ml de propanol. Las muestras se agitaron continuamente por 5 min para cada extracción usando un agitador vortex equipado para contener 30 viales (Vortex Genie2, Scientific Industries, Bohemia, NY). Las muestras se centrifugaron posteriormente en una centrífuga Eppendorf 5415C a 8160 x g por 2 min y el sobrenadante de las dos primeras extracciones se conservó para su posterior análisis por cromatografía de exclusión molecular.

A los *pellets* se les trató con 1 ml de acetona para remover el solvente residual y facilitar el secado. La acetona se descartó después de centrifugar. Los *pellets* se secaron en una horno de convección a 130°C por 1 hora. Se analizó el contenido de nitrógeno en los *pellets* secos en un determinador de nitrógeno LECO FP-428 (St. Joseph, M.I.). Se usó el factor de conversión de 5.7 para calcular los contenidos de proteína.

Cromatografía de Exclusión Molecular

Las proteínas solubles, extraídas con propanol se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) Hewlett-Packared 1090 A, usando una columna para exclusión molecular Waters ProteinPak 300SW. Las condiciones de separación las describen Batey y Col. (1991). El solvente de elución fue acetonitrilo y agua en una proporción del 50%, conteniendo además 1% de ácido trifluoroacético. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C.

Temperatura de Transición Vítrea

Se determinó la temperatura de transición vítrea al gluten liofilizado, desintegrado para formar polvo, secado por doce horas en una estufa con vacío y equilibrado a 4 y 8% de humedad por al menos 24 horas.

Se utilizó un microcalorímetro de barrido diferencial (Calorimetry Sciences Corp. CSC, Utah), cuyas características incluyen cuatro celdas herméticas de 1 cc, una línea base de ± 1μW y una capacidad de barrido de –30 a 110°C. Los barridos calorimétricos se hicieron de –20 a 110 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La temperatura de las transiciones se identificó en la mitad de la transición de segundo orden de la capacidad calorífica (Cp), (Slade y Levine 1989). Se utilizó la primera derivada de Cp/T, para identificar la temperatura de las transiciones, se midió donde la primera derivada alcanza su máximo. Las muestras de gluten analizadas tuvieron un peso aproximado a los 50 mg. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Análisis Estadístico

Se hizo estadística descriptiva y análisis de varianza utilizando el paquete estadístico STATISTICA (StatSoft, Inc. 1995).

Resultados

Temperatura de Transición Vítrea

La Fig. 21 muestra la primera derivada de la capacidad calorífica (dCp/dT) del gluten con 8% de humedad de las variedades estudiadas. Los máximos, que corresponden a los cambios en forma de escalón en la gráfica de capacidad calorífica contra tiempo, distintivos de una transición de segundo orden, estuvieron alrededor de los 20°C. Los valores encontrados fueron menores que los reportados anteriormente para la temperatura de transición vítrea (Hoseney y Col. 1988, Fujio y Lim 1989, Nichols y Col. 1995). La diferencia principal entre el presente estudio y los anteriores, que pudiera

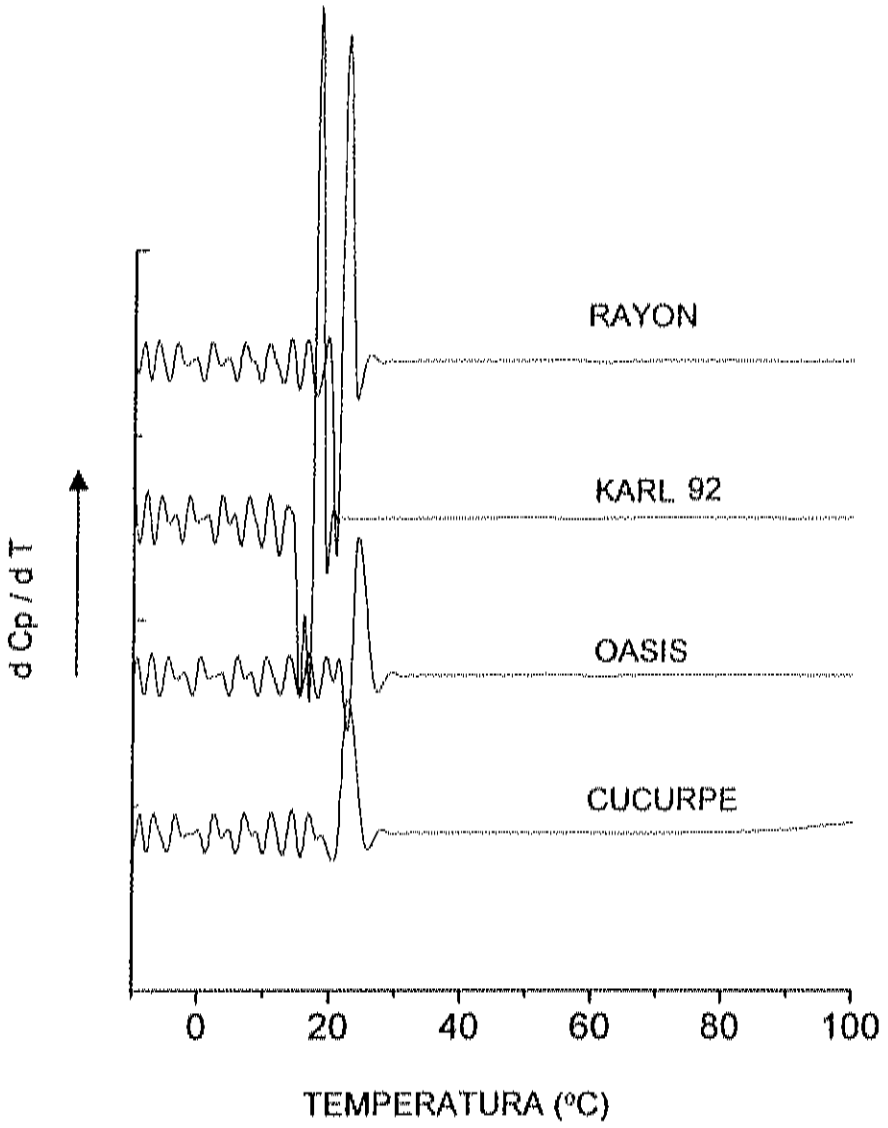

Fig. 21. Primera derivada de los termogramas de gluten con un contenido de humedad de 8%, calentado de –20 a 110°C.

explicar el que esta transición no haya sido reportada antes, es el uso de un método muy sensible como es la microcalorimetría. Estudios anteriores utilizaron calorimetría de barrido diferencial y termogravimetría. Otra diferencia es la forma en que se encontraba la muestra; se usaron en otros estudios, películas o láminas de gluten, mientras que para el presente estudio la muestra se encontraba en forma de polvo.

Es importante hacer notar, que la transición encontrada coincide con datos de movilidad molecular observados mediante resonancia magnética nuclear, espectroscopia dinámica y con los datos de fracturabilidad de gluten y productos de trigo, que con un contenido de humedad similar ocurren a temperatura ambiente (Roudaut y Col. 1999, Fontanet y Col. 1997, Le Meste y Col. 1996, Gontard y Ring 1996) .

Otras regiones del termograma no presentaron transiciones tan claras como las descritas que ocurrieron alrededor de los 20°C. Reescalando la sección del termograma de 30 a 110°C, se observó una transición endotérmica pequeña (1.10 a 1.39 J/g, error estándar promedio de las mediciones, 0.09) que varió entre 52 a 54 °C para los gluten de las diferentes variedades (Fig.22). Se observó también un cambio en la línea base inmediatamente después de la transición endotérmica. Se consideró que la primera transición de primer orden corresponde a un mismo fenómeno de relajación, por lo que la temperatura de transición vítrea se midió en la primera inflexión de la curva. Este valor de la transición está más cercano a los reportados anteriormente para la transición vítrea. No se observó una relación aparente entre la temperatura de transición vítrea y las características químicas de las proteínas del gluten.

En la Fig. 23 se muestran las temperaturas de la transición, observada cerca de la temperatura ambiente (Sub Tg), del gluten con contenidos de humedad de 4 y 8%. Podemos observar que la temperatura de la transición sub Tg de gluten con 4% de humedad de la variedad Oasis fue mayor que la

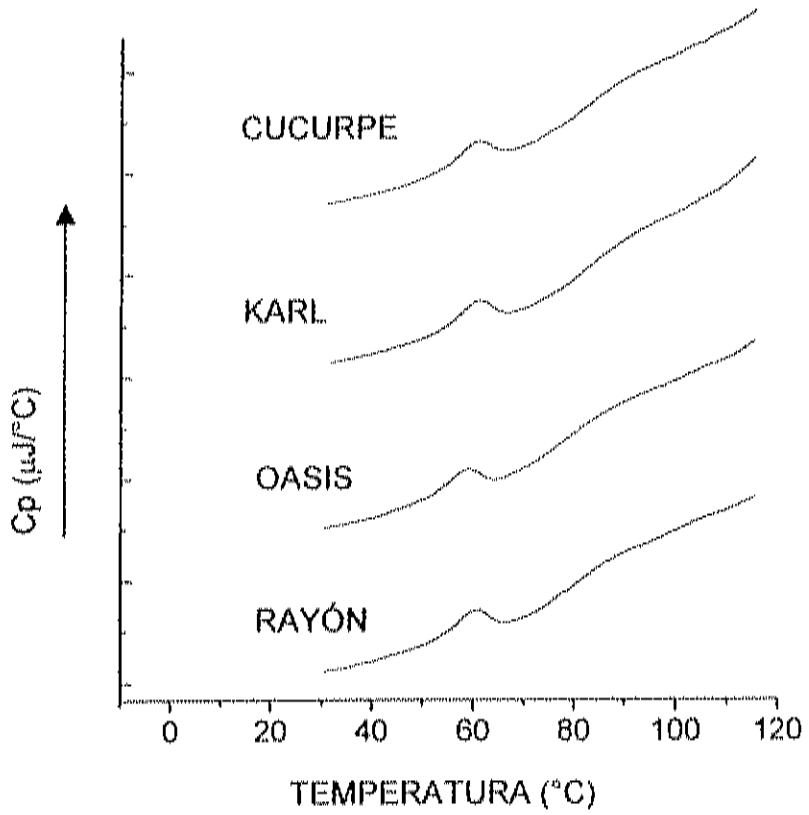

Fig. 22. Termogramas de gluten de trigo, obtenidos con microcalorimetría de barrido diferencial, recortado a partir de 30°C y la gráfica reescalada.

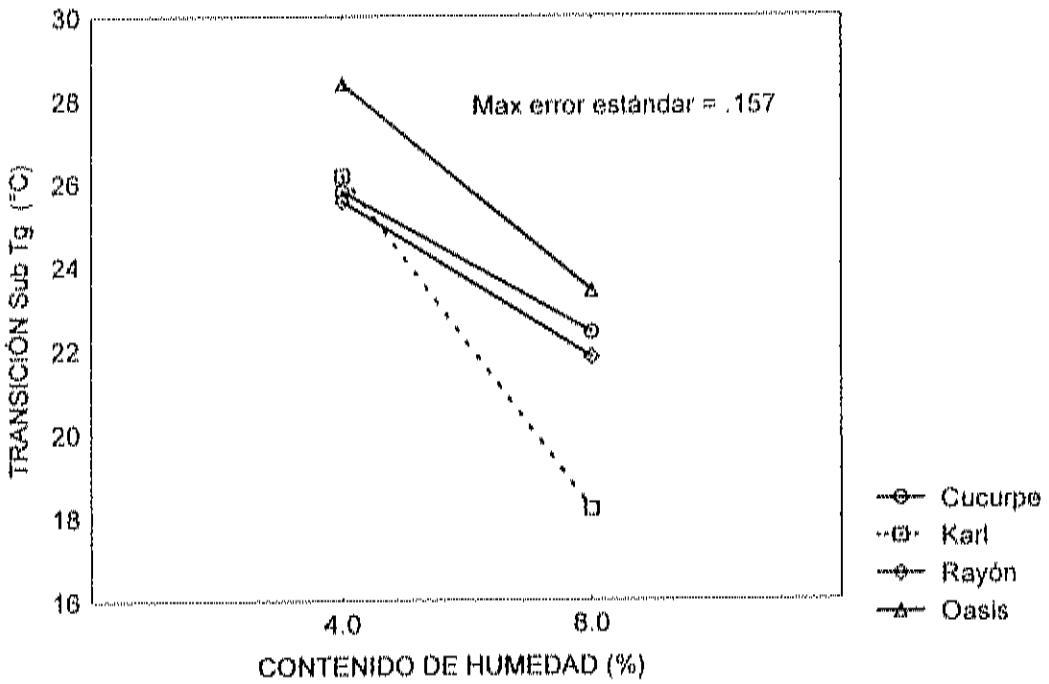

Fig. 23. Temperatura de la transición de segundo orden observada a baja temperatura en barridos calorimétricos de gluten con 4 y 8% de humedad.

del resto. Así mismo se puede observar que en gluten con 8% de humedad se puede hacer una distinción de la temperatura de transición entre variedades. Las temperaturas de transición de gluten con 8% de humedad fueron significativamente diferentes ($p<0.01$) entre variedades.

Se observa también en la Fig. 23, que la línea que une las dos Tg tienen una pendiente diferente para el gluten de cada una de las variedades; con la salvedad de los pocos valores, podemos interpretar la pendiente como una disposición o sensibilidad a ser afectados por la presencia de agua.

Composición de Subunidades Gluteninas de Masa Molecular Alta

La composición de las gluteninas de masa molecular alto es un criterio importante para seleccionar y predecir la calidad y uso final de las variedades de trigo (Payne 1984). La presencia del par de subunidades 5+10 se ha relacionado con fuerza de la masa, que se refleja en una buena calidad de panificación. Este par de subunidades se encuentra en tres de las variedades estudiadas: Karl, Oasis y Rayón (Fig. 24), que son variedades de trigo destinadas a panificación. La variedad Cucurpe, que es de gluten suave contiene los pares de subunidades 13+16 y 2+12. Las variedades Karl y Oasis tienen la misma composición de gluteninas de peso molecular alto. No se observó una relación clara entre la composición de la fracción de subunidades de gluteninas de peso molecular alto y las temperaturas de las transiciones observadas. Lo que se observa es que las variedades con mayor pendiente, Karl y Oasis contienen las subunidades 5+10, aunque la variedad Rayón también las contiene.

