

ELEMENTOS DE ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO EN PROTEÍNAS DEL GLUTEN DE TRIGO

Qualitative and quantitative element analyses of the wheat gluten protein

Paola Díaz Dellavalle¹; Marco Dalla Rizza^{1*}; Daniel Vázquez² y Marina Castro³

ABSTRACT

The bread making quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) depends on the quality and quantity of the gluten proteins –glutenins and gliadins– which constitute 10 to 14% of the grain protein content. Various quantitative parameters, such as the total content of proteins of the flour, content of polymeric proteins present in the grain and the glutenin/gliadin ratio are related to baking quality. This work presents the characterization of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) by sodium dodecyl sulphate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of 22 Uruguayan cultivars and breeding lines. 14 HMW-GS subunits were observed corresponding to 10 allele combinations. On the other hand, it is proposed a simple method to group and quantify the main storage proteins of bread wheat by SE-HPLC (Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography). The chromatograms obtained showed an excellent separation of the endosperm proteins in three main peaks corresponding to polymeric, monomeric and non gluten proteins, respectively. The integrated areas of the chromatograms as well as the presence of subunits of the cultivars were analyzed. The genotypes analyzed showed quantitative differences in the quantity of glutenin/gliadin solubles in SDS and in the proportion of polymeric and monomeric proteins. The cultivar INIA Gorrión of good baking quality having the alleles *Glu-D1* 5+10 showed a lower percentage of SDS-soluble polymeric proteins and higher insoluble polymeric proteins than the experimental line LE 2265, which has the alleles *Glu-D1* 2+12.

Key words: glutenins, gliadins, SE-HPLC, breadmaking quality

RESUMEN

La calidad del trigo para pan (*Triticum aestivum* L.) depende de la calidad y cantidad de las proteínas del gluten –gluteninas y gliadinas– las cuales constituyen 10 a 14% de las proteínas del grano. Varios parámetros cuantitativos, como el contenido total de proteínas de la harina, el contenido de proteínas poliméricas presentes en el grano y la proporción de gluteninas y gliadinas, están relacionados a la calidad panadera. En este trabajo se presenta la caracterización de las gluteninas de alto peso molecular (G-APM) en geles de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) de 22 cultivares y líneas de mejoramiento de Uruguay. Fueron observadas 14 subunidades de G-APM correspondientes a 10 combinaciones alélicas. Por otra parte, se propone un método sencillo para agrupar y cuantificar las principales proteínas de reserva de trigo mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño de alta resolución (SE-HPLC). Los cromatogramas obtenidos mostraron una excelente separación de las proteínas del endospermo en tres picos principales correspondientes a proteínas poliméricas, monoméricas y no gluten, respectivamente. El área de integración de los cromatogramas así como la presencia de subunidades de los cultivares fueron analizados. Los genotipos estudiados mostraron diferencias cuantitativas en el contenido de gluteninas/gliadinas solubles en SDS, en la proporción de proteínas poliméricas y monoméricas. El cultivar INIA Gorrión, de buena calidad panadera y que presenta el alelo *Glu-D1* 5+10, mostró menor porcentaje de proteínas poliméricas solubles en SDS y mayor porcentaje de proteínas poliméricas insolubles en comparación con la línea experimental LE 2265, que tiene el par *Glu-D1* 2+12.

Palabras clave: gluteninas, gliadinas, SE-HPLC, calidad panadera.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología, Ruta 48 km 10, Canelones, Uruguay. E-mail: mdallarizza@lb.inia.org.uy *Autor para correspondencia.

² INIA La Estanzuela, Laboratorio de Calidad de Granos, Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay.

³ INIA La Estanzuela, Programa de Evaluación de Cultivares, Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay.
Recibido: 15 de julio de 2005. Aprobado: 1 de diciembre de 2005.

INTRODUCCIÓN

La calidad panadera del trigo (*Triticum aestivum* L.) es un carácter altamente complejo, dependiente de factores genéticos y ambientales. Está claramente establecido que los principales componentes que determinan la calidad panadera del trigo son las proteínas formadoras de gluten. Estas proteínas, gluteninas y gliadinas, están relacionadas estructuralmente pero presentan solubilidades diferentes. Las gliadinas son monómeros que interactúan por fuerzas no covalentes, mientras que las gluteninas son polímeros de alto peso molecular estabilizados por puentes disulfuro (Shewry *et al.*, 2003). Se considera que las gliadinas le dan extensibilidad y viscosidad a las masas, mientras que las gluteninas le dan elasticidad y fuerza (Carceller y Aussenac, 1999). Los numerosos parámetros relacionados a la composición proteica que determinan la calidad panadera pueden ser una guía para seleccionar características específicas en los programas de mejoramiento de trigo (Cuniberti *et al.*, 2003).

