



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

**EFFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA GERMINACIÓN Y  
LAS ACTIVIDADES DE ALFA AMILASA Y PEPTIDASAS  
EN DOS VARIEDADES DE TRIGO**

---

Por:

**Rocío Guadalupe Chávez Pulido**

TESIS APROBADA POR

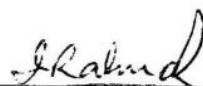
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

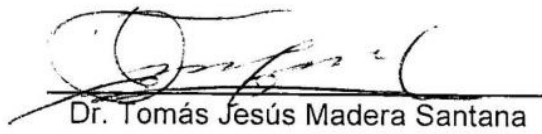
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

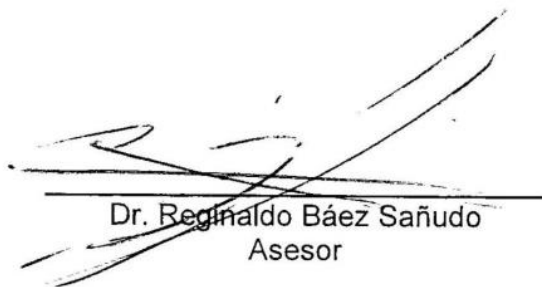
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Rocío Guadalupe Chávez Pulido, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Alma Rosa Islas Rubio  
Director de Tesis



Dr. Tomás Jesús Madera Santana  
Asesor



Dr. Reginaldo Báez Sañudo  
Asesor



Dr. Agustín Rascón Chu  
Asesor



Dra. María Guadalupe Salazar García  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quisiera agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su ayuda económica brindada en mi transcurso de estudio, al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por darme la oportunidad de desarrollarme académicamente durante estos dos años y medio de estudio, a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por brindar su apoyo en la facilidad del uso de equipos e infraestructura.

A mi comité de tesis: Al Dr. Tomás Jesús Madera Santana por su apoyo en la utilización de las técnicas aplicadas en la tesis, en el uso de equipos y por su dedicación en resolver mis dudas. Al Dr. Reginaldo Báez Sañudo le agradezco por su apoyo brindado como revisor de mi trabajo de tesis, por sus observaciones y comentarios que siempre fueron constructivos y positivos.

Al Dr. Agustín Rascón Chu, por su constante retroalimentación en cada junta de comité así como dedicarle su tiempo a revisar mi tesis y por sus buenas observaciones y comentarios. A la Dra. María Guadalupe Salazar García, por dedicarme su tiempo cuando ocupaba resolver mis dudas en cuanto a temas específicos. Por último pero no menos importante, a mí asesora de tesis, la Dra. Alma Rosa Islas Rubio, por aceptarme como estudiante en un tiempo difícil y brindarme totalmente su apoyo en la comprensión del tema y sobre todo paciencia para desarrollarme en su área con nuevas metodologías y conocimientos. Le agradezco por compartirme su tiempo y sus conocimientos adquiridos con su experiencia en diversos temas, así como su amistad y confianza.

Al equipo del laboratorio de cereales, a la Q.B. María del Carmen Granados N. por su total atención en el laboratorio, por compartir sus conocimientos sobre la manipulación del material y en el repaso de técnicas antes vistas en la

universidad, le agradezco el siempre buscar cómo solucionar los problemas de una manera sencilla y facilitarme las cosas. Al M.C Nicolás A. Rodríguez, por siempre estar ahí cuando ocupaba su ayuda, por investigar junto conmigo distintas técnicas para aplicar en la tesis, además de compartir sus conocimientos en el área y retroalimentarme cuando me surgían dudas. A la M.C Nina Heredia, le agradezco por igual que a los demás del equipo del laboratorio por su gran apoyo en el laboratorio, por compartir sus conocimientos, por sus consejos en todo este transcurso que nos tocó estar juntas. A todos por igual les agradezco la confianza y paciencia brindada, sé que entré con un tiempo corto pero de verdad les agradezco mucho las experiencias brindadas, los consejos, la diversión compartida en este año y medio que estuvimos juntos. Muchas gracias!

A mi familia, les agradezco infinitamente, mamá y papá, por todos los consejos y paciencia de cuando llegaba cansada del CIAD, ustedes estuvieron ahí con mis cambios de humor y sobre todo para darme ánimo porque esta experiencia no se iba a volver a repetir, gracias por motivarme a seguir adelante profesionalmente. A mis hermanos, por escucharme cuando necesitaba consejo, además de alentarme a obtener un grado más. A mi novio, por siempre estar ahí cuando lo necesitaba, por escucharme siempre que tenía alguna frustración, por aconsejarme y acompañarme en este camino que no fue fácil pero estuviste siempre ahí para mí.

A mis amigos, Nallely, Alma, Halina, Mara, Edith, Irma y Fer, por siempre echarme porras en esta nueva experiencia, las quiero mucho!. A Cynthia, Deyanira, Yuri, Victor, Pepe, Cristobal, Carmen, Alejandra, Julian, Karen, Ale comarre, por formar parte de este camino que iniciamos juntos y lo estamos terminando, los estimo mucho en verdad, gracias por la experiencia, diversión, alegrías, tristezas, consejos, TODO, espero esto no se acabe aquí, porque apenas comienza.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo deseo dedicar a mis padres, por toda la dedicación y apoyo brindado en cada uno de los proyectos que me propuse cumplir, muchas gracias, saben que los amo muchísimo y espero siempre se sigan sintiendo orgullosos.

A ti amor, por como lo mencione anteriormente, después de tantos años estas ahí conmigo, te amo y sé que siempre estarás ahí para mí siempre, de eso se trata apoyarse el uno al otro en todos los proyectos y travesías que nos proponamos, ahora sí, tu eres el siguiente, te amo!

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. LOS CEREALES.....</b>	<b>4</b>
2.1 Generalidades de los Cereales.....	4
2.2 Cultivo del Trigo y su Importancia.....	5
2.3 Tipo de Trigos y su Comercialización.....	8
2.4 Composición Química del Trigo.....	9
2.5 Usos del Trigo.....	11
<b>III. GERMINACIÓN DEL GRANO DE TRIGO.....</b>	<b>13</b>
3.1 Proceso de Germinación.....	13
3.2 Cambios Durante la Germinación.....	14
3.3 Tipos de Enzimas que se Sintetizan.....	15
3.3.1 Amilasas.....	15
3.3.2 Peptidasas.....	16
3.3.3 Otras Enzimas.....	17
<b>IV. ULTRASONIDO Y SUS APLICACIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>VI. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
6.1 Objetivo General.....	23
6.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>

7.1	Material Biológico.....	24
7.2	Propiedades Físicas de las Dos Variedades de Trigo.....	24
7.2.1	Peso Hectolítrico.....	24
7.2.2	Peso de 1000 Granos.....	25
7.3	Análisis Proximal de las dos Variedades de Trigo.....	25
7.4	Porcentaje de Germinación.....	26
7.5	Experimento de Germinación.....	26
7.6	Pérdida de Sólidos.....	27
7.7	Medición de la Actividad de Alfa Amilasa.....	27
7.7.1	Medición Indirecta de la Actividad de Alfa Amilasa.....	27
7.7.2	Medición de la Actividad de Alfa Amilasa por el Método Ceralpha .....	28
7.8	Medición de la Actividad de Peptidasas.....	28
7.9	Análisis Estadístico.....	29
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
8.1	Propiedades Físicas.....	31
8.2	Análisis Proximal.....	32
8.2.1	Contenido de Humedad.....	32
8.2.2	Contenido de Proteína.....	33
8.2.3	Contenido de Grasa.....	33
8.2.4	Contenido de Ceniza.....	34
8.2.5	Contenido de Carbohidratos.....	34
8.3	Porcentaje de Germinación.....	35
8.4	Experimento de Germinación.....	35
8.5	Pérdida de Sólidos.....	40
8.6	Medición de la Actividad de Alfa Amilasa.....	41
8.6.1	Medición Indirecta de la Actividad de Alfa Amilasa.....	41
8.6.2	Medición de la Actividad de Alfa Amilasa por el Método Ceralpha .....	43
8.7	Medición de la Actividad de Peptidasas.....	45
<b>IX</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>X</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>49</b>



## LISTA DE FIGURAS

1	Principales países productores de trigo (1998-2008).....	7
2	Grano remojado y sonicado de las variedades de trigo Patronato (A) y Ónavas (B) a los 0, 1, 3, 5 y 7 días de germinación.....	38
3	Pérdida de sólidos durante la germinación de las Variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometidas a los tratamientos de ultrasonido. ....	41
4	Viscosidad máxima de las variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometidas a los tratamientos de ultrasonido.....	42
5	Actividad de Alfa Amilasa de las variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometidas a ultrasonido y germinación.....	44
6	Actividad de Peptidasas de las variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometidas a ultrasonido y germinación. ....	46

## LISTA DE TABLAS

1	Propiedades físicas de las variedades Patronato y Ónavas.....	32
2	Análisis proximal del grano de las variedades Patronato y Ónavas .....	33
3	Porcentaje de germinación de las variedades Patronato y Ónavas.....	35
4	Valores de probabilidad de los efectos de los términos del modelo completo en las variables respuesta de las dos variedades de trigo.....	36
5	Valores promedios de las variables respuesta de las dos variedades de trigo a los distintos días de germinación.....	37
6	Valores promedios de las variables respuesta de las dos variedades de trigo a los distintos tratamientos de ultrasonido...	37

## RESUMEN

Enzimas como amilasas y peptidasas tienen múltiples aplicaciones en la industria alimentaria y cervecera. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y presentan una alta actividad en algunos cereales germinados. Hoy en día, la industria alimentaria aplica ultrasonido (US) para mejorar la velocidad de diferentes procesos de granos germinados. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ultrasonido (US) en la germinación y las actividades de alfa amilasa y peptidasas de grano de trigo. Se aplicó el US a grano previamente remojado de las variedades Patronato y Ónavas, a 3 diferentes intensidades (27, 81 y 108 Watts) durante 3 minutos a una frecuencia de 25 kHz. Las muestras se germinaron a 25 °C y 90% HR hasta 7 días, regándolas 3 veces/día. Los granos germinados se recolectaron a los 1, 3, 5, y 7 días. Posteriormente, se secaron a 50°C por 48 h y se molieron con un molino Cyclotec usando una malla de 0.5 mm. Se evaluaron la pérdida de sólidos y la actividad de alfa amilasa medida indirectamente con el analizador rápido de viscosidad (RVA) y directamente por el método Ceralpha. La actividad de peptidasas se determinó por un método espectrofotométrico. El tiempo de germinación afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) a la pérdida de sólidos y actividades de alfa amilasa y peptidasas en ambas variedades. Además del tiempo de germinación, el tratamiento de US y la variedad tuvieron un efecto significativo en la actividad de alfa amilasa medida por ambos métodos. La interacción tratamiento de US\*variedad no fue significativa ( $p > 0.05$ ) para la actividad medida por el RVA, tampoco lo fue para la actividad de peptidasas. La actividad de alfa amilasa incrementó con el tiempo de germinación, mostrando correspondencia entre los métodos utilizados para su medición. A partir del tercer día, se observó un incremento importante en su actividad, siendo Ónavas la que mostró una actividad mayor. Al quinto y séptimo, no hubo diferencias significativas en la actividad de esta enzima, excepto al aplicar 81 Watts a ambas variedades. La actividad de peptidasas incrementó con el tiempo de germinación, siendo Ónavas la variedad que mostró una actividad mayor al

séptimo día. El tiempo óptimo de germinación para mantener la pérdida de sólidos e incrementar significativamente la actividad de alfa amilasa en ambas variedades es de 3 días, aplicando 108 W a Patronato y 27 W a Ónavas. En relación a la actividad de peptidasas, el tiempo óptimo de germinación es de 5 días aplicando 81 W y 108 W a Patronato y Ónavas, respectivamente.

**Palabras claves:** Trigo, Germinación, Ultrasonido, Alfa Amilasa, Peptidasas.

## ABSTRACT

Enzymes such as amylases and peptidases have multiple applications in the food and brewing industry. They are widely distributed in nature, with a high activity in some germinated cereals. Nowadays, the food industry applies ultrasound (US) to improve the rate of different processes of germinated grains. The objective of this study was to evaluate the effect of US on germination and the activities of alpha-amylase and peptidases of wheat grain. US was applied to the previously stepped grains of the Patronato and Ónavas varieties, at 3 intensities (27, 81, and 108 W) during 3 min using a frequency of 25 kHz. Samples were germinated at 25 °C and 90% RH up to 7 days, watering them 3 times/day. The germinated grains were collected at 1, 3, 5, and 7 days. Then, they were dried at 50 °C for 48 h and ground with a Cyclotec mill using a 0.5 mm sieve. Solid loss, and the activity of alpha-amylase measured indirectly by the rapid viscoanalyzer (RVA) and directly by the Ceralpha method were evaluated. Peptidases activity was assessed by a spectrophotometric method. Germination time affected significantly ( $p < 0.05$ ) the solid loss and activities of alpha-amylase and peptidases of both varieties. In addition to germination time, the US treatment and variety had significant ( $p < 0.05$ ) effect on the alpha amylase activity measured by both methods. the interaction US treatment\*variety was not significant ( $p > 0.05$ ) for the activity measured by the RVA, neither for the peptidases activity. In general, at the fifth and seventh days, Patronato showed higher alpha-amylase activity. The peptidases activity increased with germination time, being Ónavas the variety that showed a higher activity. At the fifth and seventh day, there were no significant differences in the activity of these enzymes, except at 5-day germination applying 81 Watts to both varieties. The optimum germination time to keep solid loss and significant increase the alpha-amylase activity for both varieties is 3 days, applying 108 Watts to Patronato and 27 Watts to Onavas. Regarding peptidases activity, the optimum germination time is 5 days, applying 81 Watts and 108 Watts to Patronato and Onavas, respectively.