Hidrofobicidad Superficial de Gluteninas Solubles

Las Figuras 25 y 26 muestran los patrones de elución de gliadinas y gluteninas respectivamente, obtenidos por cromatografía de interacción hidrofóbica. Se observa en general, que tanto gliadinas como gluteninas solubles se adsorbieron fuertemente a la matriz. Fueron necesarias

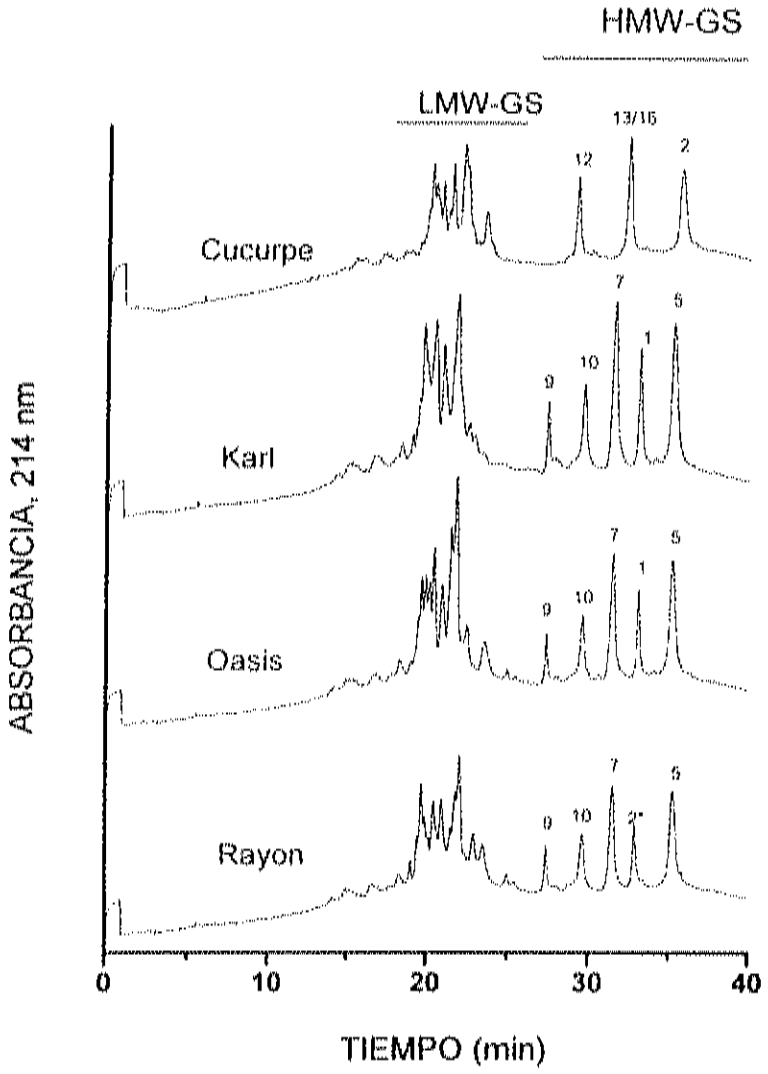

Fig. 24. Separación de la fracción insoluble de gluteninas de 4 variedades de trigo, con electroforesis capilar: el *buffer* de corrida, Bio Rad CE SDS. LMW-GS, subunidades de masa molecular baja; HMW-GS, subunidades de glutenina de masa molecular alta.

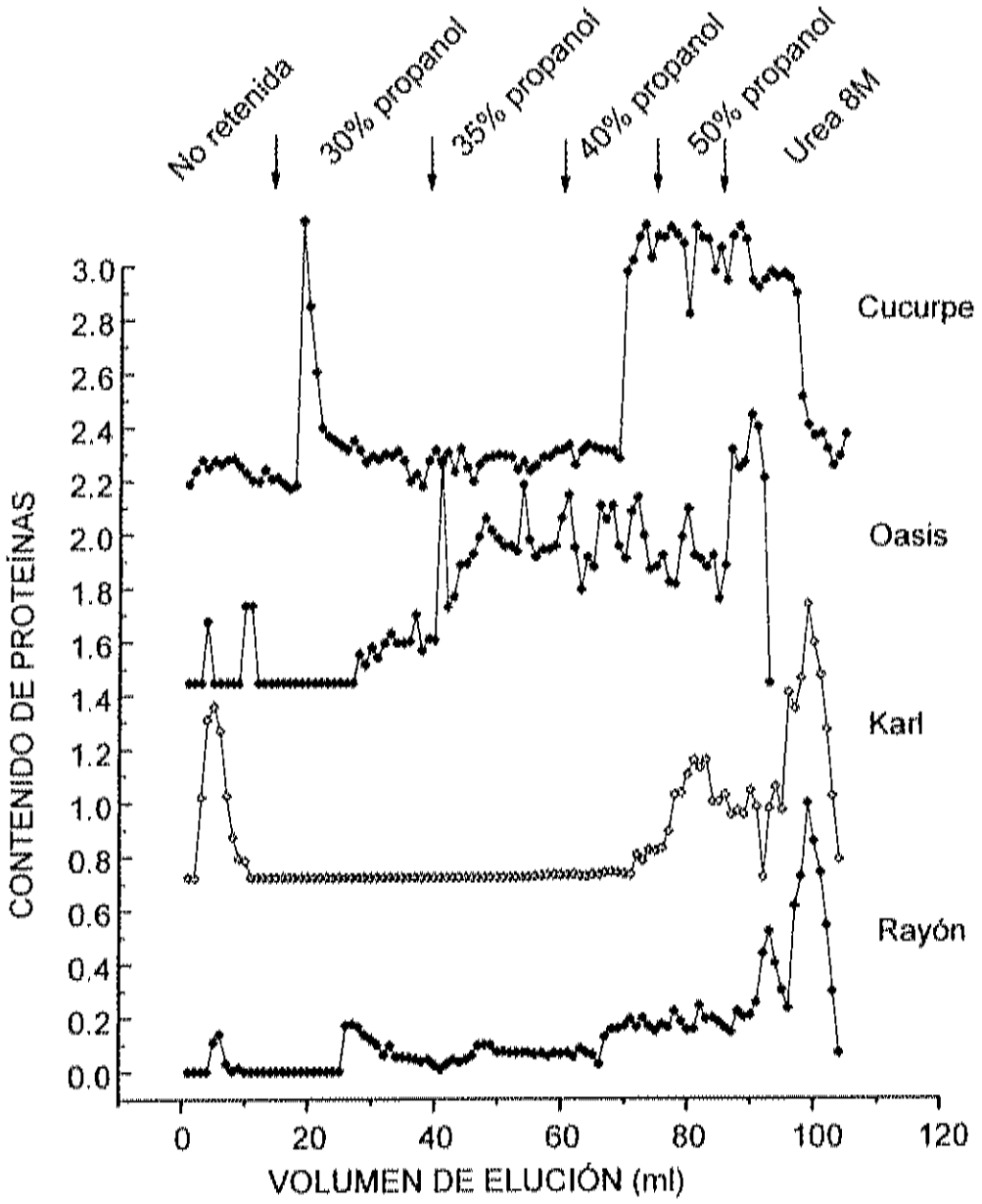

Fig. 25. Perfil de elución de gliadinas de 4 variedades de trigo en cromatografía de interacción hidrofóbica en agarosa altamente acetilada y eluídas en pasos con *buffer* de acetato de sodio 7 mM, pH 3.6, con concentraciones crecientes de propanol.

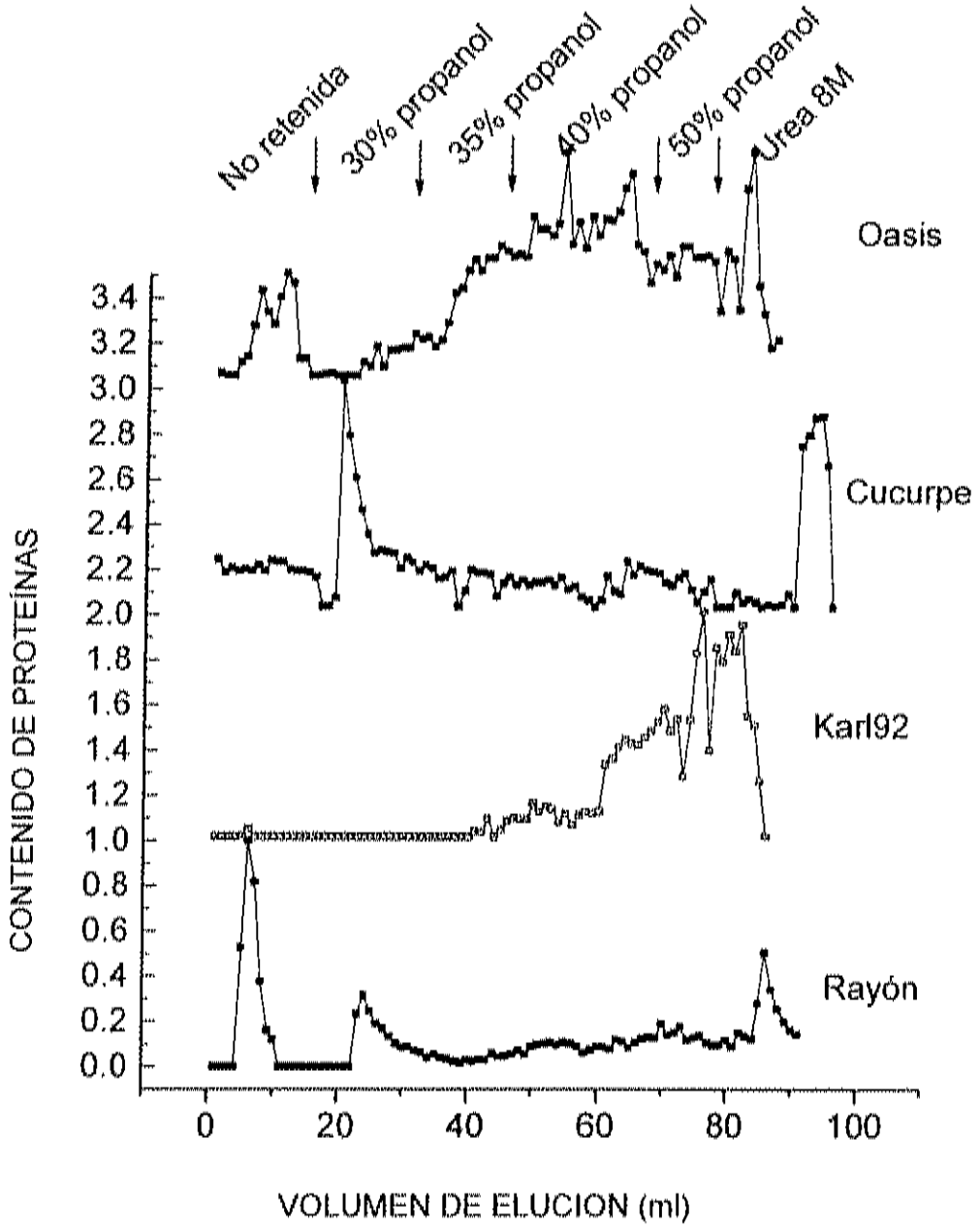

Fig. 26. Perfil de elución de gluteninas solubles en ácido de 4 variedades de trigo en cromatografía de interacción hidrofóbica, usando agarosa altamente acetilada y eluídas en pasos con *buffer* de acetato de sodio 7 mM, pH 3.6, con concentraciones crecientes de propanol.

cantidades iguales o mayores que 30% de propanol para que la proteína comenzara a eluir y en algunos casos como en las gliadinas de Cucurpe y las gluteninas solubles de Karl 92 se necesitaron concentraciones de propanol mayores que 40% para que esto sucediera.

Se observaron diferencias claras en los patrones de elución para los dos tipos de proteínas en las variedades de trigo estudiadas. Se le llamó índice de hidrofobicidad de gliadinas (HGLI) y de gluteninas solubles (HGLUS) a la proporción de proteínas eluídas en las fracciones mas hidrofóbicas, a partir de la fracción con 40% propanol, incluyendo hasta la eluída con urea 8M. En la Fig. 27 se muestran los índices de hidrofobicidad de gliadinas y gluteninas solubles en ácido acético de las cuatro variedades de trigo estudiadas. Se observa claramente que la hidrofobicidad superficial de las proteínas del gluten de la variedad de trigo Karl tienen una mayor hidrofobicidad superficial, especialmente las gluteninas solubles.

Se observó una relación entre la pendiente de la linea que une las temperaturas de transición a 4 y 8% de humedad y HGLUS con un valor de la regresión de 0.99 ($p<0.05$), (Fig. 28). Aún cuando son pocos los datos, el valor de la regresión es muy alto. Si consideramos la hidrofobicidad de los polimeros solubles un reflejo de la hidrofobicidad del polimero de glutenina, la relación entre hidrofobicidad superficial y facilidad de plastificación sugiere la cooperatividad entre puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en las interacciones proteína-proteína en el gluten. Se ha reportado (Nakai 1988) que la energía de unión de los puentes de hidrógeno en un ambiente dieléctrico bajo (ambiente hidrofóbico), es mayor.

Tamaño Molecular

La Figura 29 muestra los patrones de elución en cromatografía de exclusión molecular de alta presión de las proteínas solubles del gluten. Las proteínas solubles están compuestas por gluteninas poliméricas solubles (bajo peso molecular), gliadinas (monómeros) y albúminas y globulinas.