Las gluteninas pueden separarse en dos grupos en base al tamaño de los polipéptidos que forman sus polímeros: las subunidades de bajo peso molecular (G-BPM) y las de alto peso molecular (G-APM) (Dubcovsky *et al.*, 1998; Gianibelli *et al.*, 2001). De acuerdo a las subunidades presentes, Payne *et al.* (1987) y Pogna *et al.* (1992), propusieron una clasificación para predecir la calidad panadera (*Glu-1* quality score, índice de calidad *Glu-1*). Si bien este sistema ha sido aplicado en muchos países, su validez ha sido discutida y otros factores deben ser considerados en la evaluación (Dubcovsky *et al.*, 1998, Vázquez *et al.*, 2004). Las subunidades de alto peso molecular son identificadas de acuerdo a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), incluyendo el genoma del cual deriva la subunidad y además el número cromosómico. Por ejemplo en *Glu-D1* encontramos los alelos 2+12 y 5+10 del genoma D de trigo (Gianibelli *et al.*, 2001; Shewry *et al.*, 2003). Los mayores determinantes de la fuerza del gluten y de la calidad panadera están localizados en el cromosoma 1D. Efectivamente, los genes correspondientes al locus *Glu-D1* han sido destacados en gran medida como responsables de la calidad de las harinas. Por ejemplo, el alelo 5+10 está asociado con buenas aptitudes panaderas, mientras que, por el contrario, el alelo 2+12 está asociado generalmente a una pobre calidad panade-

ra (Payne *et al.*, 1987; Peña, 2002). Sin embargo, Lásztity (2003) presenta información contradictoria en cuanto a estas características, brindando evidencias de caracteres complejos más allá de las subunidades presentes. Muchos autores han reportado asociaciones entre la presencia de ciertos alelos y características de las masas (Ammar, 1997; Gianibelli *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 1994; Moonen *et al.*, 1982; Tronso *et al.*, 2002; Shewry *et al.*, 2003).

Debido a que la calidad panadera está asociada con la presencia de grandes agregados proteicos, es esencial estimar el rango de tamaño de estos agregados y determinar las proporciones de las proteínas del gluten presentes en la harina o en el grano. La técnica de SDS-PAGE puede ser usada en la separación y caracterización de las subunidades de gluteninas de acuerdo al peso molecular. Sin embargo, como la reducción de los enlaces disulfuro es un prerequisite, los estudios basados en SDS-PAGE no proveen información de cómo los polipéptidos individuales interaccionan para formar grandes polímeros de gluteninas (Autran, 1994).

Técnicas que permitan separar a las proteínas de manera no desnaturizante pueden tener una ventaja decisiva en la investigación de las funciones proteicas. Desde que Bietz introdujo en 1986 técnicas de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en los análisis de proteínas de los cereales, han sido adoptadas por varios grupos y son comúnmente empleadas en la caracterización de las proteínas de los cereales. Además, permiten analizar un gran número de muestras rutinariamente, presentan una alta resolución y reproducibilidad, y es posible su automatización (Bietz, 1986).

La cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC, del inglés, Size Exclusion-HPLC) es una técnica muy empleada actualmente para medir las proporciones relativas de las principales proteínas del endosperma del grano de trigo y de otros cereales (Labuschagne *et al.*, 2004; Larroque *et al.*, 2000). Estas determinaciones son importantes porque la relación entre las proteínas del gluten y la distribución del tamaño de las proteínas poliméricas afecta los atributos de calidad. Los resultados obtenidos con esta técnica han sido ampliamente correlacionados con la calidad panadera (Dachkevitch y Autran, 1989; Gupta *et al.*, 1993; Southan y MacRitchie, 1999; Larroque *et al.*, 2000).

Un método ideal para la determinación de la distribución del tamaño molecular es el que provee una completa extracción de las proteínas poliméricas de la harina en su estado nativo y una medida directa de su tamaño molecular. La determinación de la solubilidad de las proteínas de trigo se usó para obtener una medida relativa de la distribución del peso molecular de las proteínas poliméricas, ya que existe una relación inversa entre extracción y tamaño molecular (Gupta *et al.*, 1993). Una medida cuantitativa del porcentaje de proteínas poliméricas insolubles (en inglés unextractable polymeric protein o UPP) se obtiene corriendo la fracción extraíble y no extraíble en SE-HPLC. El porcentaje de proteínas poliméricas insolubles (% UPP) es usado como una medida de la distribución del peso de las proteínas poliméricas (Gupta *et al.*, 1993; Southan y MacRitchie, 1999).

La presencia de los pares alélicos 5+10 vs. 2+12 exhiben diferencias en la distribución del peso molecular, aunque la cantidad de gluteninas sea prácticamente la misma. A su vez, líneas con el par 5+10 contienen una alta proporción de polímeros no extraíbles en comparación con el par 2+12. Esto indica que las subunidades individuales de G-APM no son igualmente propensas a polimerizar (Juhász *et al.*, 2000). Las diferencias intrínsecas en las subunidades, y el diferente comportamiento durante la polimerización, serían responsables de sus efectos en la distribución del peso. A pesar de que las subunidades de G-APM son similares en su estructura, la subunidad 5 tiene un residuo de cisteína adicional, lo que puede estar relacionado con su mayor peso molecular (Southan y MacRitchie, 1999).

En este trabajo se presenta la composición alélica de G-APM determinada mediante SDS-PAGE de 22 cultivares uruguayos, y se evalúa la capacidad discriminante del índice *Glu-1*. Paralelamente, se realizó un análisis cuantitativo de los componentes de calidad a través de parámetros estimados por SE-HPLC. En dos muestras de harina pertenecientes a la línea experimental LE 2265 y al cultivar INIA Gorrión se determinó el porcentaje de proteínas poliméricas insolubles (% UPP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Electroforesis de proteínas

Para la extracción de gluteninas se realizó el protocolo de la UPOV (1996) con modificaciones, partiendo de 50 mg de harina de los genotipos estudiados.