**Keywords:** Wheat, Germination, Ultrasound, Alpha-amylase, Peptidases.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos, los cereales han jugado un papel importante en la nutrición humana, ya que el hombre se ha encargado de su cultivo, por ser de los alimentos de gran consumo en su dieta a nivel mundial (Belderok, 2000). Los cereales son frutos maduros, enteros, sanos y secos de una serie de vegetales pertenecientes a la familia de las gramíneas, estos alimentos se recolectan, transportan y almacenan en forma de grano (cariópside) (Gil, 2010). En la alimentación humana se utilizan diferentes cereales como: arroz, avena, cebada, centeno, maíz, sorgo, triticale y trigo, teniendo a éste último cereal como uno de los más versátiles en la industria y con beneficios en la salud.

El trigo (*Triticum* spp) es el término designado al conjunto de cereales pertenecientes al género *Triticum*, formando parte de la familia de las gramíneas (León *et al.*, 2007). Además, la planta puede ser tanto como de cultivo como de crecimiento silvestre y se le puede encontrar en zonas templadas, además, suele cultivarse en suelos relativamente fértiles. El trigo tiende a distribuirse por el mundo y su importancia se debe principalmente al hecho de que sus semillas pueden ser molidas en forma de harina, sémola, etc., formando ingredientes básicos del pan y otros productos (Belderok, 2000). Se observa que la producción de trigo a nivel mundial se encuentra mucho menos concentrada que la de soya; pero para éste cereal los tres países que más producen representan alrededor del 50% de la producción mundial (INTA, 2014).

La producción de los granos como el arroz, el trigo y el maíz contribuyen en más del 25% a la producción mundial de cereales, que es superior a 2,200 millones de toneladas (Gil, 2010). La tasa mundial de crecimiento anual del cultivo de cereales ha descendido del 2.5% en los años sesenta y 1.9% en los años ochenta a sólo 1.5% en los años noventa. Por lo que, se prevé una tasa de crecimiento para el 2015 del 1.4%. El trigo es el primer cereal en el mundo en cuanto a superficie cultivada y producción obtenida.

Los granos de cereales suelen utilizarse en procesos tecnológicos, como la fermentación y la germinación, con el fin de mejorar la composición química, valor nutritivo y características de los productos para el consumo (De Ruiz y Bressani, 1990; Zieliński *et al.*, 2006). La germinación es el proceso por el cual se le proporcionan a las semillas las condiciones favorables (temperatura, humedad, etc.) para su desarrollo en una planta nueva (Hoseney, 1994). La germinación implica una reactivación de la actividad metabólica, una rediferenciación de tejidos embrionarios, movilización de las reservas que almacena la semilla y un crecimiento por la actividad meristemática (Finkelstein, 2010). Se dice que la germinación es el proceso que ayuda en el desarrollo óptimo de la actividad de las enzimas, pero hoy en día existen ciertas técnicas que ayudan a que dicha actividad incremente para efectos favorables en el área en donde se les desee utilizar.

El ultrasonido es una de éstas técnicas que representa, hoy en día, una tecnología novedosa, la cual ha creado bastante interés debido a sus efectos promisorios en las áreas de procesamiento y conservación de alimentos (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). Su aplicación en los alimentos ha sido variante en base a su intensidad, es por ello que existen investigaciones en donde al aplicarse a distintos granos incrementa su potencial de germinación así como cierta actividad enzimática (Mawson *et al.*, 2011). Sin embargo, los estudios en trigo son escasos. Es por ello, que se busca evaluar la aplicación

de la técnica del ultrasonido como una opción para distintas aplicaciones industriales y sus posibles usos en los cereales.



## II. LOS CEREALES

### 2.1 Generalidades de los Cereales

Los cereales son la principal fuente de carbohidratos y fibra de la dieta, suministran hasta un 12% de proteínas, que si bien son de valor biológico bajo, suelen complementarse con leguminosas, leche, carne y pescados (Gil, 2010). Los cereales se agrupan en granos básicos que incluyen al maíz, trigo y arroz, y los granos industriales, como el sorgo, avena y cebada. Además, proporcionan ciertas cantidades apreciables de tiamina y niacina, por lo que, es necesario el consumo de 4-6 raciones o derivados de cereales para cumplir las recomendaciones dietéticas y si se componen de productos integrales, eleva la ingesta de fibra. Todos los granos de cereales son una fuente rica de una matriz de micronutrientes y compuestos bioactivos que tienen el potencial de ejercer efectos benéficos en la salud (Brouns *et al.*, 2012). Los mecanismos potenciales que afectan la salud y contribuyen a la disminución del riesgo de algunas enfermedades, aún no se han esclarecido.

El pronóstico de la FAO sobre el uso mundial de cereales en 2014/15 se ha incrementado en casi 17 millones de toneladas desde marzo hasta alcanzar los 2,493 millones de toneladas, y actualmente se sitúa en 2,6% (63 millones de toneladas) por encima de la estimación revisada del ciclo anterior. Este aumento se debe principalmente a los ajustes en los balances históricos (2004/05-2013/14) de la oferta y la demanda de cereales en China y la India.

La proporción de energía aportada por los cereales, considerada a escala mundial, representa cerca del 50% de la energía alimentaria; en países en desarrollo se encuentra entre el 50-60% y en países industrializados entre el 30-35% (Gil, 2010). Un descenso detectado en países en vía de desarrollo, del 60 al 54% en un periodo de 10 años, puede ser por una baja en el consumo de trigo y arroz en países de ingresos medios, como Brasil y China. En España, el trigo fue uno de los cereales más consumidos en el 2006, tomándose en cuenta el consumo en hostelería, restaurantes e instituciones.

## 2.2 Cultivo del Trigo y su Importancia

A nivel mundial el trigo es el cereal que más se utiliza en la alimentación humana, representando un gran consumo con el paso de los años, y en México ocupa el segundo lugar después del maíz (FAO, 2010). En el noroeste de México se cultiva en condiciones de riego, principalmente en los Valles del Yaqui y del Mayo en el estado de Sonora, y en los Valles del Carrizo y del Fuerte en el estado de Sinaloa (Félix Fuentes *et al.*, 2011). Tan sólo en el ciclo 2007-2008 la superficie sembrada fue de 288,677 hectáreas (ha), de las cuales 61.56% se sembró en el Distrito de Desarrollo Rural 148 (Cajeme y Comunidades Yaquis), seguido del Distrito de Desarrollo Rural 149 con 26.58% al cual pertenecen Navojoa, Huatabampo y Fuerte-Mayo (Figueroa López *et al.*, 2010). El 80% del área correspondió a variedades de trigo del grupo 5 (durum o cristalino) y el restante 20% fue del tipo harinero. Para el ciclo 2008-2009, la superficie de siembra se incrementó en más de 10,000 ha en el Valle del Yaqui.

Las condiciones medioambientales durante el llenado del grano de trigo determinan el rendimiento y el porcentaje de proteína (León *et al.*, 2007). Factores como la temperatura, el agua y el aporte de fertilizantes tiene que ver con la velocidad y la duración del desarrollo del grano, la acumulación de proteína y la deposición del almidón (Dupont y Altenbach, 2003). En la

actualidad, la mayoría de las variedades de trigo cultivadas presentan menor altura que las variedades antiguas. Con esto se persiguen dos objetivos: evitar los problemas de encamado (cuando las plantas se tumban por su propio peso y/o la acción del viento) y minimizar el material vegetal innecesario. Una vez que el tallo ha crecido, aparece en la parte superior el zurrón, que posteriormente dará lugar a la espiga en lo que se conoce como fase de espigado (INTA, 2014). En el interior de cada espiga los estambres polinizan a los pistilos y se generan numerosos granos o semillas. Estos granos, en un principio, están vacíos. Durante la fase de maduración los granos se rellenan (granazón) y endurecen. Posteriormente, los granos se secan y quedan listos para la recolección.

Entre los diferentes cereales, el trigo (*Triticum* spp) es el término con el cual se designa al conjunto de granos, tanto cultivados como silvestres, pertenecientes al género *Triticum* (León et al., 2007). Todos ellos son plantas de la familia de las gramíneas y su cultivo se ha extendido por todo el mundo; siendo el más importante en el clima templado. Por otro lado, existen dos tipos de trigo comercialmente importantes, el trigo durum o trigo para pasta (*Triticum durum*) y el trigo común (*Triticum aestivum*) que se utiliza para elaborar pan y galletas (Brouns et al., 2012). Actualmente, se prevé que la utilización total de trigo rondará los 711 millones de toneladas, es decir, 7 millones de toneladas más de lo previsto el mes pasado y un 2.7% (19 millones de toneladas) más que en 2013/14. Por lo que, se espera que el comercio de trigo alcance los 151.4 millones de toneladas en 2014/15 (julio/junio), cifra ligeramente superior a la del anterior informe de marzo, pero todavía más de 5 millones de toneladas (3.4%) por debajo del récord registrado en 2013/14 (FAO, 2015).

En los países industrializados, se utiliza para alimento animal una proporción creciente de trigo, el 45% del consumo total en la Unión Europea (FAO, 2010). El consumo de trigo per cápita para la alimentación en los países en desarrollo, ha seguido creciendo y la mayoría de estos países dependen cada vez más de

las importaciones. A pesar de ser el tercer grano de mayor producción mundial precedido por el maíz y el arroz, en el periodo de 1998 a 2008 el trigo tuvo el crecimiento menos acelerado de los granos básicos (Caballero, 2011). El 71% de la producción de este cultivo se concentró en 11 países, ocupando los tres primeros lugares China con el 17%, la India con el 12% y Estados Unidos con el 10%. Además, seguidos por ocho países que representaron entre el 7% y 3% de la producción mundial (Rusia, Francia, Canadá, Alemania, Australia, Pakistán, Turquía y Ucrania) (Figura 1).

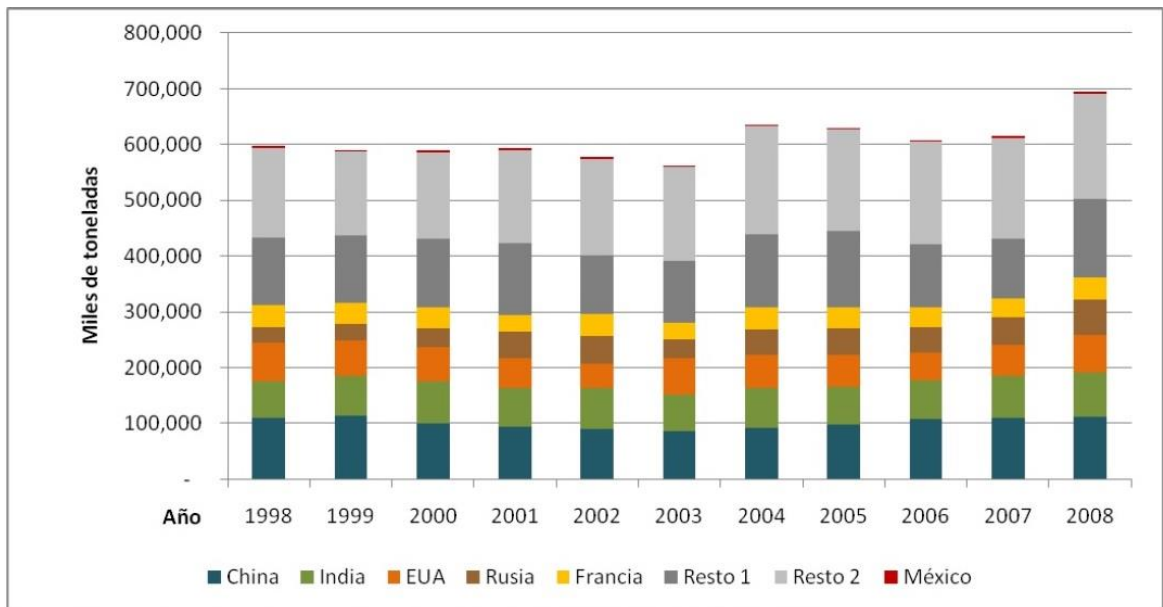


Figura 1. Principales países productores de trigo (1998-2008). Fuente: (Caballero, 2011).

En los próximos años, se espera que aumente el consumo de trigo en todas las regiones, incluidos los países en transición, a medida que se reanime su consumo (FAO, 2010). En varios de los países consumidores de arroz, los aumentos en el consumo de trigo van de la mano con un consumo de arroz constante o en disminución. Hoy en día, existe una dependencia de las importaciones de los países en desarrollo y se espera que las importaciones

netas de trigo aumenten de 72 millones de toneladas anuales en 1997-99 a 160 millones de toneladas en el año 2030.

### 2.3 Tipos de Trigo y su Comercialización

El trigo tiene diversos usos en la industria de los alimentos, siendo el ingrediente principal en la elaboración de pan, galletas, productos de repostería y pastas alimenticias, como fideos (Peña *et al.*, 1998). Una variedad de trigo para considerarse de buena calidad para elaborar productos de panificación puede no servir para la elaboración de cualquier producto que no sea de panificación. Esto se debe a que los principales productos elaborados con trigo, al ser diferentes en sus características de formulación y proceso como en las de producto terminado (humedad, textura, densidad, sabor, etc.), requieren características de calidad del grano específicas para cada grupo de productos.