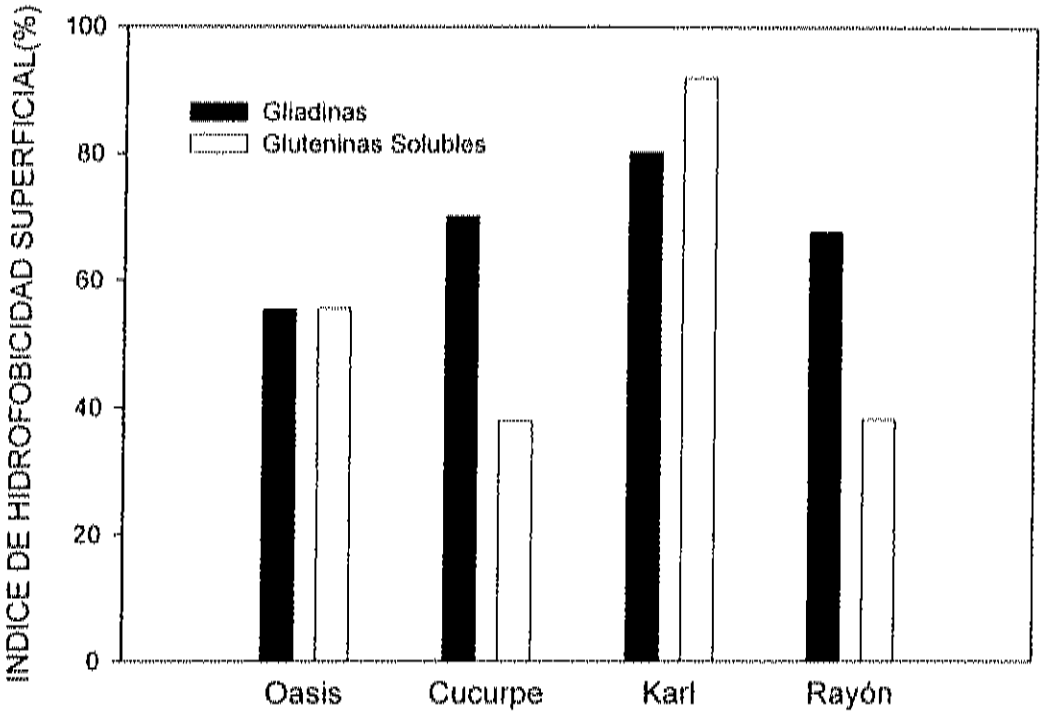

Fig. 27. Indice de hidrofobicidad superficial (proteina eluida en las fracciones mas hidrofóbicas en HIC) de 4 variedades de trigo. Diferencia mínima significativa: 3.1 ($p<0.05$).

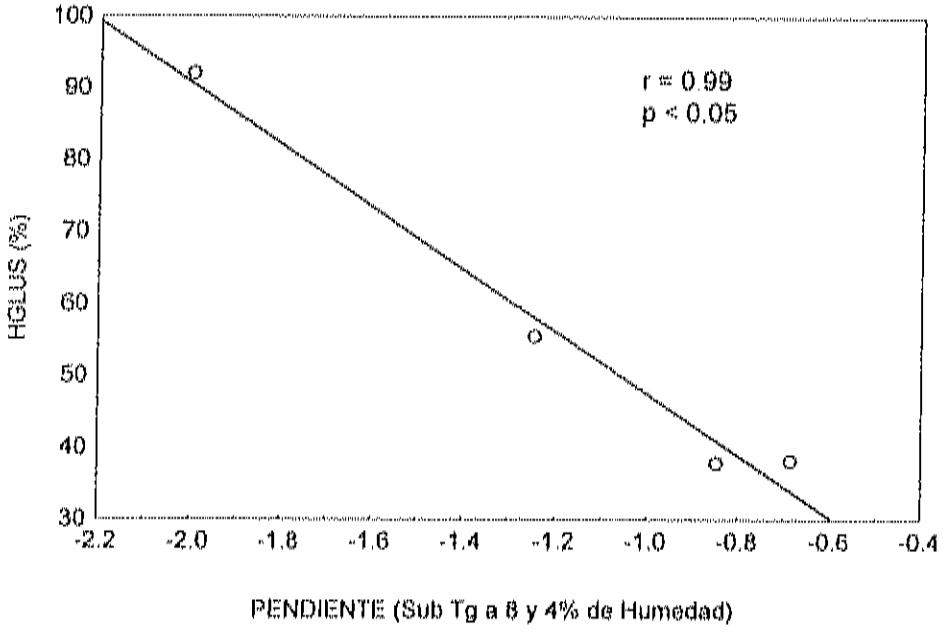

Fig. 28. Relación entre la pendiente (transición sub Tg/contenido de humedad del gluten) e índice de hidrofobicidad de gluteninas solubles (HGLUS).

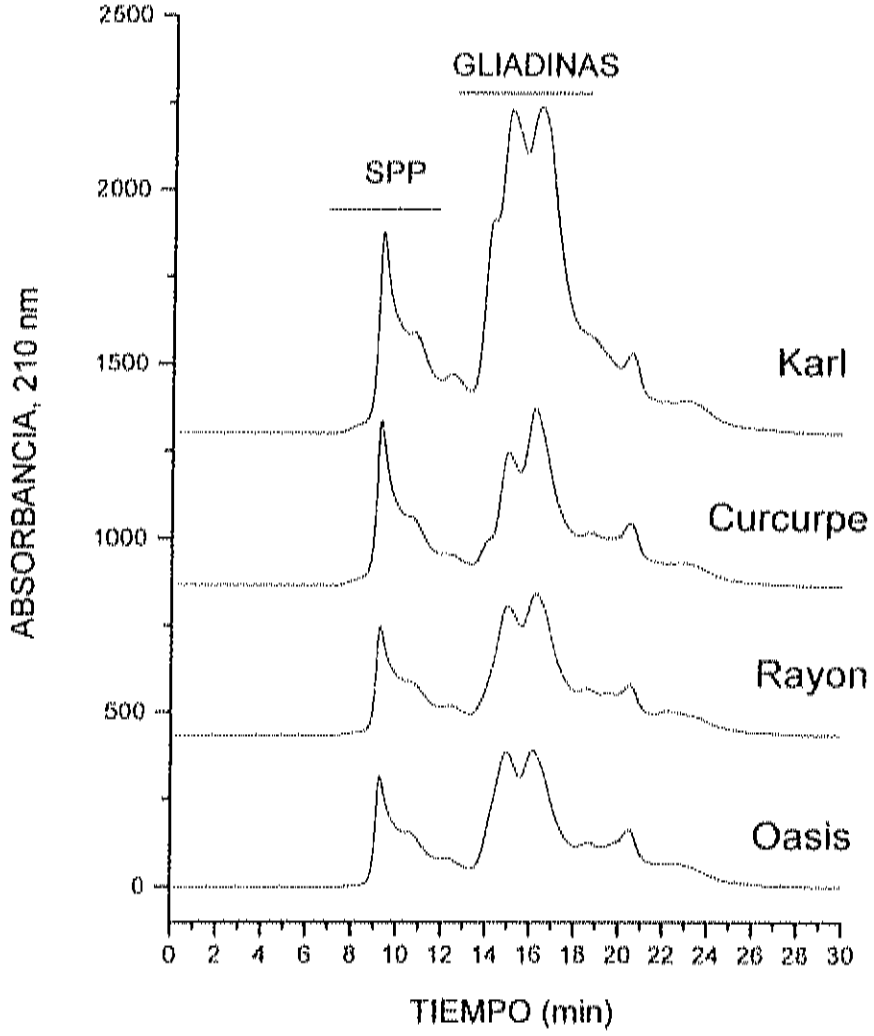

Fig. 29. Separación de las proteínas solubles de 4 variedades de trigo por cromatografía de exclusión molecular de alta presión (SE-HPLC). SPP, proteínas poliméricas solubles.

La proporción entre gliadinas y gluteninas solubles difiere en las variedades. Puede deberse a un mayor contenido de gliadinas en la variedad o en un contenido menor de proteína polimérica soluble, reducida en cantidad por la formación del polímero de glutenina insoluble. La TABLA IX muestra la proporción de gliadinas, glutenina polimérica soluble y glutenina polimérica insoluble. No se observó una relación entre las temperaturas de transición y la proporción en la composición de las proteínas solubles.

Sin embargo, se observó una clara relación entre el contenido de proteína polimérica insoluble (IPP) expresada como proporción del contenido de proteína de la harina (Fig. 30). A mayor IPP (%), mayor la temperatura de transición en gluten con 8% de humedad. En la variedad Karl, aunque ésta sigue el mismo patrón de comportamiento, la reducción en temperatura de transición es mucho mayor en relación a la reducción en IPP (Fig. 30). En la Fig. 27 se observa que la variedad Karl tiene un mayor HGLUS (mayor proporción de gluteninas solubles hidrofóbicas), que puede ser un reflejo de la hidrofobicidad superficial del polímero insoluble de glutenina. Esta es la diferencia mas obvia, que puede explicar el comportamiento diferente de la variedad Karl.

Mayor contenido de proteína polimérica insoluble corregida por el contenido de proteína de la harina, significa un mayor entrecruzamiento a través de enlaces disulfuro. Se ha reportado que la presencia de entrecruzamientos u oxidación en gluten produce una reducción de la movilidad o rigidez de la cadena polimérica que se refleja en mayores Tg (Cherian y Chinachoti 1997, Lefebvre y Col. 2000). En este caso, no se observó una relación entre IPP y la Tg, pero si entre el contenido de proteína polimérica insoluble (IPP) y la temperatura de transición sub Tg en gluten con 8% de humedad.

TABLA IX

Proporción de Gliadinas, Gluteninas Poliméricas Solubles y Gluteninas Poliméricas Insolubles de las Proteínas del Gluten

Trigo Variedad	Harina Proteína (%)	Proteínas de Gluten Gliadinas[a] (%)	Gluteninas solubles[a] (%)	Gluteninas insolubles[b] (%)
Cucurpe	10.48	41.37	25.21	33.42
Karl	15.10	49.70	15.51	34.79
Oasis	11.06	39.25	19.31	41.44
Rayon	10.22	39.36	19.64	41.00

[a] Obtenidos por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

[b] Obtenidos por determinación de nitrógeno (método de Dumas).

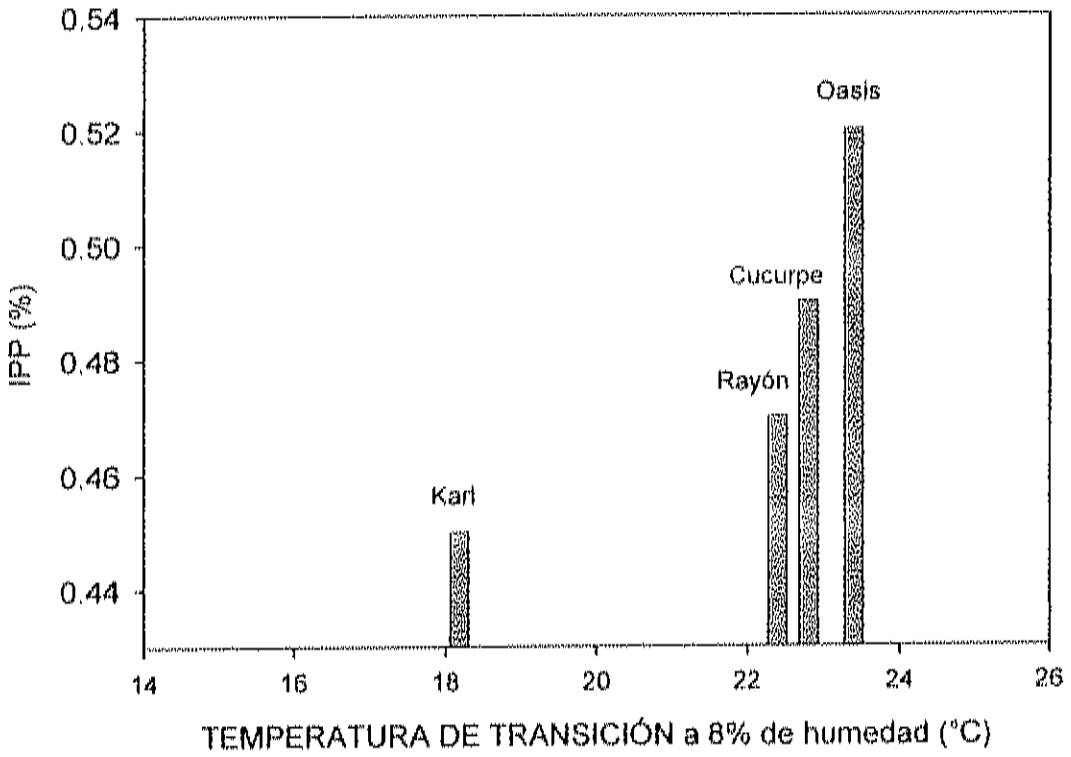

Fig. 30. Relación de la temperatura de transición Sub Tg medida con el calorímetro de barrido diferencial y proteina polimérica insoluble (IPP).

Discusión

La presencia de una transición en el gluten con bajo contenido de humedad, que ocurre alrededor de la temperatura ambiente no se había reportado en estudios que utilizaron calorimetría de barrido diferencial, aunque tampoco se encontraron estudios de gluten en donde se usara un calorímetro de la sensibilidad del empleado en el presente estudio. Esta transición fue sensible a los cambios de humedad y se comportó como una transición del tipo vítreo.

Los efectos de las características de la composición química de las proteínas en esta transición fueron similares a los que pudieran esperarse en una transición vítrea de un polímero hidrofílico (Hatekayama 1999). Por ejemplo, la oxidación de los grupos sulfidrilo que aumenta el tamaño molecular por la formación de enlaces disulfuro y por lo tanto la viscosidad y la rigidez de la cadena, aumenta la Tg (Cherian y Chinachoti 1997, Lefebvre y Col. 2000); el entrecruzamiento que resulta de la formación o la presencia de enlaces disulfuro tiene un efecto restrictivo en el movimiento de la cadena principal (Hatakeyama 1999). En el presente estudio, gluten con mayor contenido de proteína polimérica insoluble presentó mayor temperatura de transición. También el efecto de la diferencia en hidrofobicidad superficial entre las proteínas del gluten (Hatekayama 1999) pudo observarse en esta transición. El gluten con mayor contenido de gluteninas solubles hidrofóbicas presentó una mayor temperatura de transición.