Para la caracterización de las subunidades de G-APM se realizaron geles desnaturalizantes SDS-PAGE, según el protocolo descrito por Laemmli (1970) con modificaciones. El sobrenadante obtenido en la etapa de extracción se diluyó (relación 1:4) en buffer de muestra (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,0002% y β -mercaptoetanol 5%). Antes de cargar el gel (25 μ L de muestra por carril) las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min.

Para las corridas electroforéticas se utilizó el sistema de electroforesis vertical (Bio-Rad Protean II, Hercules, California, USA). Se usó un gel concentrador 5% de acrilamida y un gel de separación 10% de acrilamida. Ambos geles se polimerizaron en presencia de 0,1% de N, N, N', N' tetrametiletildiamina (TEMED) y 0,5% de una solución fresca de persulfato de amonio (APS al 10%). Las corridas se realizaron a 5 mA cm⁻² a temperatura ambiente hasta la salida del frente de avance de los colorantes. El tampón de migración usado contenía 25 mM Tris base, glicina 192 mM y SDS 0,1%.

Para la tinción de los geles (UPOV, 1996) se usó una solución compuesta por Azul Brillante de Coomassie R-250 (CBB-R) y Azul Brillante de Coomassie G-250 (CBB-G) en relación 3:1, durante 24 h. Los geles se destiñeron mediante agitación con agua nanopure. La determinación de los patrones electroforéticos de las variedades en estudio se realizó por comparación con variedades de patrones conocidos, siguiendo la nomenclatura reportada por Payne *et al.* (1987).

Los índices de calidad *Glu-1*/SDSS y *Glu-1*/W, se calcularon de acuerdo a Payne *et al.* (1987) y Peña (2002).

Análisis SE-HPLC

1) Determinación de las proteínas totales

Para la extracción de las proteínas totales del endosperma se utilizó el protocolo descrito por Larroque *et al.* (2000) con modificaciones reportadas en Dalla Rizza *et al.* (2005).

Las proteínas de la harina (100 mg) se extrajeron en 10 mL de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,9 SDS 0,5%; las muestras se sonicaron durante 15 s (potencia usada: 20 W) con un disruptor (Ohtake Works, Tokyo, Japón), empleando una sonda de 9 mm. El sobrenadante obtenido por centrifugación de las

muestras a 16.000 x g durante 10 min se filtró con una membrana PVDF (Millipore, Irlanda) e inmediatamente se incubó 2 min a 80°C en un baño de agua. Para los análisis de SE-HPLC se inyectaron 20 µL de los extractos proteicos. Se empleó una columna analítica de exclusión por tamaño (Superdex 200 HR 10/30, 10 x 300 mm, Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia), cuya matriz está formada por dextrano unido covalentemente a un entrecruzamiento poroso de agarosa. Esta columna permite la separación de proteínas con un rango de resolución comprendido entre 10.000 y 600.000 Da (Dalton).

El tampón de corrida fue el mismo empleado para la extracción de las proteínas (Dalla Rizza *et al.*, 2005), realizándose una elución isocrática con una velocidad de flujo de 0,5 mL min⁻¹ a temperatura ambiente, empleando un equipo de HPLC (Äkta Purifier System, Amersham Pharmacia, Biotech, Uppsala, Suecia). El monitoreo de la absorbancia se realizó a 214 nm. Del cromatograma de SE-HPLC se obtuvieron los porcentajes de gluteninas, de gliadinas y proteínas monoméricas no gluten (%Glu, %Gli y %NGP, respectivamente).

2) Determinación del porcentaje de proteínas poliméricas insolubles (% UPP)

Para la determinación de las proteínas poliméricas SDS insolubles Unextractable Polymeric Protein (UPP), se presentan los resultados obtenidos en dos genotipos: LE 2265 (1, 7+8, 2+12) e INIA Gorrión (2*, 7+9, 5+10).

La determinación del % UPP se hizo en base a lo descrito por Larroque *et al.* (2000) y Larroque, O.R. (2003. CSIRO Plant Industry, Australia. Comunicación personal). En las muestras de harina (100 mg) se realizó el mismo tratamiento que para la determinación de las proteínas totales, pero sin sonicación. Se obtiene así un sobrenadante compuesto por proteínas poliméricas solubles sin sonicación (PPS s/sonicación); al pellet se le agregaron 10 mL del buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,9 SDS 0,5%, se agitó durante 10 min con ayuda de vortex, prestando atención a que las muestras sean dispersadas en los primeros 5 s, y luego se sonicó por 30 s. Las muestras se centrifugaron a 16.000 x g durante 10 min, constituyendo el sobrenadante las proteínas poliméricas solubles con sonicación (PPS c/sonicación). Los sobrenadantes se filtraron con una membrana PVDF (Millipore, Irlanda) y se incubaron 2 min a 80°C en un baño de agua. Para

determinar el % UPP se inyectaron 20 µL de ambos extractos proteicos obtenidos.