Son varios los tipos de trigo que se cultivan alrededor del mundo; en base a su hábito de crecimiento, se clasifican en trigos invernales, primaverales, e intermedios o facultativos (Peña *et al.*, 1998). Por otra parte, el trigo harinero (*Triticum aestivum*) también se clasifica con base al color de su grano en rojo, blanco y en el caso del trigo durum (*Triticum durum*) en ámbar. El color del grano es determinado por una capa de pigmentos que se localiza en el endospermo y en las capas externas del grano, denominadas pericarpio. Por lo que, esta característica es de poca relevancia en la calidad del procesamiento de la harina refinada de trigo, pero es importante en productos elaborados con harina integral o en cereales blancos.

En la comercialización, el trigo se clasifica en base a ciertas características que afectan su uso en la manufactura de diversos alimentos procesados. Es por eso que, el trigo hexaploide (*Triticum aestivum*) o harinero, se clasifica por su dureza del grano, es decir, la textura del endospermo, en semi-duro y suave

(Peña *et al.*, 1998). Los trigos duros y semi-duros son utilizados principalmente en la panificación, mientras que los suaves o blandos se usan para elaborar galletas y productos de repostería. En cambio, el trigo tetraploide (*T. durum*), conocido como durum o cristalino, posee un endospermo muy duro de apariencia cristalina, siendo muy adecuado para producir pastas alimenticias.

## 2.4 Composición Química del Trigo

Los componentes químicos que se tienen en el pericarpio son la celulosa y hemicelulosas; proteínas, hemicelulosas, sales minerales y lípidos en la capa aleurona; almidón y proteínas en el endospermo, y proteínas y lípidos en el germen (Gil, 2010). Los carbohidratos en el trigo y otros cereales son el componente más abundante, teniendo al almidón como un constituyente mayoritario, de un 54-72%, de contenido en el endospermo. Así como también, existen otro tipo de carbohidratos en pequeñas cantidades como, mono-, di- y oligosacáridos y fructanos en un 7%, además de los polisacáridos que están dentro de la pared celular en un 12% (Uthayakumaran y Wrigley, 2010). El almidón es un homopolisacárido de glucosa formado por una mezcla de dos polímeros, amilosa y amilopectina (Gil, 2010). La amilosa posee propiedades de un polímero lineal enlazado por uniones glucosídicas  $\alpha$ - 1,4, así como también cuenta con cierta cantidad de ramificaciones que implican uniones glucosídicas  $\alpha$ - 1,6. La amilopectina es un polímero de gran peso molecular ramificado, que contiene de 5-6% de uniones glucosídicas  $\alpha$ - 1,6.

Existen granúlos de almidón que cuando se hidratan se suspenden en contacto con agua fría. Si la suspensión llegase a calentarse, se produce un hinchamiento provocando un rompimiento del gránulo, ocasionando que la amilosa y amilopectina salgan fuera produciendo una suspensión viscosa. Las proteínas del trigo cuentan con la capacidad para combinarse dentro de la masa proteica, conocida como gluten, la cual se ha hecho la fuente más popular y

eficaz de la harina para la producción de pan en el mundo (Uthayakumaran y Wrigley, 2010).

El método de preparación de gluten consiste en mezclar harina y agua para formar la masa, seguido por un lavado suave de la masa en agua o solución diluida de sal para eliminar el almidón y materiales solubles. El 80-85% de las proteínas del endospermo del grano son de reserva, es decir las proteínas del gluten, y el 13% son proteínas con función estructural, como albúminas y globulinas (Kulp, 2000; Martínez *et al.*, 2005). Por lo que, cuando el grano de trigo se encuentra maduro, se tienden a localizar las proteínas en forma de glóbulos formando como una especie de capa protectora alrededor de los granúlos de almidón. Además, las proteínas de reserva tienen un contenido de aminoácidos esenciales menor comparado con las proteínas de origen animal.

Los lípidos se localizan en el germen y constituyen el 5-10% del gluten seco, no pueden ser naturalmente asociados con las proteínas, pero se cree que están unidos a ellos durante la formación de la masa. El almidón ocluido y la humedad constituyen la mayor parte del resto de las preparaciones de gluten (10-12%) y pequeñas cantidades de carbohidratos no almidonosos también pueden estar presentes. Por otro lado, los minerales forman una pequeña parte del grano, en el endospermo existen cantidades menores del 1% (Matz, 1991). Entre los mayores constituyentes de la fracción mineral están los fosfatos y sulfatos de potasio, magnesio y calcio; en donde entre los fosfatos algunos se encuentran en forma de ácido fítico. Además, también existen pequeñas cantidades de hierro, manganeso, zinc, entre otros, y generalmente los trigos duros tienen mayor cantidad de estos elementos que los trigos suaves.

Las vitaminas no varían mucho entre los cereales, se encuentran ausentes la vitamina A, C y D, y existe la presencia de vitaminas del grupo B, como la B1 o tiamina, la B2 o riboflavina y B6 o piridoxina (Martínez *et al.*, 2005). Así como, también hay presencia de ácido nicotínico y pantoténico; se encuentran

distribuidas entre el tejido vegetal que envuelve al embrión y el germen en donde es variable su cantidad según la vitamina considerada

## 2.5 Usos del Trigo

La contribución de trigo como componente importante de la mayoría de las dietas se debe a que se dan una variedad de alimentos interesantes y sabrosos, así como su adaptabilidad, almacenamiento fácil y beneficios nutricionales (Uthayakumaran y Wrigley, 2010). El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) se utiliza en la elaboración de panes, tortillas, galletas y repostería, y el trigo cristalino (*Triticum durum* L.) en pastas alimenticias (espagueti, sopas secas y otros productos) (Peña Bautista *et al.*, 2008). La primera transformación del trigo ocurre en el molino, donde se convierte en harina, a partir de *T. aestivum*, o sémola, que es la harina gruesa de *T. durum*. El molinero utiliza determinada clase de trigo, o mezcla de trigos, para producir harinas o sémolas con características deseables, dependiendo del tipo de producto que se vaya a elaborar y de las preferencias del consumidor. Por lo anterior, la industria molinera es el eslabón de la cadena que permite identificar y determinar los tipos de trigos que se requieren para obtener harinas o sémolas de calidad aceptable en la preparación de panes, galletas, pastas u otros productos.

El pan común es el producto perecedero resultante de la cocción de la masa obtenida al mezclar harina de trigo y otros ingredientes, en donde es fermentada por microorganismos propios para la fermentación panaria (Gil, 2010). Según el porcentaje de agua se pueden distinguir distintos tipos de pan, como el pan bregado, de miga dura, español o candeal y el pan de flama o miga blanda. Por otro lado, para la elaboración de la pasta, este cereal es adecuado porque las proteínas tienen la capacidad de interactuar entre ellas y con otros componentes como los lípidos (Granito *et al.*, 2003). Las proteínas cuentan con la aptitud de formar complejos de lipoproteínas viscoelásticas (gluten), que



contribuyen al desarrollo de la masa y previenen la disgregación de la pasta durante la cocción en agua caliente. Sin embargo, existe una gran diversidad como se mencionaba anteriormente en la aplicación del trigo como componente alimenticio y de elaboración de otros productos.

### III. GERMINACIÓN DEL GRANO DE TRIGO

La germinación es un método económico y sencillo para mejorar el valor nutritivo. La germinación del grano tiene efectos importantes en la composición química, valor nutritivo, y las características de aceptabilidad de los productos para el consumo humano. Se han reportado niveles más altos de nutrientes y niveles más bajos de antinutrientes en brotes comparándolos con semillas germinadas (De Ruiz y Bressani, 1990; Zieliński *et al.*, 2006)

#### 3.1 Proceso de Germinación

El cultivo del trigo comienza con la germinación del grano, en donde las semillas tras un periodo de latencia, comienzan a liberar hormonas (giberelinas) en el interior del germen (León *et al.*, 2007). Estas hormonas promueven la producción y activación de las enzimas que permiten que el germen se alimente de las sustancias de reserva del grano. Por lo que, se tiene que entre las enzimas producidas en este tiempo destacan las amilasas y otras enzimas hidrolíticas como proteasas y glucanasas. A partir del germen crece la nueva planta; una vez que existe un sistema de raíces nuevo del grano ya puede aprovechar las sustancias nutritivas que se encuentran en el suelo. Por consiguiente, en la primera fase de crecimiento se generan nuevas plantas (hijuelos), fase conocida como ahijado. Tras el ahijado se produce el encañado, tallos se estiran y los nudos se hacen claramente visibles.

El establecimiento de la plántula se produce después de la germinación y su crecimiento está soportado inicialmente por los metabolitos producidos por la hidrólisis y la conversión de las principales reservas almacenadas como son las proteínas, carbohidratos y lípidos (Zieliński *et al.*, 2006).

La germinación comienza con la absorción de agua o imbibición, a través de la semilla seca y termina con la aparición del eje embrionario, usualmente la radícula (Zieliński *et al.*, 2006). Es una fase de intensa actividad metabólica, que implica cambios estructurales, subcelulares, respiración, síntesis macromoleculares y, por último, elongación celular.

Durante las dos últimas fases de desarrollo de la semilla, también conocido como maduración, el embrión y la semilla se preparan para la supervivencia cuando se separa de la planta materna (Finkelstein, 2010). Con este fin, las semillas acumulan reservas para proporcionar nutrientes para la supervivencia durante la germinación. Dependiendo de las especies, las reservas de almacenamiento se pueden acumular exclusivamente en el mismo, tanto en el embrión como en ambas, el endospermo y el embrión.

### 3.2 Cambios Durante la Germinación

Los cambios durante la germinación pueden ser físicos, químicos y nutricionales por las fases que cumple el proceso de la germinación en los cereales (Miransari y Smith, 2014). Es decir, se producirán una serie de cambios físicos ya que la semilla comenzará el proceso de imbibición, anteriormente mencionado para dar el paso a la siguiente fase de activación enzimática o metabólica, en donde las enzimas contenidas comenzarán la transformación de los compuestos propios que se encuentran dentro del grano, para producir alimento para la plántula creciente.

### 3.3 Tipos de Enzimas que se Sintetizan

Varios estudios han demostrado que existen una gran cantidad de enzimas en múltiples formas, las cuales pueden diferir en su especificidad y en sus propiedades (Pomeranz, 1988). Por otro lado, ha surgido información de cómo operan e interactúan las enzimas durante diversos procesos de elaboración, como por ejemplo en la elaboración de pan. Durante la germinación se sintetizan enzimas tales como amilasas, peptidasas, lipasas y fitasas, entre otras.

#### 3.3.1 Amilasas

Las amilasas son una clase de hidrolasas ampliamente distribuidas en la naturaleza, es decir, en las plantas, animales y microbios. Estas enzimas pueden romper específicamente los enlaces de oligosacáridos en almidón, un polisacárido principal de almacenamiento presente en las semillas de diversas plantas y otros relacionados oligo-y polisacáridos (Yaldagard *et al.*, 2008). Por consiguiente, tienen amplias aplicaciones biotecnológicas en los alimentos, cervezas, textiles, y la industria del papel. La despolimerización del almidón por amilasas es la base para varios procesos industriales, tales como la preparación de jarabes de glucosa y elaboración de la cerveza. Dentro de las amilasas, la alfa amilasa juega un papel muy importante en la hidrólisis del almidón, rompe los enlaces  $\alpha$  - 1,4 del almidón generando glucosa y dextrinas. Las aplicaciones industriales de alfa amilasa requieren que ésta enzima presente una actividad alta.

### 3.3.2 Peptidasas

Las peptidasas son naturalmente especializadas en degradar proteínas del gluten y péptidos, derivadas de fuentes naturales de alimentos. Existen peptidasas provenientes de bacterias, hongos, y granos de cereales germinados, las cuales se han sugerido como una opción para la destoxificación del gluten. Su producción es en parte a un buen proceso tecnológico establecido, como sería el malteo y la producción de cerveza, los cuales son procesos simples y económicos. Las peptidasas provenientes de granos germinados de centeno han sido exitosamente utilizadas para transformar bebidas que contenían gluten a bebidas libres de gluten (Schwalb *et al.*, 2012).

Las proteasas y peptidasas son encontradas en varios cereales, sin embargo, sus niveles de actividad tienden a ser relativamente bajos. La mayoría de los métodos para determinar la actividad proteolítica se basan en la producción de nitrógeno soluble, el cual se mide posteriormente. La harina de trigo contiene cierta cantidad de enzimas proteolíticas, con un pH óptimo cerca del 4.1, la cual es una fuente importante en la fermentación acídica de diferentes productos, como son galletas y masa fermentada. Las peptidasas pueden ser importantes en la producción de nitrógeno orgánico soluble, el cual es utilizado por la levadura durante la fermentación. Se ha reportado que el uso del extracto de bacterias ácido lácticas y proteasas fúngicas en combinación, disminuyeron los niveles de gluten y se mantuvo la textura y características sensoriales de panes tradicionales (Geßendorfer *et al.*, 2011).

### 3.3.3 Otras Enzimas

Las lipasas son las enzimas que hidrolizan los ácidos grasos de los triglicéridos, pero es difícil separar esa actividad de la propiedad de otras esterasas (Hoseney, 1994). Todos los cereales tienen actividad de ésta enzima, pero su actividad varía entre los diferentes granos que existen, en el caso de la avena tiene una actividad relativamente alta comparada con las que se encuentran en el grano de trigo y cebada. Los resultados varían dependiendo de las técnicas utilizadas. La actividad de las lipasas es importante ya que si se encontrara algún ácido graso libre es más susceptible a una oxidación.

