

EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos  
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos**

**Caracterización de la Cinética de Hidrólisis de Proteínas de Gluten de Trigo  
por la Enzima Tripsina de Visceras de Sierra (*Scomberomorus sierra*)**

**TESIS**

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

***Francisco Cabrera Chávez***

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xii
OBJETIVOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Generalidades del Trigo.....	5
Producción de Trigo.....	6
Usos de Trigo.....	8
Tipos de Trigo y sus Diferencias.....	9
El Gluten de Trigo.....	9
Grupos de Trigo.....	12
Trigo Cristalino.....	12
Modificación del Gluten de Trigo.....	14
Modificación Tecnológica Mediante Uso de Enzimas.....	14
Proteasas.....	16
Fuentes de Enzimas Proteolíticas.....	17
Cinética Enzimática.....	19
Parámetros a Medir en una Reacción Enzimática.....	20

Factores que Afectan la Velocidad de Reacción Enzimática	26
Grado de Hidrólisis.....	26
Propiedades Fisicoquímicas de las Proteínas de Trigo.....	29
Punto Isoeléctrico.....	29
Modificación de las Propiedades Reológicas como Indicadores de la Proteólisis.....	31
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
Obtención de Gluten.....	33
Obtención de las Fracciones Proteicas del Trigo.....	33
Obtención de la Tripsina.....	34
Fraccionación con Sulfato de Amonio.....	34
Cromatografía de Afinidad.....	35
Actividad de Tripsina.....	35
Determinación de Proteína.....	36
Determinación del Grado de Hidrólisis.....	36
Determinación de los Parámetros Cinéticos de la Reacción.....	38
Determinación del Punto Isoeléctrico en el Gluten de Trigo.....	38
Evaluaciones de Propiedades Reológicas en las Masas Bajo la Acción de la Enzima.....	38
Índice de Gluten (IG).....	39
Ensayos en el Farinógrafo.....	39
Ensayos en el Alveógrafo.....	40
Diseño Experimental y Tratamiento Estadístico.....	40
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>

Semipurificación de la Tripsina.....	42
Cromatografía de Afinidad.....	42
Parámetros Cinéticos.....	44
Grado de Hidrólisis de las Proteínas de Trigo.....	50
Efecto de la Hidrólisis de las Proteínas de Trigo en el Punto Isoeléctrico .....	52
Efecto de la Hidrólisis en las Características Reológicas de Masas... Índice de Gluten.....	56
Ensayos con el Farinógrafo.....	58
Ensayos con el Alveógrafo.....	61
Conclusiones.....	64
Recomendaciones .....	66
Referencias.....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Corte transversal de un grano de trigo.....	7
Figura 2. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten.....	23
Figura 3. Representación doble recíproca ( $1/v_0$ frente a $1/[S]_0$ ) de Lineweaver-Burk.....	25
Figura 4. Variación de la actividad enzimática de la enzima tripsina de vísceras de lisa ( <i>Mugil cephalus</i> ) con respecto a : a) pH; b) temperatura.....	27
Figura 5. Gráfica de Michaelis-Menten para determinar las características cinéticas de la hidrólisis de: a) gluten de trigo variedad Júpare; b) gluten de trigo variedad Rayón, y linealización de Lineweaver- Burk.....	45
Figura 6. Gráfica de Michaelis-Menten para determinar las características cinéticas de la hidrólisis de: a) gliadinas de trigo variedad Júpare; b) gliadinas de trigo variedad Rayón, y linealización de Lineweaver- Burk.....	46
Figura 7. Gráfica de Michaelis-Menten para determinar las características cinéticas de la hidrólisis de: a) gluteninas de trigo variedad Júpare; b) gluteninas de trigo variedad Rayón, y linealización de Lineweaver- Burk.....	47
Figura 8. Variación del punto isoeléctrico en las partículas de a)	