El % UPP se calculó de la siguiente forma (Gupta *et al.*, 1993; Larroque *et al.*, 2000):

$$\frac{\text{Área del pico 1 de PPS c/sonicación}}{(\text{Área del pico 1 de PPS c/sonicación} + \text{Área del pico 1 de PPS s/sonicación})}$$

Calidad panadera

Las muestras de trigo se molieron en un molino (Quadrumat Junior, Brabender OHG, Duisburg, Alemania). La harina obtenida de las muestras de trigo se analizó para obtener el porcentaje de proteínas (Kjeldahl por método AACC 46-11; AACC, 1993), volumen de sedimentación con SDS (SDSS, Peña *et al.*, 1990) y alveograma (método AACC 54-30A; AACC, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Subunidades presentes de gluteninas de alto peso molecular (G-APM)

Se analizaron mediante SDS-PAGE las subunidades de G-APM de 22 genotipos de trigos uruguayos. El uso de esta técnica permitió separar las diferentes subunidades en base a su tamaño. De acuerdo a los patrones electroforéticos obtenidos y tomando como referencia la nomenclatura de Payne *et al.* (1987), se identificaron 14 bandas diferentes (Cuadro 1), representadas en 10 combinaciones alélicas. En la Figura 1 se muestra la electroforesis de siete de los 22 genotipos estudiados. Para el total de los genotipos se calcularon dos índices, basados en observaciones de la presencia de subunidades de G-APM que están asociadas con la fuerza de la masa de harina. Por un lado el índice *Glu-1*/SDSS, estimado a través de los valores de sedimentación en SDS tiene valores de 1 a 10 (Payne *et al.*, 1987); por otro, el índice *Glu-1*/W basado en el valor de fuerza panadera del alveógrafo (W), y tiene una escala de 1 a 17 (Pogna *et al.*, 1992).

Analizando los valores asignados por el índice *Glu-1*/SDSS en 21 genotipos (Cuadro 2), se encontró un alto porcentaje de los alelos con índice máximo en las G-APM de los *loci* *Glu-A1* (81% poseen 1 y 2*), *Glu-B1* (62% entre 7+8, 13+16 y 17+18) y *Glu-D1* (95% de 5+10). Para los cultivares estudiados, un 43% presentó una composición proteica óptima en referencia a *Glu-1*/SDSS y un 29% en relación a *Glu-1*/W.

Cuadro 1. Subunidades de gluteninas de alto peso molecular y valores de los índices Glu-1/SDSS y Glu-1/W de genotipos de trigo uruguayo.**Table 1. High molecular weight glutenin subunits and Glu-1/SDSS and Glu-1/W score values of Uruguayan wheat genotypes.**

Cultivar/Línea Experimental	Subunidades			Índice	
	Glu-1A	Glu-1B	Glu-1D	Glu-1/SDSS	Glu-1/W
Baguette 10	0	6+8	5+10	6	9
Estanzuela Cardenal	1	7+9	5+10	9	14
Estanzuela Pelón	1	13+16	5+10	10	nc
Greina	2*	7+9	5+10	9	16
INIA Boyero	2*	7+9	5+10	9	16
INIA Caburé	0	7+8	5+10	8	9
INIA Churrinche	2*	7+8	5+10	10	12
INIA Gorrión	2*	7+9	5+10	9	16
INIA Mirlo ¹	1/2*	7+9	5+10	nc	nc
INIA Tijereta	2*	17+18	5+10	10	17
INIA Torcaza	2*	17+18	5+10	10	17
LE 2220	2*	7+9	5+10	9	16
LE 2252	0	7+8	5+10	8	9
LE 2255	2*	7+8	5+10	10	12
LE 2262	2*	17+18	5+10	10	17
LE 2265	1	7+8	2+12	8	6
LE 2270	0	17+18	5+10	8	14
LE 2271	2*	17+18	5+10	10	17
LE 2284	2*	17+18	5+10	10	17
LE 2285	2*	17+18	5+10	10	17
LE 2287	1	7+9	5+10	9	14
LE 2294	2*	7+9	5+10	9	16

¹ A partir del análisis electroforético se observó que INIA Mirlo presenta los alelos 1 y 2*; dado que es una mezcla sólo se consideró para el estudio electroforético.

nc: no considerado

Cuadro 2. Frecuencias alélicas observadas en 21 cultivares y líneas de mejoramiento de trigo.**Table 2. Allelic frequencies observed in 21 wheat cultivars and breeding lines.**

Locus	Alelo	Cantidad	Frecuencia alélica
A1	nulo	4	0,19
	1	4	0,19
	2*	13	0,62
B1	6+8	1	0,05
	7+8	5	0,24
	7+9	7	0,33
	13+16	1	0,05
	17+18	7	0,33
D1	2+12	1	0,05
	5+10	20	0,95

Muchos han sido los esfuerzos por establecer una forma rápida y sencilla de asignar valores relacionados con la calidad panadera (Branlard y Dardevet, 1985, citado por Hinrichsen *et al.*, 2002; Payne *et al.*, 1987). Los resultados presentados confirman que la presencia de los alelos de G-APM brindan primariamente orientaciones muy válidas en aspectos cualitativos.