Las fitasas han sido aisladas y caracterizadas, incluyendo fitasas fúngicas de *Aspergillus niger*, bacteriales de *Escherichia coli*, de plantas (frijol mungo, arroz, trigo, variedades de cereales y leguminosas) y de mamíferos (Li *et al.*, 2010). Las fitasas derivadas de plantas y de microbios se pueden clasificar en subgrupos basados en sus mecanismos catalíticos, pH óptimos (alcalinas o ácidas), o cuando los grupos fosfatos son liberados. Por otro lado, cuando actúan como enzimas pueden catalizar la liberación de ortofosfato de mio-inositol hexaquisfosfato, desempeñando un papel importante en la descomposición del ácido fítico (fitato) y ayudando a la liberación de fósforo digestible, calcio y otros nutrientes minerales.

Se utilizan ampliamente como un suplemento animal, tal como en la cría de aves de corral y cerdos, para animales monogástricos que no tienen capacidad de generar fitasa endógena, para mejorar el valor nutritivo de material vegetal mediante la liberación del fosfato inorgánico a partir ácido fítico (hexaquisfosfato de mio-inositol) y sus derivados. Además, las fitasas utilizadas en la alimentación animal también han aliviado la contaminación por fósforo ambiental resultante del fósforo no digerido en la alimentación animal.

Las lipoxigenasas son enzimas que catalizan la peroxidación de grasas poli-insaturadas por oxígeno y se encuentran bastante extendidas en la naturaleza, por ejemplo, existen en grandes concentraciones en soya, así como en otros cereales (Hoseney, 1994). Existe un gran número de isoenzimas de la lipoxigenasa con diferentes actividades, en donde, una de sus principales distinciones es que si una isoenzima atacara los ácidos grasos en los triglicéridos produce ácidos grasos libres. Por ejemplo, las lipoxigenasas de la soya atacan triglicéridos, mientras que las lipoxigenasas del trigo necesitan tener ácidos grasos libres para activarse. La enzima tiene una serie de efectos sobre las masas de harina de trigo, por un lado, es un agente blanqueador, pero junto con la oxidación tiende a destruir los pigmentos amarillos en la harina de trigo (Delcour y Hoseney, 2010). Esto es benéfico en la masa de pan, pero un factor negativo en productos de pasta, para los que se desea el color amarillo. La enzima también aumenta la estabilidad de mezcla de las masas de harina de trigo y se ha reportado que altera la reología de la masa para producir una masa más fuerte (Rizzello *et al.*, 2014).

#### IV. ULTRASONIDO Y SUS APLICACIONES

El ultrasonido es una forma de energía generada por las ondas de sonido, creadas por la vibración de un cuerpo elástico y propagadas en un material, sus frecuencias son demasiado altas para ser detectadas por el oído (Herrero y de Avila, 2006; Yildirim *et al.*, 2013). El ultrasonido de potencia representa, hoy en día, una tecnología novedosa, la cual ha creado bastante interés debido a sus efectos promisorios en las áreas de procesamiento y conservación de alimentos (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). Sin embargo, y aunque actualmente es considerada una tecnología emergente, el uso de este método no se ha promovido para su aplicación en productos comerciales. Sólo ha sido reconocido como una tecnología que asiste o ayuda en la modificación de procesos o tiende a mejorar los existentes.

El ultrasonido se ha usado física o químicamente en muchos aspectos del procesamiento y conservación de alimentos. Por ejemplo, la pasteurización, la esterilización, la generación de emulsiones, la interrupción de las células, la promoción de reacciones químicas, la inhibición de enzimas, el ablandamiento de la carne, entre otros. Además, también cuenta con aplicaciones en procesos tales como medios de comunicación, síntesis de compuestos químicos, localización de partes débiles en estructuras de concretos y tratamientos de enfermedades (Dolatowski *et al.*, 2007).

Esta nueva tecnología ofrece ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, ya que se obtienen mejores tiempos de proceso, mejora la calidad, reduce riesgos químicos y físicos y es considerada ambientalmente amigable (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012).



El ultrasonido es un campo en rápido crecimiento en la investigación, que está encontrando uso creciente en la industria alimentaria (Yildirim *et al.*, 2011). Sin embargo, su implementación en la industria alimentaria viene asociada con el efecto de la cavitación (Dolatowski *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha usado para mejorar la transferencia de masa en los sistemas de alimentos sólidos/líquidos. Zhang *et al.* (2011) reportaron que la aplicación del ultrasonido para promover la lixiviación de oligosacáridos en las leguminosas y para reducir el tiempo de cocción del arroz era favorable, corroborándose con informes de que la aplicación de frecuencias de entre 20 y 100 kHz en el área de procesos de alimentos eran las ideales para el tratamiento del arroz y la separación del pericarpio del maíz (Janve *et al.*, 2013). Es importante mencionar que para poder hacer uso del ultrasonido se deben de tomar en cuenta ciertas condiciones, entre ellas la intensidad y el tiempo. El ultrasonido se clasifica como de baja intensidad o no destructiva y de alta intensidad o destructiva (Mawson *et al.*, 2011)

El uso de una intensidad alta tiene diferentes aplicaciones, suele alterar materiales debido a la energía que conlleva su aplicación; usualmente se utiliza para inactivar microorganismos, esterilizar áreas y alimentos (Mawson *et al.*, 2011). Además de producir partículas muy finas con propósitos más específicos y su implementación de poder combinarse con otros factores simultáneamente, entre los más conocidos temperatura y la presión (Herrero y de Avila, 2006). De igual manera, la intensidad baja puede utilizarse para análisis no invasivos y de monitoreo de diversos materiales alimenticios durante su procesamiento y almacenamiento, para garantizar alta calidad e inocuidad (Ulloa *et al.*, 2013). Se han realizado diversos estudios con la técnica del ultrasonido, entre ellos el caso del grano de cebada que al aplicársele una intensidad baja de 20 kHz, la acción fue favorecedora ya que estimuló la germinación de la semilla, así como también, elevó la actividad de alfa amilasa medida en el estudio, sin ser necesario añadir algún aditivo al proceso de malteo (Yaldagard *et al.*, 2007).

Por otro lado, el uso de ultrasonido en otros alimentos como son las hortalizas tiene efectos diversos como es el caso del ajo fresco, en donde el objetivo del estudio fue el optimizar los parámetros de ultrasonido para incrementar la actividad de alinasa, además de estudiar los efectos de algunos factores como son temperatura, pH, químicos y iones metálicos, entre otros; se aplicaron distintas frecuencias de 28 - 100 kHz y potencias de 0.1 – 0.7 W para ver en que rango se encontraba su actividad óptima, en donde concluyeron que a bajas frecuencias y potencias intermedias a las aplicadas, se puede tener un buen rendimiento enzimático en este caso de alinasa, sin afectar los factores de temperatura y pH (Wang *et al.*, 2011).

En un estudio de Abadía García *et al.* (2016) se reportó el comportamiento del tratamiento de ultrasonido y proteasas vegetales (papaína y bromelina) en las proteínas de suero de leche. El trabajo consistió en aplicar una potencia de 750 W a una frecuencia de 20 kHz, a diferentes condiciones, resultando fue que a bajas potencias de ultrasonido se tuvieron mejores efectos en la hidrólisis del suero de leche por la actividad de bromelina, que en el caso de papaína.

## **V. HIPOTESIS**

El uso del ultrasonido a potencias bajas previo a la germinación del grano de trigo, incrementará las actividades de alfa amilasa y peptidasas.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Determinar el efecto del ultrasonido y el tiempo de germinación en la actividad de alfa amilasa y peptidasas en dos variedades de trigo.

### **6.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar fisicoquímicamente a las dos variedades de trigo.
- Determinar el potencial de germinación de las dos variedades de trigo.
- Evaluar la pérdida de sólidos y determinar las actividades de alfa amilasa y peptidasas durante la germinación de las dos variedades de trigo.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Material Biológico**

Se utilizaron dos variedades de trigo, Ónavas y Patronato, que fueron donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Ciudad Obregón, Sonora, México.

### **7.2 Propiedades Físicas de las dos Variedades de Trigo**

Primeramente, el grano de ambas variedades se analizó visualmente para descartar alguna infección y se procedió a limpiar las variedades de trigo descartando grano quebrado, grano chupado, grano en mal estado, paja y otras impurezas. Posteriormente, se determinaron las siguientes propiedades físicas.

#### **7.2.1 Peso Hectolítrico**

Este ensayo se determinó de acuerdo al método 55-10.01 (AACC, 2001). Se utilizó un medidor Winchester (Seedburo Equipment Co., Chicado, IL.). Se llenó el contenedor del medidor Winchester con cada una de las variedades de trigo por separado, la abertura que tiene en la parte inferior se abrió dejando caer el trigo sobre un recipiente de 1 litro, el excedente del contenedor se rasó y se

pesó el recipiente lleno de grano. Se tomó la diferencia entre el peso del recipiente vacío y el peso del recipiente rasado, para después dividir la diferencia de peso entre el volumen del contenedor. Este análisis fue realizado por quintuplicado y los resultados fueron reportados en kg/hL.

### **7.2.2 Peso de 1000 Granos**

Se utilizó grano limpio para la determinación del peso de mil granos basado en el procedimiento reportado por Serna-Saldívar (2003). Se pesaron 100 granos de cada variedad tomados al azar, un total de diez veces, obteniendo el promedio de las 10 multiplicado por 10, el análisis se realizó por quintuplicado.

### **7.3 Análisis Proximal de las dos Variedades de Trigo**

Se realizó el análisis proximal a las harinas de grano crudo de acuerdo a los métodos oficiales de la AACC (2001), mismos que se detallan a continuación: La humedad se obtuvo por secado en estufa a 100 – 105 °C por 48 h, de acuerdo al método 44-15. El contenido de proteína se determinó utilizando el nitrógeno por la técnica de micro-Kjeldahl, usando 5.7 como factor de conversión para obtener la cantidad de proteína, siguiendo el método 46-13. El contenido de grasa se evaluó por la técnica de Goldfish, en base al método 30-25. Las cenizas se determinaron por incineración a 500 °C por 12h, de acuerdo al método 08-21. Por último, el contenido de carbohidratos se calculó por diferencia, es decir 100- (% proteína + % grasa + % cenizas + % humedad). Cada análisis fue realizado por triplicado.

#### 7.4 Porcentaje de Germinación

El porcentaje de germinación se midió colocando 50 semillas de cada variedad en una caja Petri, agregándole 4 ml de agua destilada y se dejaron germinar por 3 días en oscuridad a 25 °C y 90% de humedad relativa (HR). Esta prueba se realizó por triplicado en donde se contaron las semillas que germinaron, dividiendo este número entre 50 y se multiplicó por 100 para determinar el porcentaje de germinación.

#### 7.5 Experimento de Germinación

Se realizó el experimento de germinación por duplicado, colocando 50 g de granos de cada variedad en bolsas de ixtle, previamente sanitizados y remojados por 20 horas en agua destilada con aireación. Se sonicaron las muestras a 3 potencias diferentes (27, 81 y 108 Watts) a una frecuencia de 25 kHz por 3 minutos en un equipo ultrasónico de reacción por microondas (XO-SM50, Nanjing Xianou Instrument Manufacturing Co., Ltd., China) antes de ser germinadas a 25 °C y humedad relativa >90%. Se retiraron de la cámara dos bolsas de cada variedad de trigo, a los 1, 3, 5, y 7 días. Se pesó el trigo germinado y se secó en una estufa de convección forzada (modelo 1321F, VWR International, USA, Sheldon manufacturing INC) a 50°C por 48 h y se determinó la humedad de cada muestra. Posteriormente, se separaron las raicillas y brotes y se molió el grano germinado utilizando un molino CYCLOTEC 1093 (Foss Tecator, Hoganas, Sweden) con malla de 0.5 mm. Las muestras molidas se pasaron a un contenedor herméticamente sellado y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

## 7.6 Pérdida de Sólidos

El grano germinado incluyendo brotes y raicillas fue pesado y se calculó la pérdida de sólidos de acuerdo a la siguiente forma:

$$\text{Pérdida de sólidos (\%)} = \left[ \frac{(Ax B) - (Cx D)}{(Ax B)} \right] \times 100$$

A= Peso inicial del grano (g).

B= Contenido de humedad del grano crudo (g).

C= Peso del grano germinado sin brotes y raicillas (g).

D= Contenido de humedad del grano germinado (g).

## 7.7 Medición de la Actividad de Alfa Amilasa

La actividad de alfa amilasa se determinó por dos métodos; uno indirecto utilizando el analizador rápido de viscosidad (RVA) y otro directo mediante el kit comercial de Megazyme (International, Ireland, Método Ceralpha, Method 22-02.01 (AACC, 2001)

### 7.7.1 Medición Indirecta de la Actividad de Alfa Amilasa

La determinación indirecta de la actividad de ésta enzima se realizó por el método 22-08 (AACC, 2001) en el analizador rápido de viscosidad (RVA), a 95 °C por 3 minutos, una velocidad inicial de agitación de 960 rpm y una velocidad de prueba de 160 rpm y se obtuvo la viscosidad máxima en centipoise (cP). Se utilizaron 3 g de fécula de maíz ajustados a un 14% de humedad, con 24 mL de agua destilada más 1 mL de extracto enzimático de la muestra. Se pesaron



0.10 g de muestra germinada (base seca), se le añadieron 2 mL de  $\text{CaCl}_2$  (200 ppm), con agitación por 15 minutos en intervalos de 3 minutos. Se filtró la suspensión en papel Whatman No. 1 y se tomó 1 mL del extracto para el análisis en el RVA.