gluten de trigo variedad Júpare; b) gluten de trigo variedad Rayón, al ser hidrolizados.....	53
Figura 9. Variación del índice de gluten con respecto al tiempo de reposo de la masa de: a) harina de trigo Rayón; b) harina de trigo Júpare, con distintas dosis de enzima.....	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Tipos de proteínas que se encuentran en el grano de trigo clasificadas en base a su solubilidad en diversos solventes.	11
Tabla 2. Clasificación de los trigos mexicanos con base en la funcionalidad del gluten .....	13
Tabla 3. Esquema de la purificación de tripsina a partir del intestino de Sierra ( <i>Scomberomorus sierra</i> ).....	43
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la hidrólisis de las distintas fracciones proteicas de las dos variedades de trigo y comparación con el sustrato BAPNA.....	48
Tabla 5. Grado de hidrólisis alcanzado por las distintas fracciones proteicas de las dos variedades de trigo como sustrato de la tripsina del tracto digestivo de <i>Scomberomorus sierra</i> .....	51
Tabla 6. Variación del punto isoeléctrico del gluten obtenido a partir de la intersección de las curvas de las figura 8 a) y b) en el potencial electrocinético cero.....	54
Tabla 7. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de los farinogramas en la harina de trigo variedad Júpare.....	59
Tabla 8. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de los farinogramas en la harina de trigo variedad	



Rayón.....	60
Tabla 9. Efecto de la concentración de enzima sobre las características de los alveogramas de las harinas de trigo Júpate y Rayón .....	62

## OBJETIVOS

### General

Caracterizar la cinética de la reacción de hidrólisis de proteínas de gluten de trigo catalizadas por la enzima tripsina de visceras de sierra y determinar el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de los sustratos.

### Particulares

Obtener los parámetros cinéticos de la reacción enzimática de la tripsina en presencia de las fracciones proteicas del gluten.

Obtener el grado de hidrólisis de las proteínas del gluten usando como sistema enzimático a la tripsina purificada de vísceras de sierra.

Determinar el efecto de la hidrólisis enzimática de la tripsina de sierra en el punto isoeléctrico de la dispersión de gluten y las propiedades reológicas de la harina.

## RESUMEN

Con el fin de evaluar el grado de modificación de las proteínas del gluten por la enzima tripsina del tracto digestivo de la sierra (*Scomberomorus sierra*), se planteó obtener primero, los parámetros  $K_m$  y  $V_{max}$  de la hidrólisis del gluten y de las fracciones gliadina y glutenina de harina de trigo panadero (HTP) y de trigo cristalino (HTD), y posteriormente explorar en sus posibilidades de aplicación midiendo los cambios en las características reológicas. La separación del gluten, la gliadina y la glutenina se hizo mediante la técnica 38-10 de la AACC, por solubilidad en etanol al 70% y en ácido acético diluido, respectivamente. Se utilizó cromatografía de afinidad para la purificación de la enzima, y su actividad se midió utilizando el sustrato sintético BAPNA. Los parámetros cinéticos se estimaron a partir del grado de hidrólisis de la enzima a distintas concentraciones de sustrato, mediante la reacción de o-oftaldialdehído (OPA). Se determinó el índice de gluten (IG), los parámetros farinográficos y alveográficos para los dos tipos de harina a diferentes tiempos de reposo con dos cantidades de enzima aplicada y un control. La  $V_{max}$  fue mayor en la glutenina de HTD y en el gluten de HTP, sin diferencias significativas. El parámetro  $K_m$  fue mayor en las proteínas del trigo cristalino, sin embargo, para cada variedad, el máximo valor fue para la gliadina, indicando la afinidad que tiene la enzima sobre este sustrato. El IG de HTD puede modificarse hasta lograr que este indicador se asemeje al del trigo panadero. Tanto la HTP como HTD mostraron cambios en los índices reológicos los cuales son controlables mediante el periodo de tiempo en los que se deja que la reacción de hidrólisis de las proteínas ocurra.

# INTRODUCCIÓN

El trigo duro (*Triticum durum*) generalmente es usado para la alimentación humana en forma de pasta. Otra aplicación que se le ha dado es en menor medida en la elaboración de otros productos como cereales matinales, inflados y en otros (Pomeranz, 1988).

A pesar de que a nivel mundial la producción de trigo duro es baja, en el estado de Sonora el 76% de la producción de trigos estimada para el ciclo otoño-invierno 2004/2005 ha correspondido a trigos cristalinos (SAGARPA, 2005), la mayor parte de este trigo se destina a la producción de pastas secas para consumo humano y el excedente se exporta o se usa como alimento para ganado (INEGI, 1998).