Integración de análisis mediante el empleo de SE-HPLC

Morel y Bar-L'Helgouac'h (2000) demostraron que existe una fuerte correlación entre el área total del cromatograma y el contenido de proteínas en la harina (% FP); a partir del análisis de los valores del Cuadro 3, se observa una alta correlación entre ambos parámetros ($r = 0,8$; $P < 0,01$). Esto confirma que las técnicas de sonicación y SE-HPLC, son eficientes en la cuantificación de los principales

Cuadro 3. Porcentaje de los principales grupos de proteínas (% Glu, % Gli, % NGP), determinados por Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography (SE-HPLC) de 22 muestras de harina de trigo.**Table 3. Percentage of major protein groups (% Glu, % Gli, % NGP), determined by Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography (SE-HPLC) of 22 wheat flour samples.**

Cultivar/Línea Experimental	% Glu	% Gli	% NGP	Relación PI/PII	AT Crom. (mAU*ml)	% FP
Baguette 10	36,7	48,3	15,0	0,8	171,7	7,3
Estanzuela Cardenal	29,6	55,4	15,0	0,5	269,7	10,7
Estanzuela Pelón 90	29,9	52,8	17,3	0,6	238,5	9,2
Greina	27,3	57,6	15,1	0,5	122,8	8,6
INIA Boyero	29,6	55,2	15,2	0,5	275,9	10,3
INIA Caburé	37,8	46,6	15,6	0,8	227,0	9,0
INIA Churrinche	36,2	52,1	11,7	0,7	185,5	8,7
INIA Gorrión	29,9	58,4	11,7	0,7	218,1	10,0
INIA Mirlo	28,2	57,1	14,7	0,5	269,5	10,0
INIA Tijereta	33,7	53,1	13,2	0,6	261,9	11,0
INIA Torcaza	33,7	51,0	15,3	0,7	205,6	9,2
LE 2220	27,5	55,8	16,7	0,5	282,2	10,8
LE 2252	36,9	48,4	14,6	0,8	274,7	10,6
LE 2255	33,7	51,7	14,6	0,7	252,5	11,5
LE 2262	27,2	57,5	15,2	0,5	291,5	10,7
LE 2265	38,9	49,2	11,9	0,7	226,0	9,8
LE 2270	25,3	59,5	15,2	0,4	238,4	10,4
LE 2271	23,5	61,8	14,7	0,4	282,2	11,5
LE 2284	34,4	56,0	9,7	0,6	214,3	10,3
LE 2285	34,1	51,4	14,4	0,7	273,2	10,4
LE 2287	37,7	48,2	14,1	0,8	260,0	10,2
LE 2294	26,3	55,0	18,6	0,5	228,3	9,7

% Glu: porcentaje de gluteninas; % Gli: porcentaje de gliadinas; % NGP: porcentaje de proteínas no gluten (albúminas/globulinas); Relación PI/PII: relación Área Pico I – Área Pico II; AT Crom.: área total del cromatograma (mAU*mL) (AU: unidades de absorbancia); % FP: porcentaje de proteínas en la harina. Los valores presentados corresponden al promedio de dos mediciones con un coeficiente de variación < 3%.

grupos de proteínas de las harinas de trigo. Sin embargo, la correlación entre el porcentaje de las proteínas no gluten (cantidad relativa de albúminas/globulinas) y el área absoluta de los picos es baja; esto se debe a que la cantidad de albúminas/globulinas por unidad de peso de la harina es bastante estable, de acuerdo a lo observado en 1990 por Singh y colaboradores.

En el Cuadro 4 se muestran valores promedio de las proteínas poliméricas solubles sin sonicar (PPS s/sonicación) y las poliméricas no solubles (PPS c/sonicación) para los genotipos LE 2265 e INIA Gorrión; como puede observarse, el área del pico de las proteínas poliméricas solubles (pico I) es sensiblemente mayor para LE 2265 (Figura 2A). Esto es consistente con lo observado en el Cuadro 3, donde el %Glu de LE 2265 es mayor que el de INIA Gorrión, indicando que la fracción polimérica de LE 2265 es más soluble. Paralelamente, el % UPP,

asociado a calidad panadera, es mayor en INIA Gorrión, revelándose como buen estimador a considerar en aspectos de calidad de la harina y confirmando que el par 5+10 tiene una alta proporción de polímeros no extraíbles en comparación con el par 2+12.

Los valores contrastantes obtenidos del alveógrafo (Cuadro 4), reflejan diferencias funcionales debido a las características cualitativas de las subunidades presentes, y se observa en el valor que adopta el índice *Glu-1/W*. INIA Gorrión presenta mayor fuerza ($W = 399$), teniendo menor porcentaje de proteínas poliméricas solubles sin sonicación (Cuadro 4 y Figura 2C) y mayor % UPP, sin variar mayormente los valores de extensibilidad. Estas observaciones concuerdan con lo publicado por Gupta *et al.* (1993), donde establece que las proteínas poliméricas no extraíbles predicen en forma más fiable la fuerza de la masa que las poliméricas totales.