### **7.7.2 Medición de la Actividad de Alfa Amilasa por el Método Ceralpha**

Se pesaron 0.5 g de muestra y se aforó a 100 mL con una solución buffer de extracción de malta (1% NaCl 0.02%  $\text{CaCl}_2$ , 0.02%  $\text{NaN}_3$ ), se agitó por 20 min, se centrifugó por 10 min a 3400 rpm y se obtuvo el sobrenadante (extracto). Se tomaron 0.5 mL del extracto y se colocó en 9.5 mL de solución de extracción (Buffer A), dejándose en reposo por 2 h. Posteriormente se incubaron por 5 minutos los tubos con el reactivo específico de amilasa y los tubos contenientes del extracto de malta. Después se incubó el extracto con la mezcla del sustrato BPNPG7 (p-nitrofenil maltoheptaósido bloqueado, más glucoamilasa y  $\alpha$ -glucosidasa) a 40°C por 10 min. La reacción fue terminada por la adición de la solución de detención. La absorbancia fue leída a 400 nm y está directamente relacionado con el nivel de alfa amilasa en el extracto de malta de trigo. La harina de malta de cebada suministrada por el proveedor del kit y agua destilada se utilizaron como blancos para la medición.

### **7.8 Medición de la Actividad de Peptidasas**

La actividad de las peptidasas se midió de acuerdo al método reportado por Rani *et al.* (2001) con modificaciones. Se tomaron 0.25 g de harina del grano germinado a los distintos tiempos de germinación, las cuales fueron extraídas con fosfato de sodio 1.5 mL (pH 7.5) con agitación por 1 minuto. Se realizó una agitación magnética por 2 horas a 4°C. Las suspensiones se centrifugaron

(9,200 rpm) por 15 minutos, se decantó y guardó la muestra en refrigeración. Posteriormente, se utilizó azocaseína (0.25 g) como sustrato en 1 mL buffer de fosfato de sodio (pH 7.5), para medir la actividad de peptidasas. Se tomaron 50  $\mu$ L de solución de azocaseína y se adicionaron a 450  $\mu$ L de solución buffer para después pre- incubar a 37°C por 10 minutos. seguidamente, se adicionó 200  $\mu$ L del extracto de enzima a la mezcla de buffer con sustrato, agitándose vigorosamente. Después, se incubó la mezcla por 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 0.5 mL de TCA (Ácidotricloroacético) al 10%, se agitó y dejó reposar por 15 minutos. Se separó el sobrenadante y se le adicionó 40  $\mu$ L de NaOH 10M. Se elaboró una curva de tripsina (T7409 SIGMA) como estándar para la medición de actividad enzimática. La absorbancia se leyó a 440 nm, como blanco se utilizó una mezcla de buffer, enzima extraída, TCA y sustrato, en ese orden.

## 7.9 Análisis Estadístico

Para la caracterización fisicoquímica se realizó una estadística descriptiva, expresando los valores de la media y desviación estándar. Para el experimento de germinación se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x4, en donde los factores estudiados fueron variedad (VAR) de trigo (Ónavas Y-14 y Patronato Y-14) y potencias de ultrasonido (POT US), 0, 27, 81 y 108 Watts. El análisis de datos se realizó mediante un anova GLM, en base al siguiente modelo completo:

$$VR = \text{TIEMPO} + \text{VAR} + \text{POT US} + \text{POT US} * \text{VAR} + \epsilon_{ijk}$$

En donde las variables respuesta (VR) son la pérdida de sólidos y actividades de alfa amilasa y peptidasas. Se realizó una comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer. Se estimó significancia a una probabilidad de 0.05 en el error. Todos los datos fueron analizados en el paquete estadístico NCSS 7.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Propiedades Físicas

El peso hectolítrico es el criterio más utilizado para determinar el grado y calidad de los cereales, ya que éste parámetro se relaciona con la densidad real del grano, ya sea en base a su composición química, estructura biológica y el contenido de humedad. Además, la estructura del endospermo o el contenido de proteína que contenga el grano tienden a relacionarse, así como el estado de salud del mismo, ya que granos dañados (quebrados, chupados, entre otros) tienen un peso hectolítrico menor que los que son sanos y vítreos, que cuentan con una mayor densidad (Serna-Saldívar, 1996). En el caso de la variedad Patronato, el peso hectolítrico es mayor comparado con Ónavas, ya que es un trigo durum, obteniendo mayor densidad a granel (Tabla 1). En cambio, el peso de mil granos es un parámetro en donde se tiene como indicador el tamaño del grano, el cual está relacionado con el rendimiento de molienda en trigo y otros granos, por lo que la industria molinera prefiere granos uniformes y grandes ya que contienen mayor proporción del endospermo. La variedad Ónavas tuvo mayor peso comparado con Patronato, ya que es un grano grande y suave, utilizado comúnmente para la industria harinera.

Tabla 1. Propiedades físicas de las variedades Patronato y Ónavas

Variedad	Peso Hectolítrico (Kg/hL)	Peso de 1000 Granos (g)
Patronato	84.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	44.0±0.5 <sup>a</sup>
Ónavas	80.3 ± 0.4 <sup>b</sup>	49.0±0.6 <sup>b</sup>

Media de quintuplicados ± desviación estándar.

## 8.2 Análisis Proximal

### 8.2.1 Contenido de Humedad

El contenido de humedad es uno de los aspectos más importantes durante los procesos de compra, venta, secado y almacenamiento de granos (Alizaga y Mora, 1982) . Es un parámetro importante ya que interviene en la calidad del grano, indicando la cantidad de materia seca que el comprador está obteniendo, así como las condiciones favorables que debe tener para su almacenamiento y evitar pérdidas (Serna-Saldívar, 1996). El contenido de humedad de la variedad Patronato fue de 8.8% y el de Ónavas, 9.3% (Tabla 2). La humedad crítica es de un 14%, es decir, que contenidos superiores a este porcentaje indicarían el que sean más propensos a deteriorarse y necesitarían condiciones favorables como aireación o secado para su almacenaje. El contenido de humedad de ambas variedades se encuentra por debajo del límite crítico para un almacenamiento seguro.

Tabla 2. Análisis proximal del grano de las variedades Patronato y Ónavas

Variedad	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)	Carbohidratos*
Patronato	8.8±0.5 <sup>a</sup>	16.7±0.1 <sup>a</sup>	2.0±0.1 <sup>a</sup>	1.7±0 <sup>a</sup>	70.4
Ónavas	9.3±0.4 <sup>b</sup>	17.4±0.3 <sup>a</sup>	2.1±0.1 <sup>a</sup>	1.6±0 <sup>b</sup>	69.60

Media de triplicados ± desviación estándar.\*Calculados por diferencia.

### 8.2.2 Contenido de Proteína

Entre los segundos compuestos más abundantes en la cariósida es el de las proteínas, las cuales se encuentran en distintas partes del grano (Serna-Saldívar, 1996). La cantidad de proteína difiere en los distintos cereales y hasta incluso dentro del mismo cereal y algunas cosechas. El contenido de proteína en los cereales es de un 8–16%. La variedad Patronato presentó un contenido de proteína de un 16.7% y la variedad Ónavas un 17.4% (Tabla 2), teniendo un ligero aumento la variedad Ónavas comparada con Patronato, pero no hubo diferencias entre ambas variedades. Por lo tanto, en base al alto contenido en porcentaje de proteína pueden esperarse buenos rendimientos en la industria panadera y de pastas.

### 8.2.3 Contenido de Grasa

Los cereales tienen baja cantidad de compuestos liposolubles, pero es un factor importante desde el punto de vista crítico en la industria por cuestiones de estabilidad en los procesos alimentarios (Serna-Saldívar, 1996). El contenido de grasa se puede observar en la Tabla 2, no se observaron diferencias significativas en el contenido de este componente. Este parámetro es importante ya que si se tuviera un mal almacenamiento del grano conllevaría a

la formación de ácidos grasos libres que puedan afectar el pH, incrementando la susceptibilidad a enranciarse y a producir malos olores y sabores en productos finales.

#### **8.2.4 Contenido de Cenizas**

Los cereales son considerados como fuente importante de algunos minerales y vitaminas, en general, el pericarpio, el germen y la capa aleurona son ricos en estos constituyentes (Serna-Saldívar, 1996). En el caso de nuestros trigos de estudio, se encontraron con valores normales entre lo recomendado en la industria alimentaria, teniendo a Patronato con un valor de 1.7% y a la variedad Ónavas con 1.6%, esto se puede apreciar en la Tabla 2. Estos valores fueron diferentes en ambas variedades teniendo a Patronato con mayor cantidad mineral comparada con Ónavas, esto quizás siendo por la composición del grano. Su contenido es considerado un factor importante para la determinación de calidad y clasificación de una harina determinada.

#### **8.2.5 Contenido de Carbohidratos**

Aproximadamente el 80% del grano está compuesto por carbohidratos. De un 3 – 5 % de los carbohidratos son estructurales, es decir, forman parte de la fracción fibrosa, el resto es material de reserva constituido principalmente por almidón. En la variedad Patronato se observó un 70% de carbohidratos y en la variedad Ónavas un 69% (Tabla 2), éstos fueron calculados en base a la diferencia entre 100% y el porcentaje de los demás constituyentes.

### 8.3 Porcentaje de Germinación

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de germinación para ambas variedades. Esta prueba determina la viabilidad del grano para germinar o desarrollarse, al paso de 3 días de germinación bajo condiciones controladas se determina el porcentaje de granos que generaron radícula o brote. Tanto Patronato como Ónavas, cumplieron con los porcentajes esperados, teniendo buen desarrollo de radícula al tercer día de germinación.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de las variedades Patronato y Ónavas

<b>Variedad</b>	<b>% Germinación</b>
<b>Patronato</b>	88 ± 5.29
<b>Ónavas</b>	97 ± 1.15

Media de triplicados ± desviación estándar.

### 8.4 Experimento de Germinación

En la Tabla 4, se muestran los valores de probabilidad de los efectos de los términos del modelo completo en las variables respuesta. El tiempo de germinación tuvo un efecto muy significativo en todas las variables respuesta ( $p < 0.0001$ ). Asimismo, la variedad y el tratamiento de US mostraron efectos significativo en todas las variables respuesta, excepto en la pérdida de sólidos ( $p > 0.05$ ). La interacción VAR\*POT US fue significativa ( $p = 0.029$ ) solo para la actividad de alfa amilasa medida por el método Ceralpha.



Tabla 4. Valores de probabilidad de los efectos de los términos del modelo completo en las variables respuesta de las dos variedades de trigo.

<b>Factores</b>	<b>Pérdida de Sólidos</b>	<b>Viscosidad Máxima</b>	<b>Actividad A-amilasa</b>	<b>Actividad de Peptidasas</b>
<b>POT de US (A)</b>	0.4040	0.0158	<0.0001	0.0005
<b>Variedad (B)</b>	0.0533	<0.0001	0.0003	<0.0001
<b>Tiempo de Germinación (C)</b>	0.0000*	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>AB</b>	0.9113	0.7537	0.0286	0.4230

La Tabla 5 muestra los promedios de las variables respuesta de las dos variedades de trigo, bloqueando los días de germinación. Se observaron diferencias significativas en la viscosidad máxima a partir del tercer día. En cuanto a la actividad de alfa-amilasa, Ónavas mostró una actividad significativamente mayor que la de Patronato desde el día cero al cuarto. Al séptimo día de germinación, la actividad de peptidasas fue significativamente mayor que la de Patronato (145.4 vs 72.8 U/g).

Los valores promedios de las variables respuesta de las dos variedades de trigo a los distintos tratamientos de ultrasonido se presentan en la Tabla 6. No se observaron diferencias significativas en la mayoría de las variables respuesta de Ónavas y Patronato, excepto en la viscosidad máxima al aplicar 108 Watts (835 vs 951 cP).

Tabla 5. Valores promedios de las variables respuesta de las dos variedades de trigo a los distintos días de germinación.

Germinación (Días)	Pérdida de Sólidos (%)		Viscosidad Máxima (cP)		Actividad de alfa amilasa (U/g)		Actividad de peptidasas (U/g)	
	Onavas	Patronato	Onavas	Patronato	Onavas	Patronato	Onavas	Patronato
0	1.66 <sup>a</sup>	1.59 <sup>a</sup>	1490 <sup>a</sup>	1532 <sup>a</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.56 <sup>b</sup>	16.9 <sup>a</sup>	15.4 <sup>a</sup>
1	2.65 <sup>a</sup>	2.41 <sup>a</sup>	1513 <sup>a</sup>	1448 <sup>a</sup>	1.56 <sup>a</sup>	0.70 <sup>b</sup>	20.2 <sup>a</sup>	18.9 <sup>a</sup>
3	16.48 <sup>a</sup>	12.83 <sup>a</sup>	725 <sup>b</sup>	1012 <sup>a</sup>	6.78 <sup>a</sup>	4.42 <sup>b</sup>	32.9 <sup>a</sup>	28.3 <sup>a</sup>
5	34.40 <sup>a</sup>	32.88 <sup>a</sup>	405 <sup>b</sup>	643 <sup>a</sup>	11.38 <sup>a</sup>	9.89 <sup>b</sup>	52.0 <sup>a</sup>	37.7 <sup>a</sup>
7	48.10 <sup>a</sup>	44.55 <sup>a</sup>	270 <sup>b</sup>	444 <sup>a</sup>	12.65 <sup>a</sup>	12.81 <sup>a</sup>	145.4 <sup>a</sup>	72.8 <sup>b</sup>

\*Valores con letra distinta correspondientes a cada variable respuesta y renglón son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Tabla 6. Valores promedios de las variables respuesta de las dos variedades de trigo a los distintos tratamientos de ultrasonido.