Esta transición coincide con fenómenos reportados que ocurren por debajo de la temperatura de transición vítrea. Roudaut y Col. (1999) usando espectroscopia mecánica detectaron dos eventos diferentes cuando calentaron pan con un contenido bajo de humedad (≤ 9%). Un máximo en la pérdida de tangente se observó a aproximadamente a 10 °C y se atribuyó a una relajación secundaria debido a la reorientación o vibración de los grupos laterales o pequeños segmentos de polímeros. El segundo evento se centró en 60°C y se atribuyó al rompimiento de interacciones de baja energía como enlaces de

hidrógeno entre agua y el biopolímero. Los mismos autores usando resonancia magnética nuclear, asociaron el componente de relajación rápida (T2) con el agua presente en el pan. Este (T2) mostró un incremento exponencial desde temperaturas bajas hasta 20°C donde exhibió un máximo y decreció hasta 80°C. La parte que se incrementó de T2 se caracterizó por una energía de activación aparente de 19 kJ/mol, cercano a el valor del rompimiento de los puentes de hidrógeno. Le Meste y Col. (1996), observaron que en productos de cereales con bajo contenido de humedad (10%) el mecanismo de fractura fue particularmente afectado por una transición vítreo-ductil, que ocurre a temperatura ambiente, mientras que los productos estaban aparentemente en estado vítreo. Fontanet y Col. (1997) estudiando el efecto del agua en las propiedades mecánicas de panes planos con bajo contenido de humedad (9%) observaron también una transición de vítreo a dúctil a temperatura ambiente.

La plastificación o reducción de la temperatura de transición vítrea por efecto del agua se explica por un aumento del volumen libre que permite una mayor movilidad de las moléculas (Sears y Darby 1982). No se puede sin embargo dejar de lado las interacciones entre cadenas y el papel tan importante que juega la presencia del agua en esas interacciones. Los polímeros hidrofílicos o que tienen componentes hidrofílicos como grupos hidroxilo o grupos amida forman enlaces intermoleculares en presencia de agua y presentan una mayor Tg que un polímero similar con componentes hidrofóbicos (Hatakeyama 1999). La movilidad molecular se restringe debido a los puentes de hidrógeno. Ahora, la adición de una mayor cantidad de agua, rompe estas interacciones y la Tg se mueve a temperaturas mas bajas (Hatakeyama 1999). La reducción de la temperatura de transición vítrea puede ocurrir debida al reemplazo de los enlaces de hidrógeno entre polímeros por enlaces mas lábiles proteína-agua (Kalishevsky y Col. 1992).

Se observa una mayor sensibilidad al efecto del agua en gluten con contenidos bajos de humedad (menores que 10%) (Gontard and Ring 1996).

El haber hecho los estudios en gluten con contenidos bajos de humedad (4 y 8%) nos permitió diferenciar el efecto de la hidrofobicidad superficial.

En el termograma, inmediatamente antes del cambio en forma de escalón de la línea de Cp, se observa un pico. Este fenómeno ya ha sido reconocido anteriormente (Hatakeyama 1999) y se le llama relajación de la entalpía. Los polímeros amorfos, que se encuentran por debajo de la transición vítrea no están en equilibrio termodinámico y se relajan hacia el equilibrio con el tiempo. Por esta razón, la entalpía de un polímero vítreo decrece en función del tiempo, si la muestra se mantiene a una temperatura por debajo de la Tg. A este fenómeno se le llama relajación de la entalpía y se monitorea a través del cambio de Cp en la transición vítrea (Hatakeyama 1999).

Por limitaciones del equipo, no se pudo medir la Tg en gluten con 4% de humedad, ya que ésta ocurre a temperaturas más altas que el rango posible de calentamiento en el calorímetro, por lo que se contó con menos datos que en el caso de la transición observada a temperatura ambiente para analizar la relación entre las características químicas de las proteínas del gluten y la Tg.

Conclusiones

Se determinó una transición en la región vítrea (sub –Tg) del gluten con bajo contenido de humedad. Esta transición ocurrió aproximadamente en la región de temperatura que podemos llamar ambiente. Esta transición fue sensible a los cambios de humedad.

Una sensibilidad mayor al efecto del agua para esta transición se encontró en gluten cuyas gluteninas solubles tuvieron una hidrofobicidad superficial relativa mayor.

Mayor contenido de proteína polimérica insoluble, reflejo del tamaño molecular y del entrecruzamiento, afectó la temperatura de transición,

presentándose mayores temperaturas en gluten con mayor contenido de proteína polimérica insoluble.

Por el contrario, no hubo mucha variación entre las temperaturas de transición vítrea del gluten de las variedades estudiadas y no se observó una relación entre las características químicas de las proteínas del gluten y esta Tg.

CAPÍTULO VI

CONTRIBUTION OF HYDROPHOBIC SOLUBLE GLUTEN PROTEINS, FRACTIONATED BY HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY IN HIGHLY ACETYLATED AGAROSE, TO DOUGH RHEOLOGICAL PROPERTIES

Contribution of Hydrophobic Soluble Gluten Proteins, Fractionated by Hydrophobic Interaction Chromatography in Highly Acetylated Agarose, to Dough Rheological Properties

P. I. Torres,[1,3] L. Vazquez-Moreno,[2] A. I. Ledesma-Osuna,[3] and C. Medina-Rodriguez[3]

Cereal Chem. 77(6):702–707

ABSTRACT

Hydrophobic interaction chromatography with highly acetylated agarose in 1-mL columns was used to fractionate gliadins and acid-soluble glutenins. Proteins were eluted in two fractions, the first with acetate buffer (pH 3.6) containing 35% propanol, and the second with Tris buffer in 8*M* urea. The proportion of eluted protein in the second fraction was called the surface hydrophobicity index. The study included 20 wheat samples of different baking qualities. Multiple regression analysis using the general linear model combined with the stepwise technique was used to relate the surface hydrophobicity index of soluble gluten proteins to specific dough rheological characteristics. Surface hydrophobicity index of gliadins and acetic acid soluble glutenins explained part of the variability of swelling index, extensibility, and work of deformation (dough strength) measured with the alveograph, and part of the farinograph water absorption variability, but showed no relationship to dough mixing characteristics. Hydrophobic soluble gluten proteins fractionated by hydrophobic interaction chromatography (HIC) explained a part of the variability of dough rheological properties.

Important characteristics of gluten proteins are aggregation properties and low solubility in water. The high proportion (30–40%) of amino acids residues with nonpolar and neutral chains and the low amount of ionizable amino acids are responsible for this low solubility (MacRitchie 1992). Differences in solubility of gliadins and soluble glutenins in alcohols of different alkyl chain length (propanol > ethanol > methanol) (Bean et al 1998) clearly show the importance of the hydrophobicity of these proteins. The hydrophobic interactions, along with hydrogen bonds and covalent disulfide bonds, define the aggregation properties of gluten proteins and make an important contribution to the rheological properties of gluten and dough (Popineau and Pineau 1987).

The surface hydrophobicity of gluten proteins has been studied using different methods. Greene and Kasarda (1971) and Popineau and Pineau (1987) used hydrophobic probes to study gliadins. Preston (1984) studied the aggregation of gluten proteins in the presence of neutral salts of the lyotropic series. In a recent study (Bean and Lookhart 1998), the selective extraction of HMW glutenin subunits in the presence of a nonchaotropic salt was explained by the aggregation of monomeric gliadins to a backbone of polymeric glutenin, possibly through hydrophobic interactions.

Reversed-phase (RP) HPLC has been used to study the hydrophobicity of gluten proteins (Burnouf and Bietz 1985). The most important contribution of this methodology has been the identification and quantitation of the protein species. It is useful in varietal identification (Huebner and Bietz 1994a) and in relating protein groups to quality (Huebner and Bietz 1994, Wieser et al 1994b). Van Lonkhuijsen (1992) used RP-HPLC to relate a highly hydrophobic γ-gliadin to loaf volume and Zeleny sedimentation value. Huebner et al (1997) also found a very high correlation (0.93) between γ-gliadin peaks and loaf volume. Reconstitution studies show the beneficial effects of hydrophobic gliadins on breadmaking quality of flours (Weegels et al 1996).

Hydrophobic interaction chromatography (HIC) has also been used to study gluten proteins. Cadwell (1979), Popineau and Pineau (1987), and Popineau and Godon (1982) used HIC successfully to fractionate and to study surface hydrophobicity of gliadins. Chung and Pomeranz (1979) used HIC in phenyl sepharose as the matrix to separate soluble glutenins and found that glutenins from low quality flours were less hydrophobic than those from good quality. Magnus and Khan (1992) found similar results when separating reduced and alkylated glutenins using phenyl sepharose.

Many studies have shown that a small number of HMW glutenin subunits are related to flour quality, especially mixing characteristics and bread volume (Payne et al 1979, Branlard and Dardevet 1985). On the other hand, this small number of polypeptides explains only a part of the variability of dough rheological characteristics and flour quality (Graybosch et al 1990). While the contribution from individual polypeptides is obviously important, it is the interactions of all proteins that determines gluten quality (Boseney et al 1987, Primard et al 1991).

In this study, gliadins and acid-soluble glutenins were fractionated according to surface hydrophobicities using HIC in highly acetylated agarose. The small acetyl chains in the agarose matrix and the high density of substitution were used as an alternative to phenyl or larger alkyl chains of commercial products. The more hydrophobic fraction, called the surface hydrophobicity index, was related in a wide context and using a range of qualities in flour mainly from wheat cultivated in Mexico to specific dough rheological characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Wheat

Twenty wheat samples (from 1997 and 1998), including commercial and experimental materials, from four quality groups were used: 1) strong gluten; 2) medium strong gluten; 3) weak gluten, and 4) tenacious gluten (as classified by the Norma Oficial Mexicana, NMX-ff-036-1996-SCFI). The samples included the cultivars, Rayon, Ariveehi, Oasis, Opata, INIFAP, Tobarito, Cucurpe, Biavacora, and Tepoca. The cultivar Karl 92 (hard red winter wheat, crop 1996) was included. Wheat was milled in an experimental roller mill (Brabender Sr.).

Flour Quality

Flour protein content was determined by the micro-Kjeldahl method (N × 5.7). Water absorption, dough development time, and stability were measured with a farinograph (Brabender 881043). Swelling index (*G*), resistance to deformation or tenacity (*P*), and work of deformation (*W*) of the dough were measured with a Chopin alveograph. Sedimentation test was also performed using Approved Methods (AACC 2000).

[1] Graduate student, Centro de Investigacion en Alimentacion y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, Mexico. E-mail: pitorres@guayacan.uson.mx

[2] Corresponding author: Professor, Centro de Investigacion en Alimentacion y Desarrollo. Carretera a la Victoria Km 0.6, Apdo. Postal 1735 C.P. 83000. E-mail: lvazquez@cascabel.ciad.mx Phone: (62) 800058.

[3] Researcher, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico.

Publication no. C-2000-1010-02R.

© 2000 American Association of Cereal Chemists, Inc.

Extraction of Gluten Proteins

Flour (2 g) was extracted with 10 mL of 0.7*M* acetic acid for 1 hr agitating every 30 min. Tubes were centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min at 5°C with a refrigerated centrifuge (J2-M1, Beckman Instruments). Gliadins and acid-soluble glutenins (s-glutenins) were precipitated with 0.25*M* NaCl, procedure reported by Lew et al (1989). Gliadins were extracted from the pellet with 70% ethyl alcohol, and the residual proteins (acid-soluble glutenins) were solubilized in 0.7*M* acetic acid containing 50% propanol and 0.25% dithiothreitol (DTT).

The original flour pellet was extracted with 0.7*M* acetic acid containing 50% propanol and 0.25% DTT, based in the procedure reported by Kruger and Marchylo (1990). This last fraction was called acid-insoluble glutenins (i-glutenins). Protein content of protein solutions and chromatographic fractions was determined by the Bradford dye-binding procedure (Bradford 1976), calibrated for gluten proteins. To prepare gluten proteins for chromatography, gliadins and acid-soluble glutenins were dialyzed in 7 m*M* sodium acetate buffer (pH 3.6) for 12 hr. The residual flour pellet was saved, dried, and protein content determined with the micro-Kjeldahl method. The ratio between pellet and flour protein contents (% dry basis) was used as an estimator of insoluble polymeric protein (IPP), based in the work reported by Bean et al (1998). However, differences in the procedure of extraction were the presence of acetic acid and a reducing agent in the solution, in addition to the 50% propanol.

Hydrophobic Interaction Chromatography

Highly acetylated agarose was used as the hydrophobic matrix. This was synthesized using cross-linked agarose (CL-6B, Pharmacia, Uppsala, Sweden), and acetic anhydride with pyridine as the catalyst (Vazquez-Moreno et al 1992). Acetylated agarose matrix (1 mL) was used in a column with a 0.7 cm diameter. Chromatography was made using a controller system and peristaltic pump (Bio-Rad Econo-System). The equilibrium buffer was 7 m*M* sodium acetate at pH 3.6. Two protein fractions (gliadins and acid-soluble glutenins) were applied onto the column in amounts of 2 mg (the capacity in the linear region of the isotherm was 8 mg/mL). The elution was in two steps. The first elution buffer was sodium acetate pH 3.6 containing 35% propanol, and the second was 0.015*M* Tris in 8*M* Urea. The flow rate was 0.5 mL/min. Buffer change was applied when fractions collected had a negligible protein content as estimated by the dye binding procedure (Bradford 1976). Recoveries were between 85 and 110%. The fraction eluted with 8*M* urea contained proteins that were more strongly bound to the hydrophobic matrix, and presumably had higher surface hydrophobicities. The proportion of protein eluted in the 8*M* urea fraction was called surface hydrophobicity index. The standard error of the proportion of protein eluted in the two fractions among repeated chromatographic runs was 2–3.5%.

Statistical Analysis

Descriptive statistical analysis was performed using the software Statistica (StatSoft, Inc.). Multiple regression, using the general linear model (Ott 1984) and the stepwise procedure was done using the SAS/STAT software (SAS Institute, Inc.). Additive effects of biochemical characteristics mainly from soluble gluten proteins with high surface hydrophobicity on dough rheological characteristics were studied.

RESULTS

Wheat Quality

The flours studied represented a wide range of qualities and exhibited a large variation in protein content, dough rheological characteristics, and sedimentation values (Table I).

TABLE I
Mean Values and Variation of Flour Quality Parameters of Wheat

	Mean	Min	Max	SD
Protein content (%)[a]	12.24	09.54	15.52	1.24
Sedimentation (mL)	29.61	20.40	44.97	7.92
IPP (%)[b]	0.35	0.29	0.42	0.03
Alveograph measurements (mm)				
Tenacity, *P*	85.55	53.90	130.24	22.88
Extensibility, *L*	88.73	52.40	149.50	28.64
Swelling index, *G*	20.83	16.40	27.75	3.57
P/G	4.56	2.00	7.90	1.78
Work of deformation, *W*	233.74	134.65	371.00	66.32
Farinograph measurements				
Absorption (%)	61.37	54.80	66.90	3.61
Development time (min)	6.14	1.30	10.70	2.31
Stability (min)	10.92	3.00	22.90	4.90

[a] N × 5.7
[b] Insoluble polymeric protein (ratio between pellet protein and flour protein).