Se ha reportado que existe una baja producción de trigo panadero, por lo que se hace necesario buscar alternativas, entre ellas puede estar la modificación tecnológica de los trigos duros, con el fin de que mejoren su calidad panificable. (Olivas, 2001).

Las características reológicas deseables en las harinas de trigo para panificación dependen principalmente de las proteínas del gluten (Hoseney, 1994).

Proponiéndose modificar la calidad panificable de los trigos duros se han reportado estudios que involucran modificación genética, uso de compuestos químicos y el uso de enzimas (Boyacioglu y D'Appolonia, 1994).

En cuanto al uso de enzimas, los tratamientos convencionales para la modificación del gluten de trigo son mediante el uso de enzimas hidrolíticas,

aunque también se ha estudiado el uso de otros tipos de enzimas como las transglutaminasas o las enzimas oxidativas (Virtanen, 2000).

La adición de proteasas para obtener masas mas débiles y flexibles a partir de trigos fuertes es normalmente innecesaria en la elaboración de pan a partir de harinas de trigos panaderos, pero las proteasas pueden ser usadas en harinas de trigos duros (Lindahl y Eliasson, 1992).

Las proteasas fúngicas y bacterianas son ocasionalmente añadidas para actuar en el gluten de harinas de trigo duro alto en proteína. Sin embargo se debe tener cuidado en la suplementación con proteasas. Un exceso de actividad por sobre suplementación resultaría en una degeneración rápida e irreversible de las propiedades del gluten (Van Dam y Hille, 1992).

Se ha encontrado que la adición al gluten de gliadina o proteasas que hidrolizan a subunidades de gliadina es capaz de mejorar la calidad para la elaboración de pan (Weegel y Hamer, 1992). Sin embargo, el mecanismo por el cual las gliadinas y las proteasas mejoran la calidad del gluten para la elaboración de pan no es todavía muy claro. Los resultados sugieren que los únicos factores capaces de debilitar la agregación de las proteínas del gluten son los que afectan a las gliadinas. Basados en que las gliadinas actúan como plastificadores de las gluteninas, la adición de gliadinas es entonces apropiado para reducir la sobreagregación de gluteninas (Weegels y Hamer, 1992).

Se han realizado trabajos en los cuales se hace uso de extractos de vísceras de especies de origen marino que contienen enzimas tipo tripsina , para mejorar las propiedades de panificación de trigos duros (Félix, 2002; Olivas, 2001). Aunque se conocen algunas características de las enzimas tipo tripsina de origen

marino (Burgos-Hernández, *et al.*, 2005; Olivas, 2001; Hjelmeland y Raa, 1982), no se conoce ampliamente el comportamiento de estas tripsinas sobre las fracciones proteicas del gluten de trigo, es decir, la reacción de hidrólisis.

Las enzimas tipo tripsina presentan una preferencia muy alta por sustratos con residuos de arginina y lisina (Copeland, 2000). Se ha reportado que en promedio la proteína de trigo contienen alrededor de 3% del aminoácido lisina del 100% de proteína (Atwell, W. A., 2001). También se sabe que las subunidades de glutenina de alto peso molecular contienen de 6 a 8 moles de lisina por mol de proteína (Thompson, *et al*, 1985; Anderson, *et al*, 1989) y solo 1 mol de lisina por mol de proteína en subunidades de glutenina de bajo peso molecular (Pitts, *et al*, 1988; Colot, *et al*, 1989).

El estudio de la velocidad de reacciones catalizadas con enzimas, así como de los factores que influyen sobre ella, es un tema de gran amplitud y enorme interés, tanto desde el punto de vista fundamental, como bajo un aspecto de aplicación industrial (Blanco, *et al* 1976). En general, el estudio de la velocidad de una reacción o el planteamiento de un modelo cinético, se verifica atendiendo fundamentalmente a conocer la influencia de diferentes variables de operación sobre la dinámica de la reacción, profundizar en el conocimiento o esclarecer el mecanismo de la reacción y determinar una expresión matemática que describa la cinética de la reacción con el objeto de posibilitar el desarrollo de una ecuación de diseño útil en los procesos industriales (Pilling, *et al*, 1999).