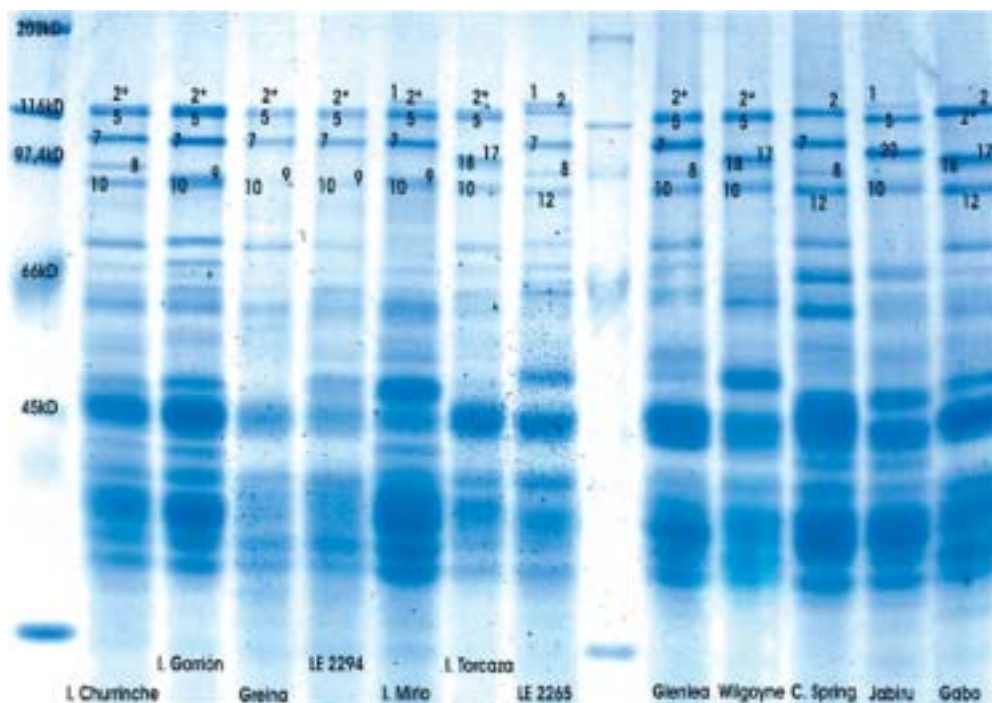


Figura 1. Análisis de alelos de gluteninas de alto peso molecular (G-APM) de siete cultivares de trigo uruguayo del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Electroforesis en gel al 10% de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). A la derecha se incluyen cinco cultivares de referencia, a la izquierda marcador de peso (Broad range, Bio-Rad, California, USA).

Figure 1. Allele analyse of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) of seven Uruguayan wheat cultivars from the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Electrophoresis in at gel 10% polyacrylamide with SDS (SDS-PAGE). On the right are included five wheat reference cultivars are included, on the left molecular weight marker (Broad range, Bio-Rad, California, USA).

En forma general y a través de este enfoque cuantitativo, puede observarse que surgen diferentes parámetros que varían de acuerdo a las propiedades de la harina como ser: % Glu, % Gli, relación PI/PII, %

UPP. Estos parámetros se presentan como elementos adicionales que ayudan a explicar caracteres complejos como la calidad de la harina, además de los citados parámetros cualitativos.

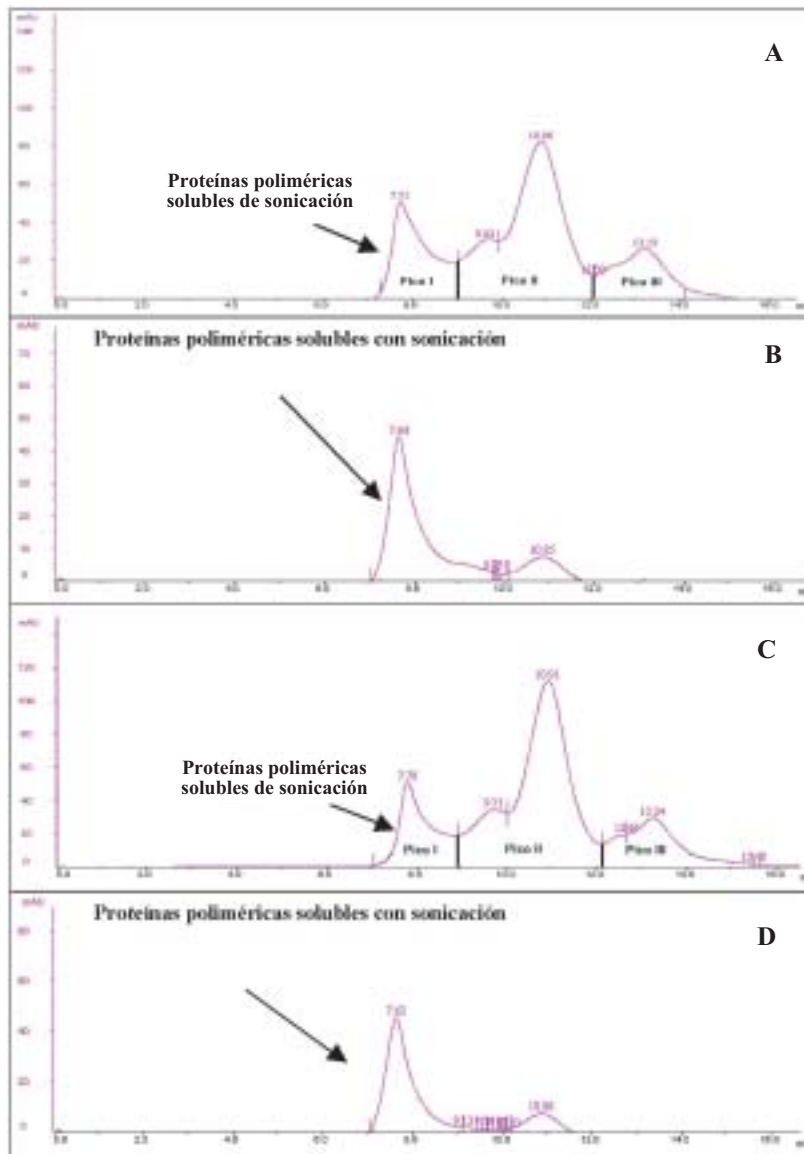
Cuadro 4. Valores reológicos y de proteínas poliméricas solubles sin sonicación (PPS s/sonicación) y poliméricas solubles con sonicación (PPS c/sonicación) analizados mediante cromatografía líquida de alta performance de exclusión por tamaño (SE-HPLC) observados en dos genotipos de trigo.