Tratamiento de US	Pérdida de Sólidos (%)		Viscosidad Máxima (cP)		Actividad de alfa amilasa (U/g)		Actividad de peptidasas (U/g)	
	Onavas	Patronato	Onavas	Patronato	Onavas	Patronato	Onavas	Patronato
Control	19.9 <sup>a</sup>	18.2 <sup>a</sup>	916.9 <sup>a</sup>	1048 <sup>a</sup>	6.0 <sup>a</sup>	6.3 <sup>a</sup>	46.5 <sup>a</sup>	23.7 <sup>a</sup>
27 Watts	22.3 <sup>a</sup>	19.5 <sup>a</sup>	870 <sup>a</sup>	983 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	6.2 <sup>a</sup>	68.8 <sup>a</sup>	40.0 <sup>a</sup>
81 Watts	20.9 <sup>a</sup>	19.1 <sup>a</sup>	900 <sup>a</sup>	1081 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	60.4 <sup>a</sup>	45.7 <sup>a</sup>
108 Watts	19.4 <sup>a</sup>	18.5 <sup>a</sup>	835 <sup>b</sup>	951 <sup>a</sup>	7.5 <sup>a</sup>	6.1 <sup>a</sup>	38.4 <sup>a</sup>	29.2 <sup>a</sup>

\*Valores con letra distinta correspondientes a cada variable respuesta y renglón son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

La Figura 2 muestra el grano remojado y sonicado de las dos variedades de trigo a los distintos días de germinación. Es importante mencionar que el objetivo de este experimento es lograr modificar el grano y sintetizar las

enzimas de interés, sin tener una pérdida de sólidos elevada. En el caso de la germinación de cebada con éste mismo propósito, se presenta una pérdida de sólidos entre el 10 – 13%. En la literatura, se ha encontrado que el uso del ultrasonido mejora la germinación en distintos productos, por ejemplo en cebada, en zanahoria y en distintos granos y semillas (Aladjadjiyan, 2002; Yaldagard *et al.*, 2007) . Como es el caso del experimento de Goussous *et al.* (2010), donde al aplicar el ultrasonido al grano de trigo antes de la siembra, por solo 5 y 30 min respectivamente, pudieron mejorar el proceso de germinación para obtener un mayor nivel de plantas, estos resultados se pueden comparar con el presente estudio.

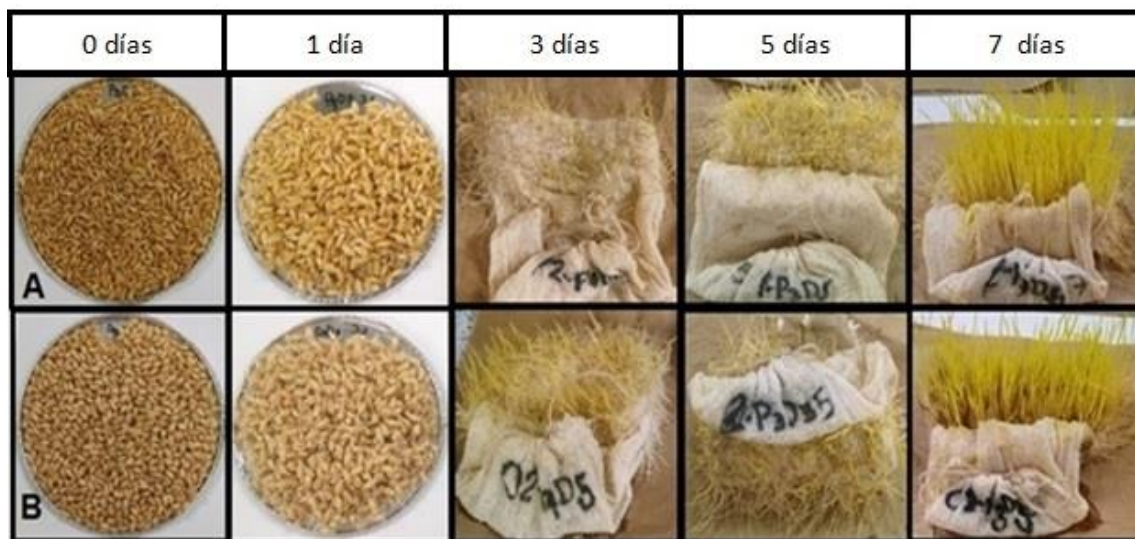


Figura 2. Grano remojado y sonicado de las variedades de trigo Patronato (A) y Ónavas (B) a los 0, 1, 3, 5 y 7 días de germinación.

Aladjadjiyan (2012) reportó que la longitud de las plántulas de lentejas aumenta con el tiempo de exposición al ultrasonido y con el incremento del tratamiento de sonicado. Por ello, se demuestra que el ultrasonido ejerce efectos mecánicos (cavitación acústica) y ruptura de las paredes celulares de las plantas, lo que aumenta la absorción de agua, fase importante de la germinación que tiende a verse afectada negativamente por las bajas

temperaturas. El exceso de agua absorbida reacciona libremente y fácilmente con células del embrión, por lo que los procesos metabólicos tales como la liberación del ácido giberélico y la activación de las enzimas son acelerados (Yaldagard y Mortazavi, 2008), reduciéndose significativamente el tiempo medio de germinación y aumenta la tasa y rendimiento de germinación.

Sheraki *et al.* (2015) encontraron una mejora en el rendimiento de la germinación y crecimiento de la planta, al aplicar un tratamiento de ultrasonido a semillas de ajonjolí, especialmente a temperaturas subóptimas. Este aumento en la capacidad de germinación se debe a que el ultrasonido provocó una modificación interna en las semillas, es decir, fisuras en las capas aleuronas, endospermo y pericarpio, dando una mayor absorción de agua y así dar pasó al proceso de germinación.

Otros trabajos han indicado que el uso del ultrasonido a 42 kHz en semillas de lentejas y trigo mejoraron las primeras etapas de crecimiento de la planta (Aladjadjian, 2011). Existe otro estudio relacionado a garbanzo, en el cual se evaluó si la aplicación del ultrasonido (100 - 300 W y 20 kHz - 40 kHz) podía favorecer una mayor retención de agua por parte del grano, dando como resultado la reducción del tiempo de remojo y cocimiento, lo cual fue favorecedor con la aplicación de esta nueva técnica emergente (Yildirim *et al.*, 2011) En un estudio realizado por Shewale y Pandit (2009), se aplicó ultrasonido a 750 W de potencia y una frecuencia de 20 kHz a sorgo, y se observó que las muestras germinadas mostraron niveles altos de sacarificación del almidón, incrementándose un 90% la glucosa en las distintas clases de sorgo utilizadas en este estudio.

## 8.5 Pérdida de Sólidos

En la Figura 3, se observa que conforme pasan los días de germinación, la pérdida de sólidos en ambas variedades aumenta, independientemente del tratamiento de US, esto debido a la degradación de los componentes de reserva, principalmente almidón y proteínas. El peso de la plántula también aumenta, produciéndose una cantidad mayor de CO<sub>2</sub> (Gorim y Asch, 2012).

En el proceso de malteo de cebada, la pérdida de sólidos es entre 10-13% (Steiner *et al.*, 2012). En el presente estudio, este parámetro alcanzó valores entre el 40 y 50 % a los 7 días de germinación. Es importante mencionar que la pérdida de sólidos incluye a la radícula y brotes, los cuales son eliminados. El objetivo en el malteo es modificar el grano y la síntesis de enzimas, por lo que es necesario determinar hasta qué punto debe detenerse el proceso de germinación, para que éste sea económicamente factible, ya que lo que se busca es tener un producto modificado y sintetizar enzimas de interés.

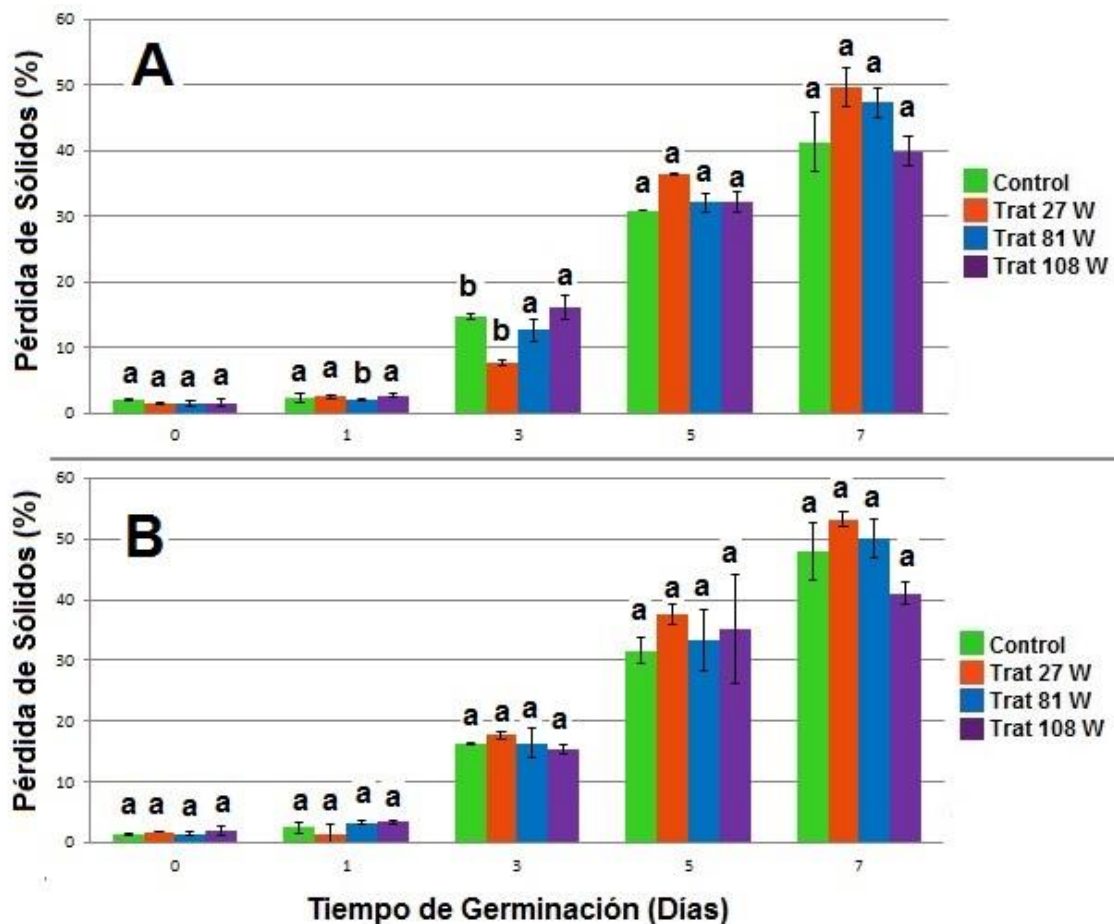


Figura 3. Pérdida de sólidos durante la germinación de las Variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometida a los tratamientos de ultrasonido. Valores con letra distinta entre variedades y tiempo de germinación son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

## 8.6 Medición de la Actividad de Alfa Amilasa

### 8.6.1 Medición Indirecta de la Actividad de Alfa Amilasa

En general, a medida que aumenta el tiempo de germinación la viscosidad máxima va descendiendo. Lo que indica que la actividad de la alfa amilasa se va incrementando. A partir del tercer día, se observaron diferencias significativas en la viscosidad máxima de ambas variedades (Figura 4). Al tercer

día, con la aplicación de 27 y 108 Watts a Patronato y Ónavas, respectivamente, se produjo una mayor disminución ( $p < 0.05$ ) de la viscosidad máxima, comparadas con la potencia de 81 Watts y el control. Se puede observar cómo va en decremento la viscosidad máxima con el paso de los días, ya que la actividad de ésta enzima es inversamente proporcional a la viscosidad debido al efecto que tiene en la hidrólisis del almidón.