Conociendo la cinética de la hidrólisis de las fracciones proteicas del gluten por la enzima tipo tripsina de vísceras de sierra se puede evaluar el grado de modificación de las proteínas. Por esto se ha visto la necesidad de profundizar

sobre el sitio activo de esta enzima, y es posible acercarse a éste conocimiento a partir del estudio y caracterización de la actividad de la tripsina en presencia de las fracciones proteicas del gluten de trigo.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Generalidades del Trigo

Trigo es el nombre común de los cereales de un género de la familia de las Gramíneas cultivado como alimento desde tiempos prehistóricos por los pueblos de las regiones templadas; ahora es el cereal más importante de dichas regiones. Todas las especies de trigo pertenecen al género *Triticum*. (Serna-Saldivar, 1996).

El trigo ha sido cultivado como alimento desde hace más de 9,000 años, y ha sufrido muchos cambios. Un antepasado probable de todos los trigos cultivados es el carraón silvestre, de grano pequeño y tallo largo y quebradizo. En el caso del carraón cultivado, que aún se usa como forraje, o los tipos escaña o escanda, de grano más grueso, fueron muy cultivados en las antiguas civilizaciones griega y romana, y son muy parecidos a los trigos modernos. La resistencia y el grano más grueso de las variedades espelta, todavía muy cultivadas en Europa, aumentaron mucho el rendimiento. Nuevas mejoras dieron lugar al trigo duro, utilizado para fabricar pasta alimenticia, y al trigo de panificación, rico en gluten, que da lugar a una masa elástica y ligera (Fabriani, 1988).

De todos los cereales, el trigo está considerado como el de mayor importancia comercial debido a su utilización en la industria para la elaboración de productos tales como pan, pastas alimenticias, etc. La composición y calidad de este grano están determinadas por las condiciones climatológicas prevalecientes, en menor grado, por el tipo de suelo (Rharrabti, *et al.*, 1983).

El trigo es de los principales alimentos en el mundo que provee más nutrientes que cualquier otra fuente de alimentos (Serna-Saldivar, 1996). Es



además el cereal que se produce en forma más extensa en el mundo. La mayor parte de este cereal se destina para consumo humano; siendo su aporte a la ingesta calórica muy significativo (Kent, 1984).

La estructura física del grano está definida por tres partes principales, las cuales son: el endospermo (alrededor del 85% del grano), el pericarpio que forma aproximadamente el 5% del grano y el germen que representa mas o menos el 3% del grano. La figura 1 muestra un corte transversal de un grano de trigo definiendo las tres partes principales (Salvado, endospermo y germen). En promedio el grano de trigo tiene una longitud de 8 mm y un peso de 35 mg aproximadamente; estos datos varían dependiendo de la variedad del cultivo (Hoseney, 1994).

Químicamente el grano está compuesto por carbohidratos, compuestos nitrogenados, lípidos, sustancias minerales, agua y pequeñas cantidades de vitaminas y pigmentos. Estos nutrientes se encuentran en diversas áreas del grano y algunos se concentran en regiones específicas. Los carbohidratos comprenden aproximadamente del 64 al 70% de la materia seca del grano, las proteínas un 14%, los lípidos 2% y 1.8% los minerales (Fabriani y Lintas, 1988).

## **Producción de Trigo**

En relación a la producción de trigo panadero (*Triticum aestivum*), la producción mundial de trigo duro es baja y supone alrededor del 5% del total de trigo panadero (FAO,2004).