Table 4. Rheological values and measures of soluble polymeric proteins without sonication (PPS s/sonication) and soluble polymeric proteins with sonication (PPS c/sonication) analyzed through Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography (SE-HPLC) observed in two wheat genotypes.

Cultivar	Índice Glu-1/W	W	L	PPS s/sonicación	PPS c/sonicación	% UPP
LE 2265	6	84	108	45,80	33,71	42,4
INIA Gorrión	16	392	98	25,90	33,11	56,1

Parámetros del alveógrafo: W (fuerza), L (extensibilidad); PPS s/sonicación: área del pico de proteínas poliméricas solubles sin sonicación; PPS c/sonicación: área del pico de proteínas poliméricas solubles con sonicación; % UPP: porcentaje de proteínas poliméricas insolubles (Unextractable Polymeric Proteins).

Los valores presentados corresponden al promedio de dos mediciones con un coeficiente de variación < 3%.



Pico I: proteínas poliméricas, Pico II: gliadinas, Pico III: proteínas no gluten (albúminas y globulinas).

Figura 2. Perfiles cromatográficos de exclusión por tamaño de dos genotipos uruguayos con diferente combinación alélica. A y B: perfiles de la Línea Experimental LE 2265 (1, 7+8, 2+12). C y D: perfiles del cultivar INIA Gorrión (2*, 7+9, 5+10).

Figure 2. Chromatographic exclusion profiles by size of two Uruguayan genotypes with different allelic combinations. A and B: profiles of experimental line LE 2265 (1, 7+8, 2+12). C and D: profiles of INIA Gorrión (2*, 7+9, 5+10).

CONCLUSIONES

Los esfuerzos que realizan los programas de mejoramiento de trigo por reunir características agronómicas deseables en los cultivares (rendimiento, calidad, sanidad, adaptación a diferentes situaciones edáficas, etc.), pueden ser verificados por diversos análisis cualitativos y cuantitativos. El análisis de

las gluteninas de alto peso molecular mostró ser una herramienta que permite agrupar rápidamente las variedades por su composición proteica, y que explica aspectos cualitativos en forma primaria. Existen otros factores adicionales que contribuyen en la determinación de la calidad y que ameritan un enfoque más integral.

Aspectos de análisis cuantitativos medidos a través del uso de la cromatografía de exclusión por tamaño de alta performance (SE-HPLC) brindan información adicional con respecto a la distribución molecular de las fracciones proteicas en componentes de calidad. En este sentido, permite descomponer el análisis de las proteínas del gluten en poliméricas y monoméricas, además de poder realizar una estimación directa de las características de las primeras a través del % UPP.

RECONOCIMIENTOS

Los autores desean agradecer la colaboración para el presente trabajo de M. Alonso, J. Dighiero, M.B. Bonilla y C. Leoni. Deseamos también agradecer al Coordinador de la Unidad de Biotecnología, F. Capdevielle. En forma especial, se agradecen los apreciados comentarios y sugerencias recibidas de los revisores y editores de Agricultura Técnica. Este trabajo fue financiado por INIA-BID II y el Programa de Desarrollo Tecnológico del Ministerio de Educación y Cultura, Proy. N°. S/C/OP/07/24-Dinacyt, Uruguay.