TABLE III
Determination Coefficients for Models and Partials for Farinograph Variables[a]

Dependent Variable	Partial R^2	Model R^2	Prob > *F*
Stability			
IPP	0.45	0.45	0.0001
PROT	0.07	0.52	0.0271
HGLI	0.03	0.55	0.1096
Water absorption			
PROT	0.29	0.29	0.0003
SED	0.40	0.69	0.0001
HGLUS	0.07	0.77	0.0015
S-GLUT	0.04	0.81	0.0066
Development time			
IPP	0.11	0.11	0.0404
PROT	0.06	0.17	0.0978
SED	0.06	0.23	0.1068

[a] IPP, insoluble polymeric protein (ratio between pellet protein and flour protein). PROT, flour protein content; HGLI, surface hydrophobicity index of gliadins; SED, sedimentation; HGLUS, surface hydrophobicity index of soluble glutenins; S-GLUT, acid-soluble glutenins extracted.

TABLE II
Correlation Coefficients Between Dough Rheological Properies and Biochemical Characteristics of Gluten Proteins[a,b]

	SED	GLIA	I-GLUT	S-GLUT	*P*	*G*	*P/G*	*W*	ABS	DT	ST
PROT	0.52**	0.28*		0.34*		0.40**		0.49**	0.50**	0.25*	0.26*
HGLI		0.40*							0.34*		
HGLUS		0.38*									
SED			-0.26*		-0.39*	0.75**	-0.45*				
GLIA			0.33*								
IPP								0.40**		0.32*	0.68**
S-GLUT									0.34*		

[a] SED, sedimentation; GLIA, amount of extracted gliadins; I-GLUT, amount of extracted acid insoluble glutenins; S-GLUT, amount of extracted acid-soluble glutenins; *P*, tenacity; *G*, swelling index; *P/G*, symetry of alveograph curve; *W*, dough strength; ABS, farinograph absorption; DT, development time; ST, stability; PROT, flour protein content; HGLI, hydrophobicity index of gliadins; HGLUS, hydrophobicity index of soluble glutenins; IPP, insoluble polymeric protein.
[b] *,** significant at $P \leq 0.05$ and 0.01, respectively.

HGLUS explained 7% of this variability. Surface hydrophobicity index of gliadins (HGLI) also explained 1% of the variability. In multiple regression analysis, using the stepwise procedure, a 0.25% level of significance is recommended to avoid leaving important variables out of the model (Ott 1984). Because HGLI had a level of significance of 0.23%, this variable may be important in defining water absorption and might be more evident if a group of wheats with a smaller range in protein contents were used for the study.

Hydrophobic gluten proteins showed an opposite relationship to water absorption. For example, in Fig. 4A, HGLI shows a positive effect, while the effect of HGLUS is negative.

The variable that best explained dough farinographic stability (45%) was IPP (Table III). However, flour protein content and the surface hydrophobicity index of gliadins defined part of the farinographic stability variability (7 and 3%). In Fig. 4B, dough-mixing stability is greatly affected by IPP, whereas surface hydrophobicity index of gliadins has a negative effect on stability. It is interesting, that a destabilizing characteristic like hydrophobic gliadins positively affected water absorption. Findings agree with results reported earlier, where a strengthening and stabilizing effect such as the one expected by the hydrophobic interactions of glutenins is accompanied by decreased water absorption (Preston 1989).

Swelling Index

The variables that best explained swelling index (G) were the sedimentation value (76% of the variation), amount of the extracted i-glutenins, and surface hydrophobicity index of s-glutenins (HGLUS), (Table IV). These last two variables explained 3 and 2% of the variation, respectively. The multiple regression model explained 82% of the observed variability. Figure 5A shows the positive effect of sedimentation value and HGLUS. Preston (1984) observed increased extensibility (related to swelling index by a simple conversion) by the presence of high levels of a nonchaotropic salt and explained the effect by hydrophobic interactions between gluten proteins.

Dough Strength

Farinograph development time and alveograph tenacity (P) showed a relatively high ($R^2 = 0.73$) and very significant correlation ($P < 0.01$). These two variables were related and were defined by the same variables, but in different way. Tenacity was positively affected by IPP and negatively affected by the sedimentation value. On the other hand, the sedimentation value and IPP had a positive effect on dough development time.

The Zeleny sedimentation test provides a semiquantitative determination of the amount of glutenin macropolymer (Weegels et al 1996). Ciaffi et al (1996) found that the correlation between insoluble polymeric protein (left in the flour pellet after sonication) and P was better than the correlation between total polymeric protein and P. Our results are comparable to those obtained by Ciaffi (1996), even though the relationships were found in simple correlations that work, and we are using multiple regression and an indirect method (the sedimentation value) to index the polymeric protein. Both showed the relative importance of insoluble glutenin protein, defining P in regard to polymeric protein in flour.

Another way of estimating dough strength is using the alveograph parameter W, which is given by the area under the alveograph curve. Flour protein content, IPP, and surface hydrophobicity

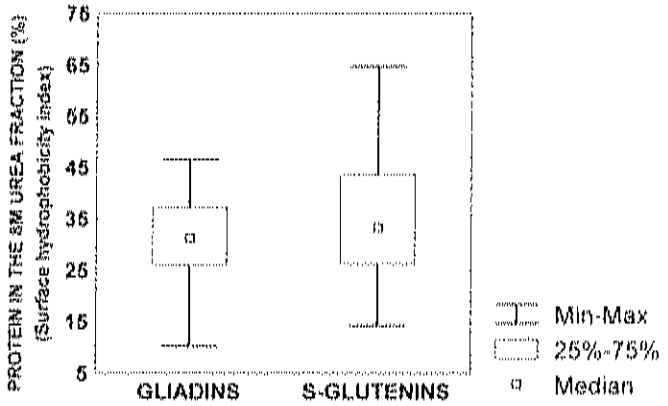

Fig. 3. Distribution of the estimated surface hydrophobicity indexes of gliadins and soluble glutenins.

TABLE IV
Determination Coefficient for the Model and Partials for Alveograph Variables[a]

Dependent Variable	Partial R^2	Model R^2	Prob > F
Work of deformation (W)			
PROT	0.27	0.27	0.0006
IPP	0.15	0.42	0.0033
HGLUS	0.06	0.49	0.0456
Swelling index (G)			
SED	0.76	0.76	0.0001
HGLUS	0.02	0.79	0.0374
I-GLUT	0.03	0.82	0.0236
Tenacity (P)			
SED	0.27	0.27	0.0006
PROT	0.17	0.45	0.0015
IPP	0.03	0.48	0.1605

[a] IPP, insoluble polymeric protein (ratio between pellet protein and flour protein). PROT, flour protein content; HGLI, surface hydrophobicity index of gliadins; SED, sedimentation; HGLUS, surface hydrophobicity index of soluble glutenins; S-GLUT, acid-soluble glutenins extracted.

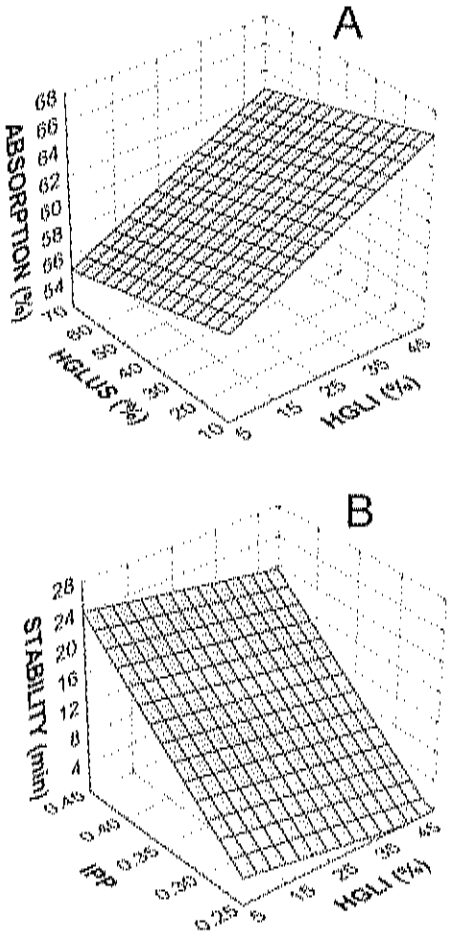

Fig. 4. A, Surface hydrophobicity index of gliadins (HGLI) and surface hydrophobicity index of soluble glutenins (HGLUS) on farinograph water absorption; **B,** insoluble polymeric protein (IPP) and surface hydrophobicity index of HGLI on dough farinograph stability.

more hydrophobic and showed larger variability than gliadins. Simple correlations statistics did not show the relationship of surface hydrophobicity of soluble gluten proteins to dough rheological characteristics. Multiple linear regression with the selection variable procedure showed several relationships. Although the determination coefficients were relatively low, and surface hydrophobicity of soluble glutenins explained only a small part of the variation, the variables were included in the models with very high levels of significance.

Mixing time was not related to surface hydrophobicity of proteins measured with HIC. However, surface hydrophobicity of gliadins and soluble glutenins affect farinograph water absorption. Alveograph dough strength (W) and swelling index (G) were more likely to be affected by surface hydrophobicity of soluble gluten proteins.

Protein content and the sedimentation value defined large part of dough rheological properties. The insoluble polimeric protein (IPP) was related to dough tenacity, dough strength, and stability.

The hydrophobic fraction of soluble gluten proteins, being only a small part of the gluten proteins, explained a proportion of the variability of dough rheological properties.

LITERATURE CITED

American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC, 10th ed. The Association: St. Paul, MN.

Arakawa, T., and Nahri, L. O. 1991. Solvent modulation in hydrophobic interaction chromatography. Biotechnol. Appl. Biochem. 13:151-172.

Bean, S. R., and Lookhart, G. L. 1998. Influence of salts and aggregation of gluten proteins on reduction and extraction of high molecular weight glutenin subunits of wheat. Cereal Chem. 75:75-79.

Bean, S. R., Lyne, R. K., Tilley, K. A., Chung, O. K., and Lookhart, G. L. 1998. A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flour. Cereal Chem. 75:374-379.

Bietz, J. A., and Cobb, L. A. 1985. Improved procedures for rapid wheat varietal identification by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Optimization of extraction conditionns. Cereal Chem. 61:124-129.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Branlard, G., and Dardevet, M. 1985. Diversity of of grain protein and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular weight subunits and flour quality characteristics. J. Cereal Sci. 3:345-354.

Burnouf, T., and Bietz, J. A. 1985. Chromosomal control of glutenin subunits in aneuploid lines of wheat: Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Theor. Appl. Genet. 70:610-619.

Caldwell, K. A. 1979. The fractionation and purification of gliadins by hydrophobic interaction chromatography. J. Sci. Food Agric. 30:185-196.

Chung, K. H., and Pomeranz, Y. 1979. Acid soluble proteins of wheat flours. II. Binding to hydrophobic gels. Cereal Chem. 56:196-201.

Ciaffi, M., Tozzi, L., and Lafiandra, D. 1996. Relationship between flour protein composition determined by size exclusion high-performance liquid chromatography and dough rheological parameters. Cereal Chem. 73:346-351.

Dachenkevitch, T., and Autran, J. C. 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 66:448-456.

Graybosch, R. A., Peterson, C. J., Hansen, L. E., and Mattern, P. J. 1990. Relationships between protein solubility characteristics, 1BL/1RS, high molecular weight glutenin composition, and end-use quality in winter wheat germ plasm. Cereal Chem. 67:342-349.

Greene, F. C., and Kasarda, D. D. 1971. Apolar interactions of α-gliadin: Binding of 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate. Cereal Chem. 48:601-609.

Hofstee, B. H. J. 1976. Hydrophobic adsorption chromatography of proteins. Pages 245-278 in: Methods of Protein Separation, Vol. 2. R. B. Dunlap, ed. Plenum Press: New York.

Hoseney, R. C., Dreese, P. C., Doescher, L. C., and Faubion, J. M. 1987. Thermal properties of gluten. Page 518 in: Proc. 3rd Int. Workshop Gluten Proteins. World Scientific: Teaneck, NJ.

Huebner, F. R., and Bietz, J. A. 1994a. RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes: Wheat. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. J. E. Kruger, and J. A. Bietz, eds. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.

Huebner, F. R., and Bietz, J. A. 1994b. RP-HPLC for assessment of quality in cereals and legumes: Bread making quality. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. J. E. Kruger and J. A. Bietz, eds. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.

Huebner, F. R., Nelsen, T. C., Chung, O. K., and Bietz, J. A. 1997. Protein distributions among hard red winter wheat varieties as related to environment and baking quality. Cereal Chem. 74:123-128.

Kinsella, J. E., and Hale, M. L. 1984. Hydrophobic association and gluten consistency: Effects of specific anions. J. Agric. Food Chem. 32:1054-1056.

Kruger, J. E., and Marchylo, B. A. 1990. Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography of changes in high molecular weight subunit composition of wheat storage proteins during germination. Cereal Chem. 67:141-147.

Lew, E. J. L., Kuzmicky, D. D., and Kasarda, D. D. 1992. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-Terminal amino acid sequencing. Cereal Chem. 69:508-515.

MacRitchie, F. 1996. Wheat proteins physicochemistry and functionality. In: Advances in Food and Nutrition Research, Vol. 36. J. E. Kinsella, ed. Academic Press: New York.

Magnus, E. M., and Khan, K. 1992. Hydrophobic properties of reduced and alkylated acetic acid-soluble glutenin-fraction by hydrophobic interaction chromatography. Cereal Chem. 69:607-612.

Ott, L. 1984. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. 2nd Ed. PWS Publishers: Boston.

Payne, P. I., Corfield, K. G., and Blackman, J. A. 1979. Identification of a high molecular weight subunitsof glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. Theoret. Appl. Genet. 55:153-159.

Popineau, Y. 1985. Fractionation of acid soluble proteins from wheat gluten by hydrophobic interaction chromatography: evidence for different behavior of gliadin and glutenin proteins. J. Cereal Sci. 3:29-34.

Popineau, Y. and Godon, B. 1982. Surface hydrophobicity of gliadin components. Cereal Chem. 59:55-62.