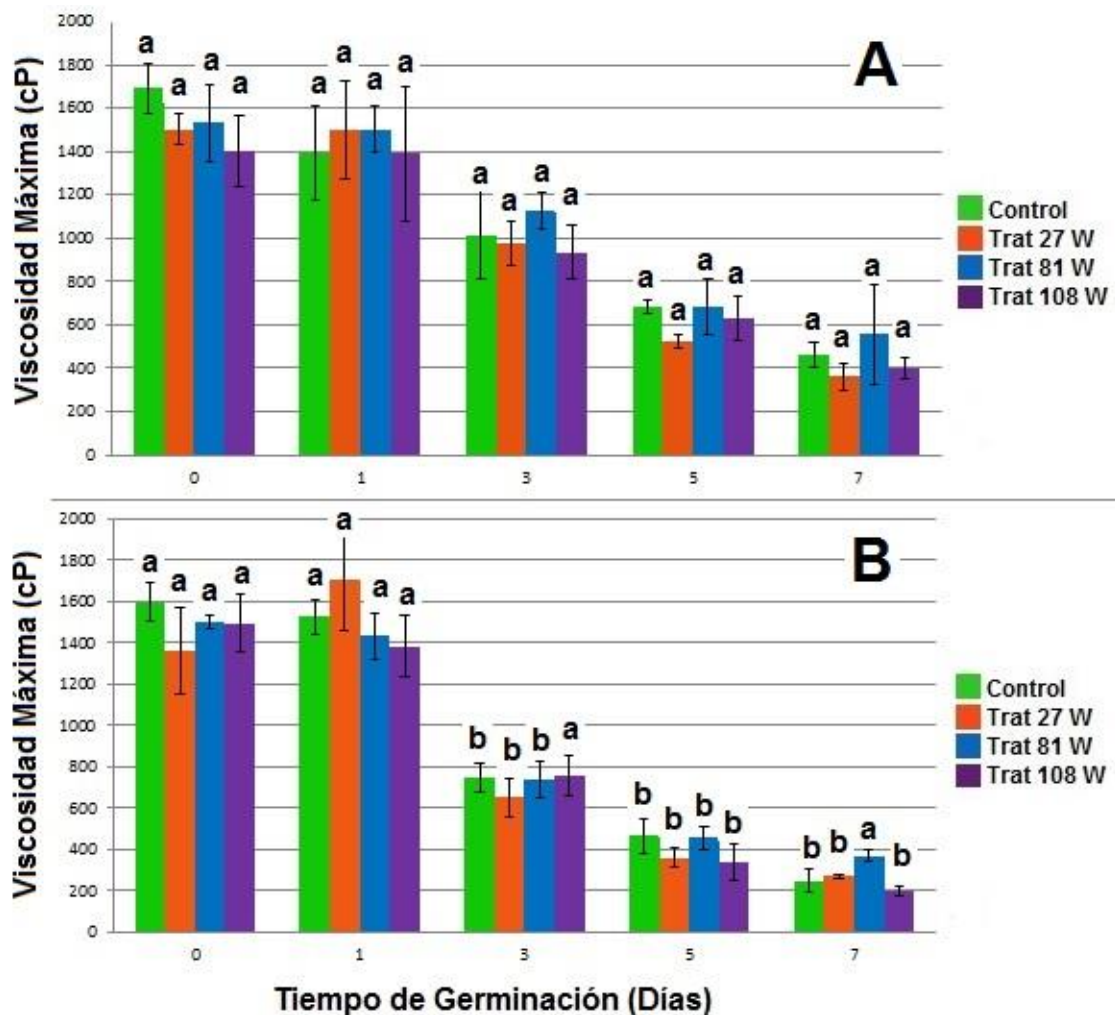


Figura 4 Viscosidad máxima de las variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometidas a los tratamientos de sonicación. Valores con letra distinta entre variedades y tiempo de germinación son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

### **8.6.2 Medición de la Actividad de Alfa Amilasa por el Método Ceralpha**

La actividad de alfa amilasa durante la germinación de ambas variedades se muestra en la Figura 5. Al tercer día, hubo un incremento ( $p < 0.05$ ) en la actividad de ésta enzima, la variedad Ónavas tuvo mayor ( $p < 0.05$ ) actividad que Patronato. En general, Ónavas mostró valores superiores de la actividad de esta enzima en relación con la variedad Patronato.

Existen algunos estudios en grano de cebada, en donde la aplicación de ultrasonido estimula el porcentaje de germinación e incrementa la actividad de alfa amilasa (Yaldagard *et al.*, 2007). En este estudio, se utilizaron diferentes potencias (20, 60 y 100 W) con una frecuencia de 25 kHz, dando como resultado que la sonicación modificó el proceso de malteo, donde los niveles de actividad de alfa amilasa se incrementaron significativamente, comparados con los niveles de actividad amilásica encontrados en el proceso convencional del malteo.

Los estudios de aplicación de ultrasonido en granos de trigo son escasos, sin embargo, la aplicación de ultrasonido es una tecnología innovadora para la tecnología alimenticia e industrial, por ello es ampliamente utilizado en diversas áreas, ya sea para intensificar la actividad enzimática, erradicar microorganismos o enzimas en el caso de la descomposición de los alimentos.



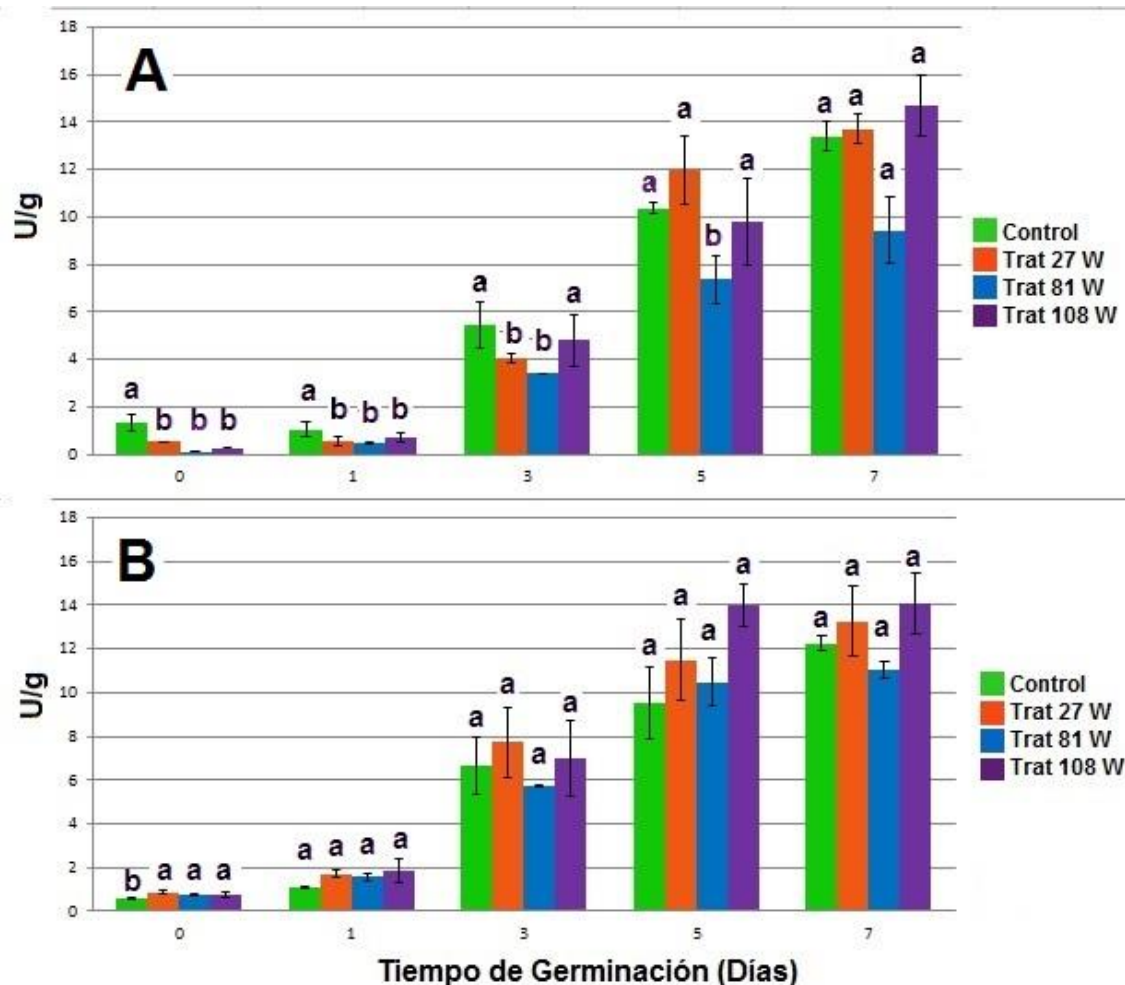


Figura 5. Actividad de Alfa Amilasa de las variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometidas a sonicación y germinación. Valores con letra distinta entre variedades y tiempo de germinación son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

En diversos estudios se ha utilizado el ultrasonido para modificar el comportamiento de las enzimas. Leaes *et al.* (2013) estudiaron la actividad de alfa amilasa aplicándole ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz y una potencia de 132 W, observando su comportamiento en un rango de temperatura específico (35 - 60°C) y un pH entre 3.5 - 5.9. Se encontró que al aumentar la temperatura incrementó ( $p < 0.05$ ) la actividad de la enzima. Lo cual se corrobora con otros artículos en donde se ha probado que el rendimiento enzimático se afecta naturalmente por la reacción del medio al cual se ha sometido. Este efecto tiende a aumentar con el uso de líquidos iónicos en conjunto con el

medio aplicado ayudando a la interacción ultrasonido-enzima en la mayoría de las veces (Delgado Povedano y de Castro, 2015).

Las intensidades aplicadas tienden a influir en el rendimiento de las enzimas, como fue el caso del estudio por parte de Shi *et al.* (2013) en donde al aplicarle una potencia de 200 – 250 W al grano de garbanzo por 30 minutos la actividad de alfa amilasa fue inhibida, es por ello que se ha encontrado que a potencias bajas de 110-130 W presenta mayor actividad esta enzima.

Se puede decir que la aplicación de ultrasonido a los granos de trigo tuvo un efecto favorecedor comparado con distintos alimentos, en donde a bajas frecuencias la irradiación de energía a través de líquidos puede causar efectos estables en la cavitación, ya que la fuerza de radiación y el movimiento de los líquidos a través de la materia aplicada inducen a la oscilación de las burbujas, alterando la composición de la materia, para que en base a esa modificación tengan una mayor interacción las enzimas y los componentes, incrementando así la actividad enzimática y por consiguiente la degradación interna de los cereales.

### 8.7 Medición de la Actividad de Peptidasas

En la Figura 6 se observa un incremento en la actividad de peptidasas a medida que aumenta el tiempo de germinación, siendo Ónavas la que presenta valores mayores de esta actividad. En la variedad Patronato, la actividad enzimática aumenta respecto al tiempo, teniendo que la potencia de 81 W fue mayor ( $p < 0.05$ ) al día 7 respecto a las demás potencias y el control. Por otro lado, para la variedad Ónavas, las potencias de 108 W y 27 W al día 5 y 7 respectivamente, aumentaron la actividad de peptidasas. Al incrementar el tiempo de germinación aumentó la actividad de peptidasas en ambas variedades, se observó que al quinto día, la variedad Ónavas sonificado a 108 W

superó considerablemente a Patronato en relación a la actividad de peptidasas, alcanzando una actividad de 92.18 U/g. La actividad al día 5 se incrementó en 170% para Patronato y 27% para Ónavas. En general, Ónavas presentó mayor actividad de peptidasas.

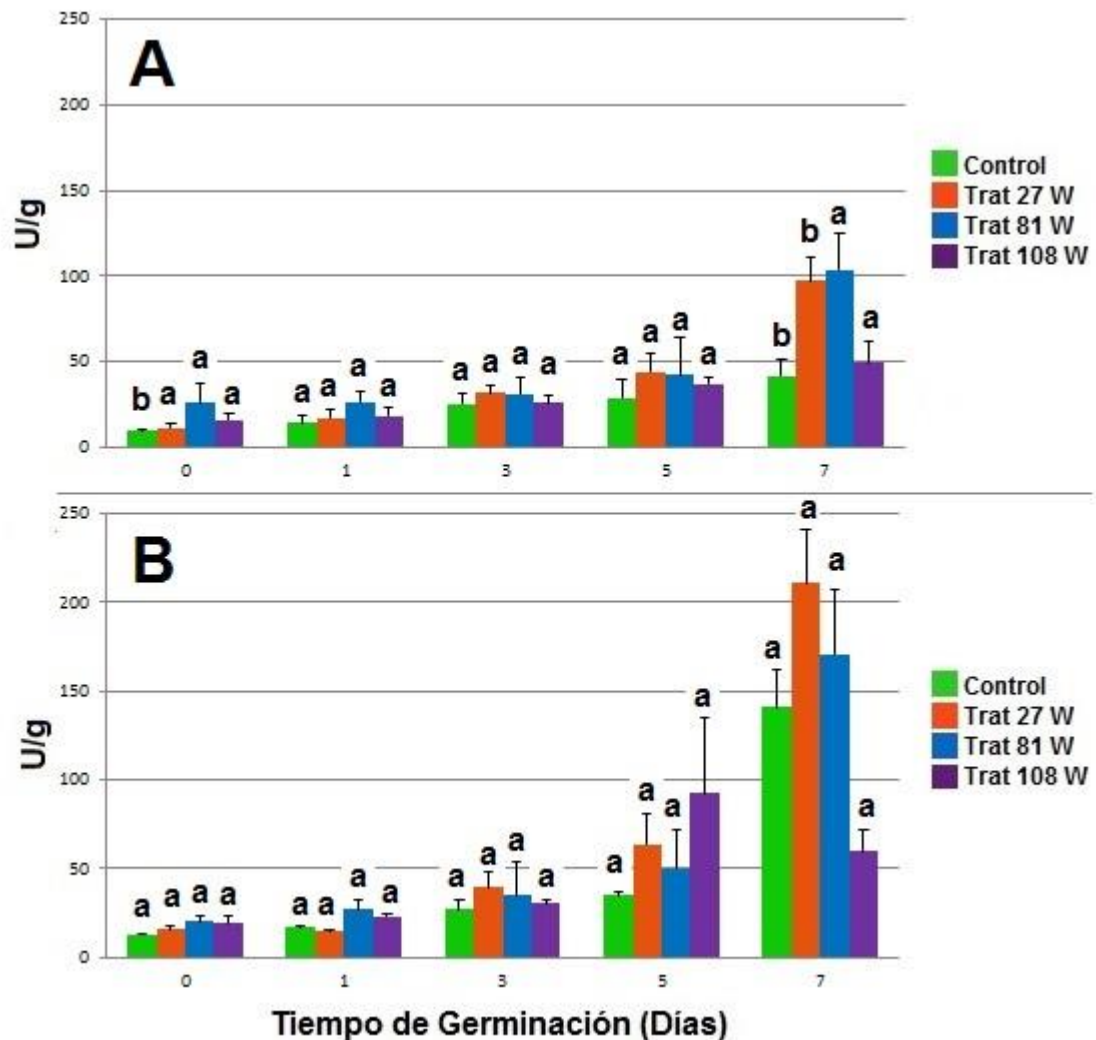


Figura 6. Actividad de Peptidasas de las variedades Patronato (A) y Ónavas (B) sometidas a sonicación y germinación. Valores con letra distinta entre variedades y tiempo de germinación son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Un estudio realizado por Schwalb *et al.* (2012) en distintos granos germinados para medir la actividad específica de peptidasas en gluten a distintas condiciones, resultó que la actividad se vio afectada significativamente por las

variedades de los cereales utilizados, el cultivo, la temperatura de germinación y pH, ayudando en la hidrólisis del gluten, pudiendo utilizar estos resultados para la aplicación en la enfermedad celíaca.