LITERATURA CITADA

- AACC. 1993. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (AACC). Methods 46-11 and 54-30A. AACC, St. Paul, Minnesota, USA.
- Ammar, K. 1997. Gluten protein polymeric composition and allelic variation as related to bread-making quality in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). 172 p. Ph.D. Thesis. Oregon State University, Corvallis, USA.
- Autran, J.C. 1994. Size-exclusion high-performance liquid chromatography for rapid examination of size differences of cereal proteins. p. 326-391. In J.E. Kruger, J.A. Bietz (eds.). High-performance liquid chromatography of cereal and legume proteins. American Association of Cereal Chemists (AACC), Minnesota, USA.
- Bietz, J.A. 1986. High-performance liquid chromatography of cereal proteins. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 8:105-170.
- Carceller, J.L., and T. Aussenac. 1999. Accumulation and changes in molecular size distribution of polymeric proteins in developing grains of hexaploid wheats: role of the desiccation phase. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:301-310.
- Cuniberti, M.B., M.R. Roth, and F. Macritchie. 2003. Protein composition-functionality relationships for a set of Argentinean wheats. *Cereal Chem.* 80:132-134.
- Dachkevitch, T., and J.C. Autran. 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* 66:448-456.
- Dalla Rizza, M., P. Díaz Dellavalle, D. Vázquez, and M. Castro. 2005. Improved resolution of non silica-based size-exclusion HPLC column for wheat flour protein analyses. *Cereal Chem.* 82:287-289.
- Dubcovsky, J., L. Bullrich, M. Echaide, A.R. Schlatter, M. Manifesto, M. Tranquilli, et al. 1998. Determinantes genéticos de la calidad panadera de los trigos argentinos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)* 29:1-30.
- Gianibelli, M.C., O.R. Larroque, F. Macritchie, and C.W. Wrigley. 2001. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat endosperm proteins. AACC, Inc. Available at <http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/freearticle/gianibelli.pdf> Accessed 03/04/03.
- Gupta, R.B., K. Khan, and F. Mac Ritchie. 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *J. Cereal Sci.* 18:23-41.
- Gupta, R.B., J.G. Paul, G.B. Cornish, G.A. Palmer, F. Bekes, and A.J. Rathjen. 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin *loci*, Glu-1, Glu-3 and Gli-1 of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *J. Cereal Sci.* 19:9-17.
- Hinrichsen, P.R., M.H. Castro, y M. Mellado. 2002. Mejoramiento de trigos harineros (*Triticum aestivum* L.) en la zona centro sur de Chile. IV. Caracterización de cultivares de trigo basado en perfiles electroforéticos de gluteninas y gliadinas. *Agric. Téc. (Chile)* 62:56-67.
- Juhász, A., F. Békés, Gy. Vida, L. Láng, L. Tamás, and Z. Bedő. 2000. Quantitative analyses of the storage proteins of an old Hungarian wheat population using the SE-HPLC method. p. 34-37. In P.R. Shewry and A.S. Tatham (eds.). *Proceedings of the Gluten 2000—Structure and Function: Symposium Wheat Gluten*. Bristol, United Kingdom.

- Labuschagne, M.T., E. Koen, and T. Dessalegn. 2004. Use of size-exclusion high-performance liquid chromatography for wheat quality prediction in Ethiopia. *Cereal Chem.* 81:533-537.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larroque, O.R., M.C. Gianibelli, M. Gomez Sanchez, and F. Macritchie. 2000. Procedure for obtaining stable protein extracts of cereal flour and whole meal for size-exclusion HPLC analysis. *Cereal Chem.* 77:448-450.
- Lásztity, R. 2003. Prediction of wheat quality-success and doubts. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 46:39-49.
- Moonen, J.H.E., A. Scheepstra, and A. Graveland. 1982. Use of SDS-sedimentation test and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for screening breeder's samples of wheat for breadmaking quality. *Euphytica* 31:667-690.
- Morel, M.H., and C. Bar-L'helgouac'h. 2000. Reliable estimates of gliadin, total and unextractable glutenin polymers and total protein content, from single SE-HPLC analysis of total wheat flour protein extract. *In* P.R. Shewry and A.S. Tatham (eds). *Proceedings of the Gluten 2000—Structure and Function: Symposium Wheat Gluten*. Bristol, United Kingdom. p. 140-143.
- Payne, P.I., M.A. Nightingale, A.F. Krattiger, and L.M. Holt. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40:51-65.
- Peña, R.J. 2002. Wheat for bread and other foods. *In* B.C. Curtis, S. Rajaram and H. Gómez Macpherson (eds.). *Bread wheat, improvement and production*. p. 468-482. *Plant production and protection series N° 30*. FAO, Rome, Italy.
- Peña, R.J., A. Amaya, S. Rajaram, and A. Mujeeb-Kazi. 1990. Variation in quality characteristics associated with some spring 1B/1R translocation wheats. *J. Cereal Sci.* 12:105-112.
- Pogna, N.E., R. Radaelli, T. Dackevitch, A. Curioni, and A. Dal Belin Peruffo. 1992. Benefits from genetics and molecular biology to improve the end use properties of cereals. p. 83-93. *In* P. Feillet (ed.). *Cereal chemistry and technology: a long past and a bright future*. INRA, Montpellier, France.
- Shewry, P.R., N.G. Halford, A.S. Tatham, Y. Popineau, D. Lafiandra, and P.S. Belton. 2003. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Adv. Food Nutr. Res.* 45:219-302.
- Singh, N.K., G.R. Donovan, I.L. Batey, and F. Macritchie. 1990. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chem.* 67:150-161.
- Southan, M., and F. Macritchie. 1999. Molecular weight distribution of wheat proteins. *Cereal Chem.* 76:827-836.
- Tronsmo, K.M., E.M. Faergestad, A. Longva, J.D. Schofield, and E.M. Magnus. 2002. A study of how size distribution of gluten proteins, surface properties of gluten and dough mixing properties relate to baking properties of wheat flours. *J. Cereal Sci.* 35:201-214.
- UPOV. 1996. Corrigendum a las directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad, Trigo (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol.). TG/3/11 Corr. Anexo, p. 5-10. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), Ginebra, Suiza.
- Vázquez, D., M. Castro, M. Dalla Rizza, y P. Díaz Della valle. 2004. Requerimientos fisicoquímicos de las proteínas de trigo formadoras de gluten para la obtención de productos de calidad en la industria panadera uruguaya. *Primera Jornada de Comunicación Científica de Proyectos Beneficiarios del Subprograma II del PDT*, Montevideo. 2 de Diciembre. Dinacyt-MEC, Uruguay.
- Zarco-Hernández, J., A. Michelena, y C. Royo. 1999. Calidad del trigo duro en España. Disponible en <http://www.eumedia.es/articulos/vr/cereales/92trigoduro.htm>. Leído el 13/07/05.