Popineau, Y., and Pineau, F. 1987. Investigation of surface hydrophobicities of purified gliadins by hydrophobic interaction chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and apolar ligand binding. J. Cereal Sci. 5:215-231.

Popineau, Y. 1994. Evaluation of hydrophobicity of wheat proteins and peptides by HIC and RP-HPLC. Pages 393-426 in: High Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. J. E. Kruger and J. A. Bietz, eds. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.

Preston, K. R. 1984. Gel filtration and characterization of neutral salt extracted wheat gluten proteins varying in hydrophobic properties. Cereal Chem. 61:76-83.

Preston, K. R. 1989. Effects of neutral salts of the lyotropic series on the physical dough properties of a Canadian red spring wheat flour. Cereal Chem. 66:144-148.

Primard, S., Graybosh, R., Peterson, C. J., and Leon, J. H. 1991. Relationships between gluten protein composition and quality characteristics in four populations of high-protein, hard red winter wheat. Cereal Chem. 68:302-312.

Van Lonkhuijsen, H. J., Hamer, R. J., and Schreuder, C. 1992. Influence of specific gliadins on the breadmaking quality of wheat. Cereal Chem. 69:174-177.

Vazquez-Moreno, L., Porath, J., Schluter, S., and Marchalonis, J. 1992. Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*) serum using gel-immobilized metal chromatography. Comp. Biochem. Physiol. 103 B:563-568.

Weegels, P. L., Hamer, R. J., and Schofield, J. D. 1996. Critical Review: Functional properties of wheat glutenin. J. Cereal Sci. 23:1-18.

Whitka, J., Moncuse, P., Baziotis, A., and Maskiewicz, R. 1987. Use of high-performance size-exclusion, ion-exchange, and hydrophobic interaction chromatography for the measurement of protein conformational change and stability. J. Chromatogr. 398:175-202.

Wieser, H., Stemoff, C., and Belitz, H. D. 1985. Peptide patterns of the glutenin fractions of different wheat varieties. Z. Lebensm. Unters. Forsh. 181:1-3.

Zeleny, L. A. 1947. Simple sedimentation test for estimating the bread baking and gluten qualities of wheat flour. Cereal Chem. 24:465-475.

[Received July 5, 2000. Accepted September 13, 1999.]

CONCLUSIONES GENERALES

1. La agarosa altamente acetilada (HA) es una matriz útil para el estudio de la hidrofobicidad superficial de las proteínas del gluten usando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Comparando los resultados con los reportados previamente, HA mostró una mejor selectividad y capacidad de discriminación que fenil y octil sefarosa.

2. Los resultados de la fraccionación de gliadinas y gluteninas estabilizadas, usando HIC en agarosa altamente acetilada, coinciden con descubrimientos recientes de interacción y estabilidad química. La subunidad de glutenina de masa molecular alta **y**, 10, que es una de las proteínas del par de alelos 5+ 10 más relacionados con buena calidad en trigos de panificación, mostró un comportamiento diferente en HIC que las otras subunidades. La subunidad 10 se eluyó en la fracción más hidrofóbica y la estabilidad de esta subunidad se evidenció, por las pocas formas mostradas en el análisis electroforético de las fracciones cromatográficas de diferente hidrofobicidad. En el caso de las gliadinas, las subclases α–β en una variedad y γ en la otra, mostraron mayor hidrofobicidad que las otras subclases de gliadinas.

3. Se midieron las temperaturas de desnaturalización de gliadinas y gluteninas solubles, separadas por hidrofobicidad, usando calorimetría de barrido diferencial de alta sensibilidad. Datos similares no habían sido reportados anteriormente. Proteínas en fracciones de más alta hidrofobicidad mostraron mayor estabilidad térmica. La presencia de esas transiciones en el

rango de 45-85°C, confirma la estabilidad térmica de estas proteínas.

4. Se midió la temperatura de transición vítrea (Tg) del gluten con cantidades bajas de humedad y se encontró una transición de segundo orden en la región vítrea que no se había detectado en estudios de calorimetría pero si en estudios reológicos y de resonancia magnética nuclear. Esta transición sub-Tg se comportó como una transición de tipo vítreo, en la relación que presenta con las propiedades químicas de las proteínas y la hidrofobicidad superficial.

5. Se definió un índice de hidrofobicidad para las gliadinas y gluteninas solubles, basado en el comportamiento cromatográfico en HIC de estas proteínas. Este índice se relacionó con las propiedades reológicas de las masas usando regresión lineal múltiplo con el procedimiento de selección de variable en pasos (stepwise). El índice de hidrofobicidad de gliadinas afectó positivamente la absorción de agua y negativamente la estabilidad de las masas. El índice de hidrofobicidad de gluteninas solubles se relacionó con extensibilidad y fuerza de la masa medida con el alveógrafo, pero no se encontró una relación de las proteínas solubles hidrofóbicas y las propiedades de mezclado de las masas.

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO

La mas importante contribución de este trabajo es la de proveer de una herramienta para el estudio de las proteínas de trigo, como es el uso de la agarosa altamente acetilada en cromatografía de interacción hidrofóbica. Esta técnica permitió identificar características de hidrofobicidad superficial en las proteínas del gluten de trigo responsables en parte de propiedades funcionales importantes para panificación.

Se mostró que una de las características de la subunidad de masa molecular alta de glutenina, 10, que forma parte del par de subunidades (5+10) que más se relaciona con buena calidad de panificación, es de una hidrofobicidad relativa alta. Se evidenció su estabilidad a la desnaturalización química, por el comportamiento de esta subunidad en cromatografía.

Se midieron temperaturas de desnaturalización de proteínas de gluten en solución ácida, usando microcalorimetría de barrido diferencial. Datos de este tipo no han sido reportados con anterioridad. Estas temperaturas de desnaturalización estuvieron en el rango de 45 a 85°C, lo que comprueba la estabilidad térmica de estas proteínas.

Se detectó, en gluten con contenidos bajos de humedad, una transición de segundo orden que ocurre a temperatura ambiente. Esta transición había sido reportada en estudios que utilizaron resonancia magnética nuclear y mediciones reológicas, pero no en estudios de calorimetría. Se demostró que la combinación la técnica de microcalorimetría de barrido diferencial y técnicas químicas como la cromatografía de interacción hidrofóbica en materiales proteicos con bajo contenido de humedad puede ser muy útil para entender las interacciones proteína- proteína y proteína-agua.

REFERENCIAS

A.A.C.C.1991. Official Methods (46-13, 54-21, 54-30 and 56-60). American Association of Cereal Chemists. St. Paul MN.

Anderson, O.D., Halford, N.G. Forde, J., Yip, R.E., Shewry, P.R. and Greene, F.C. 1988. Structure and analysis of the high-molecular-weight glutenin genes from *Triticum aestivium* cv Cheyenne. Proc. Int. Wheat genet. Symp., 7th, Vol. 1, 699-704.

Anderson, O.D. and Greene, F.C. The characterization and comparative analysisof high-molecular-weight glutenin genes genomes A and B of a hexaploid bread wheat. Theor. Appl. Genet. 77: 689-700.

Arakawa, T. and Nahri, L.O. 1991. Solvent modulation in hydrophobic interaction chromatography. Biotechnol. Appl. Biochem. 13: 151-172.

Batey, I.L., Gupta, R.B., and MacRitchie, F. 1991. Use of Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the study of wheat flour proteins: An improved Chromatographic procedure. Cereal Chem. 68: 207-209.

Bean, S.R. and Lookhart, G.L. 1997. Separation of wheat proteins by two-dimensional reversed-phase high-performance liquid chromatography plus free zone capillary electrophoresis. Cereal Chem. 74: 758-765.

Bean, S.R. and Lookhart, G.L. 1998. Influence of salts and aggregation of gluten proteins on reduction and extraction of high molecular weight glutenin subunits of wheat. Cereal Chem. 75: 75-79.

Bean, S.R. Lyne, R.K., Tilley, K.A., Chung, O.K., and Lookhart, G.L. 1998. A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flour. Cereal Chem. 75: 374-379.

Bean, S.R., and Lookhart, G.L. 1999. Sodium dodecil sulfate capillary electrophoresis of wheat proteins.1. Uncoated capillaries. J. Agric. Food Chem. 47: 4246-4255.

Bean, S.R., and Lookhart, G. 2000. Ultrafast capillary electrophoretic analysis of cereal storage proteins and its applications to protein characterization and cultivar differentiation. J. Agric. Food Chem. 48: 344-353.

Bekes, F. Zawistowska, U. and Bushuk, W. 1983. Protein-lipid complex in the gliadin fraction. Cereal Chem. 60: 371-376.

Bietz, J.A. and Cobb, L.A. 1985. Improved procedures for rapid wheat varietal identification by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Optimization of extraction conditions. Cereal Chem. 61: 124-129.

Bietz, J.A. and Kruger, J.E. 1994. The evolution of cereal protein analysis by HPLC. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins, Kruger, J.E. and Bietz, J.A. Eds. AACC, St. Paul MN. Pages 1-13.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Branlard, G. and Dardevet, M. 1985. Diversity of grain protein and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular weight subunits and flour quality characteristics. J. Cereal Sci. 3: 345-354.

Brock, C.J. 1991. Conformations of glutaminyl side-chains in gluten. Pages 441-446 in: Gluten Proteins 1990 (4th Int. Workshop). W. Bushuk and R. Tkashuk, eds. AACC, St. Paul MN. pages 441-446

Burnouf, T., and Bietz, J.A. 1985. Chromosomal control of glutenin subunits in aneuploid lines of wheat: analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Theor. Appl. Genet. 70: 610-619.

Caldwell, K.A. 1979. The fractionation and purification of gliadins by hydrophobic interaction chromatography. J. Sci. Food Agric. 30: 185-196.

Cherian, G., Chinachoti, P. 1997. Action of oxidants on water sorption ^{2}H nuclear magnetic resonance and glass transition behavior of gluten. Cereal Chem. 74: 312-317.

Chung, K.H. and Pomeranz, Y. 1979. Acid soluble proteins of wheat flours. II binding to hydrophobic gels. Cereal Chem. 56: 196-201.

Ciaffi, M. Tozzi, L. and Lafiandra, D. 1996. Relationship between flour protein composition determined by size exclusion high-performance liquid chromatography and dough rheological parameters. Cereal Chem. 73: 346-351.

Clements, R. 1987. A study of soft wheats from the eastern United States using a modified polyacrylamide gel electrophoresis procedure. Cereal Chem. 64: 442-448.

Cressey, P.J., Campbell, W.P., Wrigley, C.W. Griffin, W.B. 1987. Statistical correlations between quality attributes and grain protein composition for 60 advanced lines of crossbred wheat. Cereal Chem. 64: 299-301.

Dachenkevitch, T. and Autran, J.C. 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 66: 448-456.

D'Ovidio, Anderson, O.D. Masci, S., Skerrit, J., and Porceddu, E. 1997. Contribution of novel wheat high Mr glutenin subunit gene variability: modification of the repetitive domain and expression in *E. coli* J. Cereal Sci. 25: 1-8.

Fontanet, I., Davidou, S., Dacremont, C. And Le Meste, M. 1997. Effect of water on the mechanical behavior of extruded flat bread. J. Cereal Sci. 25: 303-311.

Fujio, Y., and Lim, J.K. 1989. Correlation between the glass transition point and color change of the heat-treated gluten. Cereal Chem. 66: 268-270.

Gontard, N., and Ring, S. 1996. Edible wheat gluten film. J. Agric. Food Chem. 44: 3474-3478.

Grant, a., Belton, P.S., Colquhoun, I.J., Parker, M.L., Plijter, J.J., Shewry, P.R., Tatham, A.S. and Willner, N. 1999. Effects of temperature on sorption of water by wheat gluten determines using deuterium nuclear magnetic resonance. Cereal Chem. 76: 219-226.

Graybosch, R.A., Peterson, C.J. Hansen, L.E. and Mattern, P.J. 1990. Relationships between protein solubility characteristics, 1BL/1RS, high molecular weight glutenin composition, and end-use quality in winter wheat germ plasm. Cereal Chem. 67: 342-349.

Greene, F.C. and Kasarda, D.D. 1971. Apolar interactions of alpha gliadin: binding of 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate. Cereal Chem. 48: 601-609.

Grinberg, V.Y., Danilenko, A.N., Burova, T.V. and Toltoguzov. 1989. Conformation stability of 11 S globulins from seeds. J. Sci. Food Agric. 49: 235-248.

Gupta, R.B., Popineau, Y., Lefebvre, J., Cornec, M., Laurence, G.J., And MacRitchie, F. 1995. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. Changes in polymeric protein formation and dough/gluten

properties associated with loss of low M_r glutenin subunits. J. Cereal Sci. 21: 103-116.

Hatakeyama, T. 1999. Applications of thermal analysis. in Thermal Analysis: Fundamentals and Applications to Polymer Science. John Wiley and Sons, U.S.A. Pages 73-89.

Hofstee, B.H.J. 1976. Hydrophobic adsorption chromatography of proteins. in: Methods of Protein Separation, Vol. 2. eds. Dunlap, R.B. Plenum Press, NY. Pages 245-278.

Hoseney, R.C., Finney, K.F. and Pomeranz, Y. 1970. Functional (breadmaking) and biochemical properties pf wheat flour components. VI Gliadin-lipid-glutenin interaction in wheat flour. Cereal Chem. 47: 135-140.

Hoseney, C., Zeleznack, K., and Lai, C.S. 1986. Wheat gluten: A glassy polymer. Cereal Chem. 63: 285-286.

Hoseney, R.C., Dreese, P.C., Doescher, L.C., and Faubion, J.M. 1987. Thermal properties of gluten. in Proc. Int. Workshop Gluten Proteins, , 3rd. World Scientific Publishing Co. Teaneck, N.J. Page 518.

Huebner, F.R. and Bietz, J.A. 1994 (a). RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes: Wheat. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. Kruger, J.E. and Bietz, J.A. eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN. Pages 97-120.

Huebner, F.R. and Bietz, J.A. 1994 (b). RP-HPLC for assessment of quality in cereals and legumes: Bread making quality. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. Kruger, J.E. and Bietz, J.A. eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. MN, USA. Pages 206-235.