Cuando se trata de manipulación enzimática es importante considerar las potencias a utilizar, ya que dependiendo del propósito del estudio pueden llegar a activarse o inactivarse a las enzimas. En un estudio realizado por Yu *et al.* (2014), en donde se aplicó un tratamiento de ultrasonido a 300 W con una frecuencia de 40 kHz a dos tiempos de irradiación de 30 y 60 min, la actividad enzimática de papaína se vio reducida al incrementar el tiempo de exposición de 21.33 a 15.05 U/mg ( $p < 0.05$ ), pero en el caso de pepsina tuvo un ligero incremento de 46.46 a 53.22 U/mg ( $p < 0.05$ ), lo cual puede deberse a los cambios provocados en las estructuras secundarias y terciarias por la aplicación del ultrasonido a esa potencia y el tiempo al que fueron expuestas, en el caso de pepsina tuvo una mayor capacidad de resistencia al ultrasonido, lo cual hizo que pudiera volver a su forma estructural y seguir hidrolizando la solución de caseína.

La actividad de las peptidasas con el paso de los días de germinación influye en la degradación de los componentes principales de los granos de trigo, como son las proteínas, las cuales se encontraran más disponibles y así las enzimas pueden actuar mejor sobre ellas (Jia *et al.*, 2010).

El pretratamiento de ultrasonido puede ser una técnica muy benéfica, puede ser usado como herramienta para la producción de péptidos bioactivos de distintas fuentes, el cambio estructural en los materiales que se aplique puede hacer más susceptibles a las enzimas, siempre y cuando se tome en cuenta el tipo de enzimas que se deseen sintetizar o inactivar.

## IX. CONCLUSIONES

El tiempo de germinación tuvo un efecto muy significativo ( $p < 0.0001$ ) en las variables respuesta de las dos variedades de trigo estudiadas. La variedad y el tratamiento de ultrasonido afectaron significativamente ( $p < 0.05$ ) a las actividades de las enzimas alfa amilasa y peptidasas y la interacción variedad\*tratamiento de ultrasonido solo fue significativa ( $p < 0.05$ ) para la actividad de alfa amilasa medida por el método Ceralpha. La pérdida de sólidos y las actividades de alfa-amilasa y peptidasas incrementaron con el tiempo de germinación. En general, Ónavas mostró mayores actividades de estas enzimas. El tiempo óptimo de germinación en relación a la actividad de alfa-amilasa es de 3 días, aplicando 108 W a Patronato y 27 W a Ónavas, y para la actividad de peptidasas se recomienda que éste sea de 5 días, aplicando 81 W y 108 W a Patronato y Ónavas, respectivamente.

## X. REFERENCIAS

AACC (2001). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Methods 55-10.01, 44-15.0, 08-21.01, 46-13.01, 30-25.01, 22-08.01, 22-02.01 (11 th ed.), AACC International, St. Paul, MN

Abadía García, L., E. Castaño Tostado, L. Ozimek, S. Romero Gómez, C. Ozuna y S. L. Amaya Llano (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 37: 84-90.

Aladjadjiyan, A. (2002). Increasing carrot seeds (*Daucus carota* L.), cv. Nantes, viability through ultrasound treatment. *Bulgarian Journal of Agricultural Science (Bulgaria)*.

Aladjadjiyan, A. (2011). Ultrasonic stimulation of the development of lentils and wheat seedlings. *Rom. J. Biophys* 21(3): 179-187.

Aladjadjiyan, A. (2012). Physical factors for plant growth stimulation improve food quality. *Food Production—Approaches, Challenges and Tasks*: 145-168.

Alizaga, R. y M. Mora (1982). Medición del contenido de humedad en granos básicos con el determinador Motomco 919. *Agronomía Costarricense (Costa Rica)*. Mar-Set 6(1-2): 35-41.

Belderok, B. (2000). Developments in bread-making processes. *Plant Foods for Human Nutrition* 55(1): 1-14.

Brouns, F., Y. Hemery, R. Price y N. M. Anson (2012). Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(6): 553-568.

Caballero, M. V., A. (2011). Estudios de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución

de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional. Informes SAGARPA.

De Ruiz, C. y R. Bressani (1990). Effect of germination on the chemical composition and nutritive value of amaranth grain. *Cereal Chemistry* 67(6): 519-522.

Delcour, J. y R. C. Hosney (2010). *Principles of Cereal Science and Technology*. St. Paul, MN, USA, AACC International. 3rd Illustrated: 270.

Delgado Povedano, M. y M. L. de Castro (2015). A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta* 889: 1-21.

Dolatowski, Z. J., J. Stadnik y D. Stasiak (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum, Technology. Aliment.* 6(3): 89-99.

Dupont, F. y S. Altenbach (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science* 38(2): 133-146.

FAO (2010). *Agricultura mundial: Perspectivas hacia los años 2015/2030*. Informes FAO. 2010.

FAO (2015). *Los suministros mundiales de cereales seguirán siendo elevados*. Nota informativa de la FAO sobre la oferta y la demanda de cereales.

Félix Fuentes, J. L., G. Fuentes Dávila, P. Figueroa López, G. Chávez Villalba, V. Valenzuela Herrera y J. A. Mendoza Lugo (2011). Movas C2009: trigo cristalino con resistencia a roya del tallo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(6): 979-984.

Figueroa López, P., J. L. Félix Fuentes, G. Fuentes Dávila, V. Valenzuela Herrera, G. Chávez Villalba y J. A. Mendoza Lugo (2010). CIRNO C2008, nueva

variedad de trigo cristalino con alto rendimiento potencial para el estado de Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(5): 739-744.

Finkelstein, R. R. (2010). The role of hormones during seed development and germination. *Plant Hormones*: 549-573.

Geßendorfer, B., G. Hartmann, H. Wieser y P. Koehler (2011). Determination of celiac disease-specific peptidase activity of germinated cereals. *European Food Research and Technology* 232(2): 205-209.

Gil, H. Á. (2010). *Tratado de Nutrición, Tomo II Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. España, Editorial Médica Panamericana S.A. Tomo II: 765.

Gorim, L. y F. Asch (2012). Effects of composition and share of seed coatings on the mobilization efficiency of cereal seeds during germination. *Journal of Agronomy and Crop Science* 198(2): 81-91.

Goussous, S., N. Samarah, A. Alqudah y M. Othman (2010). Enhancing seed germination of four crop species using an ultrasonic technique. *Experimental Agriculture* 46(02): 231-242.

Granito, M., A. Torres y M. Guerra (2003). Desarrollo y evaluación de una pasta a base de trigo, maíz, yuca y frijol. *Interciencia* 28(7): 372-379.

Herrero, A. y M. R. de Avila (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina* 50(4): 71-74.

Hoseney, R. C. (1994). *Principles of Cereal Science and Technology*. St. Paul, MN, USA, American Association of Cereal Chemists (AACC). 2: 377.

INTA (2014). *Evolución y perspectiva mundial y nacional de la producción y el comercio de trigo*. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.



Janve, B., W. Yang, A. Kozman, C. Sims, A. Teixeira, M. A. Gunderson y T. M. Rababah (2013). Enhancement of corn nixtamalization by power ultrasound. *Food and Bioprocess Technology* 6(5): 1269-1280.

Jia, J., H. Ma, W. Zhao, Z. Wang, W. Tian, L. Luo y R. He (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry* 119(1): 336-342.

Kulp, K. (2000). *Handbook of Cereal Science and Technology, Revised and Expanded*, CRC Press in Food Technology. 3: 89-99.

Leaes, E. X., D. Lima, L. Miklasevicius, A. P. Ramon, V. Dal Prá, M. M. Bassaco, L. M. Terra y M. A. Mazutti (2013). Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2(1): 21-25.

León, A. E., C. M. Rosell, M. Gómez Pallarés, C. Brites, M. Haros, M. J. Trigo, R. Pedroza Islas, E. E. Pérez Sira, M. A. Gularte y G. Igrejas (2007). De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica.

Li, R., J. Zhao, C. Sun, W. Lu, C. Guo y K. Xiao (2010). Biochemical properties, molecular characterizations, functions, and application perspectives of phytases. *Frontiers of Agriculture in China* 4(2): 195-209.

Martínez, C. V., A. I. D. C. Blanco y C. L. Nomdedeu (2005). *Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico*. Madrid, Ediciones Díaz de Santos.

Matz, S. A. (1991). *Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed*. New York, Van Nostrand Reinhold/AVI. Springer Science & Business Media. 751.

Mawson, R., M. Gamage, N. S. Terefe y K. Knoerzer (2011). Ultrasound in enzyme activation and inactivation. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Springer: 369-404.

Miransari, M. y D. Smith (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99: 110-121.

Peña Bautista, R., P. Perez Herrera, E. Villaseñor Mir, M. Gomez Valdez y M. Lozano (2008). Calidad de la cosecha de trigo en Mexico: Ciclo primavera-verano 2006, CIMMYT.

Peña, R., J. Ortíz-Monasterio y K. Sayre (1998). Estrategias para mejorar (o mantener) la calidad panadera en trigo de alto potencial de rendimiento. *Explorando altos rendimientos de trigo*: 289-306.

Pomeranz, Y. (1988). *Wheat: Chemistry and Technology*. St. Paul, MN, USA, American Association of Cereal Chemists. 243.

Rani, K., U. P. Rao, K. Leelavathi y P. H. Rao (2001). Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. *Journal of Cereal Science* 34(3): 233-242.

Rizzello, C. G., J. A. Curiel, L. Nionelli, O. Vincentini, R. Di Cagno, M. Silano, M. Gobbetti y R. Coda (2014). Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiology* 37: 59-68.

Robles-Ozuna, L. y L. Ochoa-Martínez (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 13(2): 109-122.

Schwalb, T., H. Wieser y P. Koehler (2012). Studies on the gluten-specific peptidase activity of germinated grains from different cereal species and cultivars. *European Food Research and Technology* 235(6): 1161-1170.

Serna-Saldívar, S. (1996). *Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales*. AGT Editor, SA México, DF 1ra Edición: 521.

Serna-Saldívar, S. (2003). *Manufactura y Control de Calidad en Productos Basados en Cereales*. AGT Editor, México DF 2: 450.

Sheraki, F., S.-H. Mustafavi y A. Abbasi (2015). Sonication of seeds increase germination performance of sesame under low temperature stress. *Acta Agriculturae Slovenica* 105(2): 203-212.

Shewale, S. D. y A. B. Pandit (2009). Enzymatic production of glucose from different qualities of grain sorghum and application of ultrasound to enhance the yield. *Carbohydrate Research* 344(1): 52-60.

Shi, B., Z. Yu, W. Zeng, W. Zhang y X. Liao (2013). Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. *Ultrasonics Sonochemistry (Short Communication)*.

Steiner, E., A. Auer, T. Becker y M. Gastl (2012). Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(4): 803-813.

Ulloa, J. A., P. R. Ulloa, J. C. R. Ramírez y B. E. U. Rangel (2013). Ultrasonido: aplicaciones en el campo de los alimentos. *Revista Fuente Nueva Época* Año 4(14).

Uthayakumaran, S. y C. Wrigley (2010). *Wheat: characteristics and quality requirements. Cereal grains assessing and managing quality*. Woodhead publishing limited, New Delhi: 59-111.

Wang, J., Y. Cao, B. Sun, C. Wang y Y. Mo (2011). Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrasonics Sonochemistry* 18(2): 534-540.

Yaldagard, M., S. Mortazavi y F. Tabatabaie (2007). The effectiveness of ultrasound treatment on the germination stimulation of barley seed and its  $\alpha$ -amylase activity. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 34: 154-157.

Yaldagard, M. y S. A. Mortazavi (2008). Effect of Ultrasonic power on the activity of Barley's Alpha-amylase from post-sowing treatate of seeds. *World Applied Sciences Journal* 3 (1): 91-95.

Yaldagard, M., S. A. Mortazavi y F. Tabatabaie (2008). The effect of ultrasound in combination with thermal treatment on the germinated barley's alpha-amylase activity. *Korean Journal of Chemical Engineering* 25(3): 517-523.

Yildirim, A., M. D. Öner y M. Bayram (2011). Fitting Fick's model to analyze water diffusion into chickpeas during soaking with ultrasound treatment. *Journal of Food Engineering* 104(1): 134-142.

Yildirim, A., M. D. Öner y M. Bayram (2013). Effect of soaking and ultrasound treatments on texture of chickpea. *Journal of Food Science and Technology* 50(3): 455-465.

Yu, Z.-L., W.-C. Zeng, W.-H. Zhang, X.-P. Liao y B. Shi (2014). Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. *Ultrasonics Sonochemistry* 21(3): 930-936.

Zhang, H., I. P. Claver, K.-X. Zhu y H. Zhou (2011). The effect of ultrasound on the functional properties of wheat gluten. *Molecules* 16(5): 4231-4240.

Zieliński, H., J. Frias, M. K. Piskula, H. Kozłowska y C. Vidal-Valverde (2006). The effect of germination process on the superoxide dismutase-like activity and thiamine, riboflavin and mineral contents of rapeseeds. *Food Chemistry* 99(3): 516-520.