Huebner, F.R., Nelsen, T.C., Chung, O.K, and Bietz, J.A. 1997. Protein distributions among hard red winter wheat varieties as related to environment and baking quality. Cereal Chem. 74: 123-128.

Humphris, A.D.L. McMaster, T.J., Miles, M.J., Gilbert, S.M. , Shewry, P.R. and Tatham, A.S. 2000. Atomic force microscopy (AFM) study of interactions of HMW subunits of wheat glutenin. Cereal Chem. 77: 107-110.

Kalichevsky, M.T. Jaroszkiewicz, E.M., Blanshard, J.M.V. 1992. Glass transition of gluten 1: Gluten and gluten-sugar mixtures. Int. J. Biol. Macromol. 14: 257-266.

Katzentein, G.E., Vrona, S.A. Wechsler, R.J., Steadman, B.L., Lewis, R.V., and Middaugh, R. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4268-4272.

Kasarda, D.D., Wooddard, K. M. and Adalsteins, A.E. 1998. Resolution of high molecular weight glutenin subunits by a new SDS-PAGE system incorporating a neutral pH buffer. Cereal Chem. 75: 70-71.

Khaktar, B.S., Bell, A.E. and Schofield, J.D. 1995. The dynamic rheological properties of glutens and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. J. Cereal Sci. 22: 29-44.

Kinsella, J.E. and Hale. M.L. 1984. Hydrophobic association and gluten consistency: Effects of specific anions. J. Agric. Food Chem. 32: 1054-1056.

Kobrehel, K. and Bushuk, W. 1977. Studies of glutenin X. Effect of fatty acids and their sodium salts on solubility in water. Cereal Chem. 54: 833-838.

Kruger, J.E. and Marchylo, B.A. 1990. Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography of changes in high molecular weight subunit composition of wheat storage proteins during germination. Cereal Chem. 67: 141-147.

Lafiandra, D., Turcheta, T., D'Ovidio, R., Anderson, O.D. Fachiano, A.M., and Colonna, G. 1999. J. of Cereal Sci. 30: 97-104.

Le Meste, M., Roudaut, G., and Davidou, S. 1996. Thermomechanical stability of glassy cereal food. J. Thermal Anal. 47: 1361-1476.

Lefebvre, J., Popineau, Y., Deshayes, G. And Lavenant, L. 2000. Temperature-iduced changes in the dynamic rheological behavior and size distribution of polymeric proteins for glutens from wheat near-isogenic lines differing in HMW glutenin subunit composition. Cereal Chem. 77: 193-201.

Levine, H., and Slade, L. 1990. Influence of glassy and rubbery states on the thermal, mechanical and structural properties of doughs and baked products. In: Dough Rheology and Baked Product Texture: Theory and Practice. H. Faridi and J.M. Faubion, eds. Van Nostrand Reinhold: NY. Pages 157-330.

Lew, E.J.L., Kuzmicky, D.D., and Kasarda, D.D. 1992. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-Terminal amino acid sequencing. Cereal Chem. 69: 508-515.

MacRitchie, F., du Cros, D.L. and Wrigley, C.W. 1990. Flour polypeptides related to wheat quality. In: Advances in Cereal Science and Technology, Volume X. Pomeranz, Y. Ed. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. Pages 79-145.

MacRitchie, F. 1992. Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. In: Advances in Food and Nutrition Research, Volume 36. Kinsella, J.E. Editor. Academic Press, Inc. NY. Pages 2-81.

Magnus E.M., and Khan, K. 1992. Hydrophobic properties of reduced and alkylated acetic acid-soluble glutenin-fraction by hydrophobic interaction chromatography. Cereal Chem. 69: 607-612.

Masci, S. Lafiandra, D., Porceddu, E., Lew, J.L. , Tao, H.P. and Kasarda, D.D. 1993. D-Glutenin Subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. Cereal Chem. 70: 581-585.

Martinez, J.C., Filmonov, V.V., Mateo, P.L. Schreiver, G. and Fersh, A.R. 1995. A calorimetric study of the thermal stability of barstar and its interaction with barnase. Biochemistry 34: 5224-5233.

Melander, W. and Horvath, C. 1977. Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the liotropic series. Arch. Biochem. Biophis. 183: 200-205.

Nakai, S. 1988. Hydrophobic interactions, in: Hydrophobic Interactions in Food Systems. Eds. Nakai, S. and Li-Chan, E. CRC Press, Boca Raton, FL. Pages 1-21.

Nicholls, R.J., Applequist, I.A. M., Davies, A.P., Ingman, S.J., and Lillford, P.J. 1995. Glass transitions and the fracture behavior of gluten and starches within the glassy state. J. Cereal Sci. 21: 25-36.

Ornebro, J., Wahlgren, M., Eliasson, A.C., Fido, R.J. and Tatham, A.S. 1999. Adsorption of α, β, γ and ω gliadins onto hydrophobic surfaces. J. Cereal Sci. 30: 105-114.

Osborne, T.B. 1907. The Proteins of the Wheat Kernel Publ. No. 84. Carnegie Inst., Washington, D.C.

Ott, L. 1984. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Second Edition. PWS Publishers, Boston, MS.

Payne, P.I., Corfield, K.G. and Blackman, J.A. 1979. Identification of a high molecular weight subunitsof glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. Theor. Appl. Genet. 55: 153-159.

Payne, P.I., Corfield, K.G., Holt, L. and Blackman, J.A. 1981. Correlations between the inheritance of certain high molecular weight subunits of glutenins and bread making quality in progenies of six crosses of bread wheat. J. Sci. Fd. Agric. 32: 51-60.

Payne, P.I. and Lawrence, G.J. 1983. Catalogues of alleles for the complex gene loci, *Glu A1*, *Glu B1* and *Glu D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. Cereal Res. Commun. 11: 29-35.

Payne, P.I., Holt, L.M. Jackson, E.A. and Law, C.N. 1984. Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 304: 359-371.

Payne, P.I. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. Annu. Rev. Plant Phys. 38: 141-153.

Popineau and Godon, B. 1982. Surface hydrophobicity of gliadin components. Cereal Chem. 59: 55-62.

Popineau, Y. 1985. Fractionation of acid soluble proteins from wheat gluten by hydrophobic interaction chromatography: evidence for different behavior of gliadin and glutenin proteins. J. Cereal Sci. 3: 29-34.

Popineau, Y. and Pineau, F. 1987. Investigation of surface hydrophobicities of purified gliadins by hydrophobic interaction chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and apolar ligand binding. J. Cereal Sci. 5: 215-231.

Popineau, Y. 1994. Evaluation of hydrophobicity of wheat proteins and peptides by HIC and RP-HPLC. In: High Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. Eds. Kruger, J.E. and Bietz, J.A. American Association of Cereal Chemists, Inc. MN. Pages 393-426.

Popineau, Y., Cornec, M., Lefebvre, J. and Marchylo, B.1944. Influence of high M_r glutenin subunits on glutenin polymers and the rheological properties of gluten and gluten subfractions of near isogenic lines of Sicco. J. Cereal Sci. 19: 231-241.

Popineau, Y., Bonenfant, S., Cornec, M., and Pezolet, M. 1994. A study by infrared spectroscopy of the conformations of gluten proteins differing in their gliadin and glutenin compositions. J. Cereal Sci. 20: 15-22.

Preston, K.R. 1984. Gel filtration and characterization of neutral salt extracted wheat gluten proteins varying in hydrophobic properties. Cereal Chem. 61: 76-83.

Preston, K.R. 1989. Effects of neutral salts of the lyotropic series on the physical dough propertiess of a canadian red spring wheat flour. Cereal Chem. 66: 144-148.

Primard, S., Graybosh, R., Peterson, C.J., and Leon, J.H. 1991. Relationships between gluten protein composition and quality characteristics in four populations of high-protein, hard red winter wheat. Cereal Chem. 68: 302-312.

Privalov, P.L. and Khechinashvili. 1974. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure. J. Mol. Biol. 86: 665-684.

Riley, R. 1965. Cytogenetics and the evolution of wheat. In: Essays on crop plant evolution. Hutchinson, J.B. Cambridge University Press. NY. Pages 103-122.

Roudaut, G., Maglione, M., Van Dusschoten, D., and Le Meste, M. 1999. Molecular mobility in glassy bread: A multispectroscopy approach. Cereal Chem. 76: 70-77.

Sears, E.R. 1954. The aneuploids of wheat. Res. Bull. Mo. Coll. Agr. Exp. Sta. 572: 1-59.

Sears, J.K. and Darvy, J.R. 1982. Mechanism of Plasticizer Action. Pages 35-77 in : The Thechnology of Plasticizers. John Wiley and Sons. U.S.A.

Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J. Kreiss, M. and Miflin, B.J. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. J. Cereal Sci. 4: 97-106.

Shewry, P.R., Halford, N.G.and Tatham, A.S. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. J. Cereal Sci. 15: 105-120.

Shewry, P.R. and Tatham, A.S. 1997. Disulfide bonds in wheat gluten proteins. J. Cereal Sci. 25: 07-22.

Shewry, P.R., Miles, M.J., Thomson, N.H. and Tatham, A.S. 1997. Scanning probe microscopes-aplications in cereal science. Cereal Chem. 74: 193-199.

Skerrit, J.H. 1998. Gluten proteins: genetics, structure and dough quality-a review. AgBiotech News and Inf.10: 247-270.

Spencer, D. 1984. The physiological role of storage proteins in seeds. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B304: 275-285.

SPSS Science 2000. PeakFit 4.0 for Windows. Peak separation and analysis software. Chicago Illinois, WEB: http://www.spss.com/international/asc.html.

StatSoft, Inc. (1995). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104-4442, (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, e-mail: info@statsoft.com, WEB: http://www.statsoft.com.

Tanford, C. 1980. The Hydrophobic Effect: Formation of Micells and Biological Membranes. John Wiley and Sons, New Yok.

Tatham, A.S., Shewry, P.R., and Belton, P.S. 1990. Structural studies of cereal prolamins, including wheat gluten. in Advances in Cereal Science and Technology, Vol 10. Y. Pomeranz, ed. AACC, St. Paul MN. Pages1-78.

Uthayakumaran, S. , Tömösközi, s. Tatham, A.S. Savage, A.W.J., Gianibelly, M.C., Stoddard, F.L. and Bekes, F. 2001. Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. Cereal Chem. 78: 138-141.

Van Lonkhuijsen, H.J., Hamer, R.J. and Schreuder, C. 1992. Influence of specific gliadins on the breadmaking quality of wheat. Cereal Chem. 69: 174-177.

Van Oss, C.J., Good, R. J and Chaudhury, M.K. 1986. The role of van der Waal forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. J. Colloid interf. Sci. 111: 378-389.

Vazquez-Moreno, L., Porath, J., Schluter, S., and Marchalonis, J. 1992. Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*)

serum using gel-immobilized metal chromatography. Comp. Biochem. Physiol. 103B: 563-568.

Weegels, P.L., Hamer, R.J. and Schofield, J.D. 1996. Critical Review: Functional properties of wheat glutenin. J. Cereal Sci. 23: 1-18.

Whitka, J., Moncuse, P., Baziotis, A. and Maskiewicz, R. 1987. Use of high-performance size-exclusion, ion-exchange, and hydrophobic interaction chromatography for the measurement of protein conformational change and stability. J. Chromatogr., 398: 175-202.

Wieser, H., Stemofl, C. and Belitz, H.D. 1985. Peptide patterns of the glutenin fractions of different wheat varieties. Z. Lebensm. Unters. Forsh. 181:1-3.

Zawistowska, U., Bekes, F. and Bushuk, W. 1985. Gluten proteins with high affinity to flour lipids. Cereal Chem. 62: 284-289.

Zeleny, L.A. 1947. Simple sedimentation test for estimating the bread baking and gluten qualities of wheat flour. Cereal Chem. 24: 465-475.

ANEXO

Datos Crudos de Calidad y Determinaciones Bioquímicas de las Harinas de los Trigos Estudiados

Variedad	Grupo	Origen	Año	PROT (%)	HGLI (%)	HGLUR (%)	HGLUS (%)	GLIA (mg/g)	I-GLUT (mg/g)	S-GLUT (mg/g)	PRT (%)
RAYON	1	INIFAP	1997	11.54	27.12	29.66	28.20	13.47	16.49	6.90	62.61
RAYON	1	INIFAP	1997	11.66	27.27	38.56	44.10	12.76	14.32	8.71	68.03
RAYON	1	INIFAP	1997	12.23	.	.	.	13.11	15.41	7.80	65.32
KARL	1	INIFAP	1996	15.28	31.84	28.45	31.25	11.70	17.62	11.90	92.18
KARL	1	INIFAP	1996	16.48	38.19	33.98	34.78	11.94	17.19	9.87	97.37
KARL	1	INIFAP	1996	15.52	.	.	.	11.82	17.41	10.86	94.78
OASIS	1	INIFAP	1997	11.41	19.78	38.00	23.84	9.44	8.96	11.50	80.32
OASIS	1	INIFAP	1997	10.84	19.09	38.16	27.51	11.43	7.02	9.56	80.81
OASIS	1	INIFAP	1997	11.17	.	.	.	10.43	7.99	10.53	80.56
CUCURPE	3	INIFAP	1997	10.68	37.01	36.73	44.24	15.21	17.86	9.17	76.60
CUCURPE	3	INIFAP	1997	9.55	46.58	38.47	46.09	17.58	17.68	9.55	57.19
CUCURPE	3	INIFAP	1997	10.11	.	.	.	16.39	17.77	9.36	66.90
OASIS	1	INIFAP	1998	12.86	31.93	60.20	33.33	13.99	11.88	12.02	83.49
OASIS	1	INIFAP	1998	13.07	30.05	58.01	46.37	11.29	9.50	9.42	82.76
OASIS	1	INIFAP	1998	14.03	.	.	.	12.64	10.69	10.72	83.13
INIFAP	1	INIFAP	1998	12.27	40.35	66.13	18.60	14.63	7.55	11.35	63.92
INIFAP	1	INIFAP	1998	12.11	35.39	65.51	14.26	12.23	11.65	10.62	64.44
INIFAP	1	INIFAP	1998	11.92	.	.	.	13.43	9.60	10.98	64.18
TOBARITO	1	INIFAP	1998	12.20	22.50	36.17	19.98	10.98	11.28	9.50	70.27
TOBARITO	1	INIFAP	1998	11.97	11.08	10.91	22.64	9.38	10.68	9.60	64.76
TOBARITO	1	INIFAP	1998	12.38	.	.	.	10.18	10.98	9.55	67.51
CUCURPE	3	INIFAP	1998	12.41	15.52	28.18	26.69	11.46	9.92	9.50	62.69
CUCURPE	3	INIFAP	1998	12.54	10.31	32.69	24.12	9.80	12.52	9.98	67.04
CUCURPE	3	INIFAP	1998	13.21	.	.	.	10.63	11.22	9.74	64.86
RAYON	1	INIFAP	1998	13.17	32.95	46.19	35.55	11.58	6.94	8.70	68.95
RAYON	1	INIFAP	1998	13.52	38.06	54.52	36.34	13.12	7.37	9.72	80.05
RAYON	1	INIFAP	1998	13.56	.	.	.	12.35	7.15	9.21	74.50
ARIVECHI	2	INIFAP	1998	12.55	26.67	29.80	29.07	14.29	22.80	10.98	61.09
ARIVECHI	2	INIFAP	1998	12.30	41.25	32.10	35.29	11.00	17.51	13.97	62.06
ARIVECHI	2	INIFAP	1998				.	12.64	20.16	12.47	61.58
RAYON	1	AAH	1998	11.29	25.42	46.79	24.30	10.57	13.72	5.81	73.97
RAYON	1	AAH	1998	11.71	23.70	55.84	28.33	12.86	12.36	7.52	79.20
RAYON	1	AAH	1998	11.63	.	.	.	11.72	13.04	6.67	76.59
OPATA	2	AAH	1998	11.85	20.33	37.96	43.98	15.86	16.59	7.23	69.00
OPATA	2	AAH	1998	11.99	24.93	47.17	58.52	15.26	15.12	8.13	69.67
OPATA	2	AAH	1998	12.46	.	.	.	15.56	15.86	7.68	69.34
ARIVECHI	2	AAH	1998	12.72	37.46	62.05	52.96	12.41	12.59	9.65	70.59
ARIVECHI	2	AAH	1998	13.31	37.53	62.38	64.82	12.55	12.87	8.21	71.80
ARIVECHI	2	AAH	1998	12.84	.	.	.	12.48	12.73	8.93	71.19
OASIS	1	AAH	1998	12.67	28.40	43.53	30.17	12.41	19.60	7.78	78.00
OASIS	1	AAH	1998	13.04	29.27	45.63	43.34	15.90	20.81	7.97	82.30
OASIS	1	AAH	1998	12.54	.	.	.	14.15	20.21	7.87	80.15
TEPOCA	4	AAH	1998	11.91	35.53	32.62	30.27	12.25	10.60	7.72	66.21
TEPOCA	4	AAH	1998	11.85	41.67	40.93	43.40	12.21	4.67	7.25	71.49
TEPOCA	4	AAH	1998	12.47	.	.	.	12.23	7.64	7.49	68.85
BAVIACORA	4	AAH	1998	11.44	29.28	33.95	20.95	13.88	16.90	6.26	69.90
BAVIACORA	4	AAH	1998	11.51	37.63	37.80	18.75	12.22	21.07	9.86	68.13
BAVIACORA	4	AAH	1998	11.34	.	.	.	13.05	18.99	8.06	69.01
RAYON	1	VY	1998	13.18	33.05	44.32	33.39	16.84	12.08	7.97	78.12
RAYON	1	VY	1998	12.95	37.55	53.01	25.57	15.42	13.11	8.14	75.30
RAYON	1	VY	1998	13.03	.	.	.	16.13	12.59	8.06	76.71
ARIVECHI	2	VY	1998	12.70	35.91	46.23	30.24	16.12	15.27	12.30	70.18
ARIVECHI	2	VY	1998	12.32	26.92	56.74	40.10	14.54	16.39	11.57	66.03
ARIVECHI	2	VY	1998	12.11	.	.	.	15.33	15.83	11.94	68.11
CUCURPE	3	VY	1998	9.64	31.43	37.68	40.02	16.14	16.99	5.43	54.85
CUCURPE	3	VY	1998	9.65	27.39	52.63	54.95	15.98	16.62	6.60	57.10
CUCURPE	3	VY	1998	9.36	.	.	.	16.06	16.80	6.01	55.97
TEPOCA	4	VY	1998	12.97	31.17	27.35	38.27	14.09	6.04	8.18	69.71
TEPOCA	4	VY	1998	12.64	36.87	45.99	51.07	14.23	4.28	10.14	73.29
TEPOCA	4	VY	1998	13.08	.	.	.	14.16	5.16	9.16	71.50

Variedad	Grupo	Origen	Año	P (mm)	L (mm)	G (mm)	PG	W ($Jx10^{-4}$)
RAYON	1	INIFAP	1997	107.8	70.66	18.66	5.8	248
KARL	1	INIFAP	1996	80.3	146	26.85	3	324
OASIS	1	INIFAP	1997	94.6	83.3	20.46	4.6	283
CUCURPE	3	INIFAP	1997	55	108.3	22.05	2.5	153
OASIS	1	INIFAP	1998	53.9	149.5	27.63	2	249
INIFAP	1	INIFAP	1998	63.8	89.3	20.9	3.1	144
TOBARITO	1	INIFAP	1998	83.6	67.5	18.13	4.6	180
CUCURPE	3	INIFAP	1998	55	133.25	27.75	2.1	193
RAYON	1	INIFAP	1998	64.9	113.4	25.23	2.6	212
ARIVECHI	2	INIFAP	1998	90.2	64.66	17.6	5.1	178
RAYON	1	AAH	1998	87.34	78.8	19.7	4.43	227.13
RAYON	1	AAH	1998	93.94	78.8	20.32	4.63	263.88
RAYON	1	AAH	1998	90.64	78.8	20.01	4.53	245.5
OPATA	2	AAH	1998	84.15	52.4	17.12	4.91	163.69
OPATA	2	AAH	1998	81.62	87.4	21.08	3.87	185.47
OPATA	2	AAH	1998	82.88	69.9	19.1	4.39	174.58
ARIVECHI	2	AAH	1998	120.58	66.6	18	7.22	370.88
ARIVECHI	2	AAH	1998	124.57	54.6	16.4	7.85	362.2
ARIVECHI	2	AAH	1998	122.58	60.6	17.2	7.54	366.54
OASIS	1	AAH	1998	75.13	110.2	23.06	6.69	371.5
OASIS	1	AAH	1998	76.34	107.4	23.34	7.59	295.67
OASIS	1	AAH	1998	75.74	108.8	23.2	7.14	333.58
TEPOCA	4	AAH	1998	82.28	64	17.66	4.65	171.71
TEPOCA	4	AAH	1998	87.56	65	17.7	4.94	192.53
TEPOCA	4	AAH	1998	84.92	64.5	17.68	4.8	182.12
BAVIACORA	4	AAH	1998	117.48	65.4	17.52	6.7	279.51
BAVIACORA	4	AAH	1998	116.87	61.2	18.1	6.46	279.54
BAVIACORA	4	AAH	1998	117.18	63.3	17.81	6.58	279.52
RAYON	1	VY	1998	89.32	87.8	20.84	4.28	250.25
RAYON	1	VY	1998	85.14	94.4	21.54	3.95	239.88
RAYON	1	VY	1998	87.23	91.1	21.19	4.12	245.06
ARIVECHI	2	VY	1998	130.24	57	16.48	7.9	269.44
ARIVECHI	2	VY	1998	124.52	55	16.76	7.42	251.22
ARIVECHI	2	VY	1998	127.38	56	16.62	7.66	260.33
CUCURPE	3	VY	1998	56.6	81.8	20.84	2.99	138.19
CUCURPE	3	VY	1998	63.14	87.8	20.22	3.12	134.65
CUCURPE	3	VY	1998	59.87	84.8	20.53	3.06	136.42
TEPOCA	4	VY	1998	105.32	71.8	16.65	5.64	265.65
TEPOCA	4	VY	1998	121.66	70.2	19.18	6.3	314.44
TEPOCA	4	VY	1998	113.49	71	17.92	5.97	290.04

Variedad	Grupo	Origen	Año	ABS (%)	DT (min)	ST (min)
RAYON	1	INIFAP	1997	62.0	10.2	10.2
KARL	1	INIFAP	1996	66.2	6.1	14.48
OASIS	1	INIFAP	1997	57.0	9.1	22.9
CUCURPE	3	INIFAP	1997	56.9	3.0	3
OASIS	1	INIFAP	1998	58.3	6.5	13.55
INIFAP	1	INIFAP	1998	63.2	3.3	4.6
TOBARITO	1	INIFAP	1998	64.4	5.2	7
CUCURPE	3	INIFAP	1998	55.0	3.7	8.4
RAYON	1	INIFAP	1998	62.7	4.4	6.8
ARIVECHI	2	INIFAP	1998	66.9	5.7	6
RAYON	1	AAH	1998	60.7	7.0	16.9
RAYON	1	AAH	1998	60.7	7.7	18.4
RAYON	1	AAH	1998	60.7	7.4	17.65
OPATA	2	AAH	1998	60.6	4.3	8.6
OPATA	2	AAH	1998	60.6	4.3	9.8
OPATA	2	AAH	1998	60.6	4.3	9.2
ARIVECHI	2	AAH	1998	66.5	7.7	13.2
ARIVECHI	2	AAH	1998	66.5	7.8	11.9
ARIVECHI	2	AAH	1998	66.5	7.8	12.56
OASIS	1	AAH	1998	59.0	7.5	15.9
OASIS	1	AAH	1998	59.0	7.8	14.4
OASIS	1	AAH	1998	59.9	7.6	15.15
TEPOCA	4	AAH	1998	61.3	5.9	10.6
TEPOCA	4	AAH	1998	61.0	6.0	10.7
TEPOCA	4	AAH	1998	61.2	6.0	10.65
BAVIACORA	4	AAH	1998	64.2	6.5	10.1
BAVIACORA	4	AAH	1998	64.2	6.6	11.4
BAVIACORA	4	AAH	1998	64.2	6.6	10.75
RAYON	1	VY	1998	62.9	6.1	10.5
RAYON	1	VY	1998	62.9	5.7	12.2
RAYON	1	VY	1998	62.9	5.9	11.35
ARIVECHI	2	VY	1998	64.5	8.7	13.8
ARIVECHI	2	VY	1998	64.5	8.7	12.2
ARIVECHI	2	VY	1998	64.5	8.7	13
CUCURPE	3	VY	1998	55.0	1.3	4.95
CUCURPE	3	VY	1998	54.7	1.9	5.15
CUCURPE	3	VY	1998	54.8	1.6	5.05
TEPOCA	4	VY	1998	59.5	10.7	16.7
TEPOCA	4	VY	1998	61.3	8.7	15.4
TEPOCA	4	VY	1998	60.4	9.7	16.05

Variedad	Grupo	Origen	Año	Sedimentación (ml)	IPP
RAYON	1	INIFAP	1997	27.42	0.329
RAYON	1	INIFAP	1997	27.92	0.334
RAYON	1	INIFAP	1997	26.45	0.331
KARL	1	INIFAP	1996	38.89	0.357
KARL	1	INIFAP	1996	40.35	0.362
KARL	1	INIFAP	1996	39.62	0.359
OASIS	1	INIFAP	1997	34.16	0.406
OASIS	1	INIFAP	1997	34.16	0.430
OASIS	1	INIFAP	1997	34.65	0.418
CUCURPE	3	INIFAP	1997	28.79	0.325
CUCURPE	3	INIFAP	1997	28.79	0.310
CUCURPE	3	INIFAP	1997	29.75	0.318
OASIS	1	INIFAP	1998	44.97	0.395
OASIS	1	INIFAP	1998	43.03	0.357
OASIS	1	INIFAP	1998	44.00	0.376
INIFAP	1	INIFAP	1998	31.95	0.320
INIFAP	1	INIFAP	1998	31.95	0.322
INIFAP	1	INIFAP	1998	31.95	0.321
TOBARITO	1	INIFAP	1998	27.29	0.362
TOBARITO	1	INIFAP	1998	27.29	0.329
TOBARITO	1	INIFAP	1998	27.29	0.346
CUCURPE	3	INIFAP	1998	44.97	0.287
CUCURPE	3	INIFAP	1998	44.49	0.297
CUCURPE	3	INIFAP	1998	44.73	0.292
RAYON	1	INIFAP	1998	33.39	0.315
RAYON	1	INIFAP	1998	34.84	0.365
RAYON	1	INIFAP	1998	34.12	0.340
ARIVECHI	2	INIFAP	1998	24.24	0.315
ARIVECHI	2	INIFAP	1998	24.24	0.309
ARIVECHI	2	INIFAP	1998	24.24	0.312
RAYON	1	AAH	1998	27.02	0.404
RAYON	1	AAH	1998	27.02	0.400
RAYON	1	AAH	1998	27.02	0.402
OPATA	2	AAH	1998	26.46	0.335
OPATA	2	AAH	1998	25.98	0.339
OPATA	2	AAH	1998	26.22	0.337
ARIVECHI	2	AAH	1998	23.12	0.333
ARIVECHI	2	AAH	1998	23.12	0.343
ARIVECHI	2	AAH	1998	23.12	0.338
OASIS	1	AAH	1998	32.69	0.366
OASIS	1	AAH	1998	32.69	0.383
OASIS	1	AAH	1998	32.69	0.375
TEPOCA	4	AAH	1998	24.92	0.344
TEPOCA	4	AAH	1998	24.92	0.337
TEPOCA	4	AAH	1998	24.92	0.341
BAVIACORA	4	AAH	1998	25.64	0.379
BAVIACORA	4	AAH	1998	25.15	0.363
BAVIACORA	4	AAH	1998	25.40	0.371
RAYON	1	VY	1998	32.83	0.367
RAYON	1	VY	1998	33.80	0.353
RAYON	1	VY	1998	33.32	0.360
ARIVECHI	2	VY	1998	23.21	0.338
ARIVECHI	2	VY	1998	22.74	0.300
ARIVECHI	2	VY	1998	22.98	0.319
CUCURPE	3	VY	1998	20.04	0.343
CUCURPE	3	VY	1998	20.04	0.348
CUCURPE	3	VY	1998	20.04	0.345
TEPOCA	4	VY	1998	28.52	0.328
TEPOCA	4	VY	1998	29.47	0.325
TEPOCA	4	VY	1998	29.00	0.327