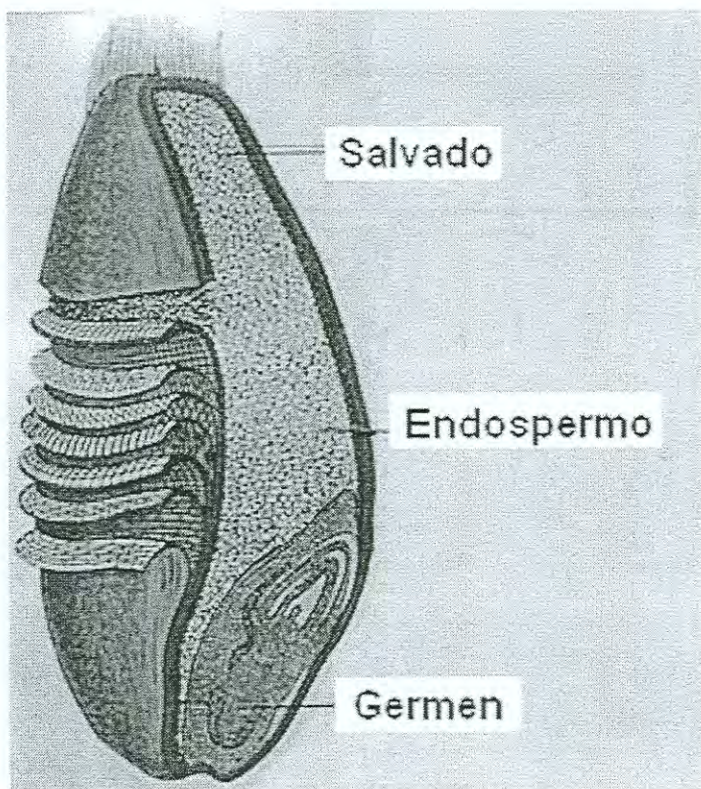


Figura 1. Corte transversal de un grano de trigo.

Fuente modificada de: [www.trigopan.com](http://www.trigopan.com), 2005

México cuenta con dos regiones principales de producción, la región noroeste, Sonora y Sinaloa, en donde se siembran preferentemente los trigos panaderos y cristalinos, y la región del Bajío y el estado de Chihuahua (Serna, 1996).

La producción nacional de trigo se obtiene en dos ciclos agrícolas al año, el ciclo otoño-invierno y el primavera-verano. En el estado de Sonora se siembra trigo solo en el ciclo otoño-invierno y el trigo que se siembra en mayor proporción es el cristalino o duro (SAGARPA, 2005). El estado de Sonora, a pesar de la situación de escasez de agua que ha imperado en los últimos años en la región, ha sido el primer productor de trigo del país (SAGARPA, 2005).

A pesar de que a nivel mundial la producción de trigo duro es baja, en el estado de Sonora el 75% de poco más de 577,000 toneladas de la producción de trigos en el año 2004 correspondió a trigos cristalinos (SAGARPA, 2005), la mayor parte de este trigo se destina a la producción de pastas secas para consumo humano y el excedente se exporta o se usa como alimento para ganado (INEGI, 1998).

## **Usos del Trigo**

Casi todo el trigo se destina a la fabricación de harinas para panificadoras y pastelería. En general, las harinas procedentes de variedades de grano duro se destinan a la fabricación de pastas alimenticias, y las procedentes de trigos blandos a la elaboración de masas pasteleras (Fabriani y Lintas, 1988). El trigo se usa también para fabricar cereales de desayuno y, en menor medida, en la elaboración de cerveza, whisky y alcohol industrial. Los trigos de menor calidad y

los subproductos de la molienda y de la elaboración de cervezas y destilados se aprovechan como piensos para el ganado. Se destinan pequeñas cantidades a fabricar sucedáneos del café, sobre todo en Europa; el almidón de trigo se emplea como apresto de tejidos (Fabriani et al, 1988).

### **Tipos de Trigo y sus Diferencias**

Las especies de trigo se clasifican en función del número de cromosomas de las células vegetativas. Se reconocen tres series: diploide, con 14 cromosomas; tetraploide con 28 cromosomas, y hexaploide, con 42 cromosomas. Las especies de trigo se hibridan con bastante frecuencia en el medio natural. La selección de las mejores variedades para su cultivo tuvo lugar en muchas regiones hace siglos. En la actualidad sólo tienen importancia comercial las variedades de trigo común, candeal y duro, aunque todavía se cultivan muchas otras adecuadas a las diversas condiciones locales; además, estas variedades menos extendidas constituyen la reserva esencial de que se nutren los programas de mejora (Liu, et al, 1996).

### **El Gluten del Trigo**

El gluten es un complejo de proteínas, duro y elástico, presente en el trigo. Da a la masa de pan el tacto viscoso o pegajoso que retiene el gas cuando sube por acción de la levadura. La harina se mezcla con agua, y la masa resultante se amasa con más agua. El gluten se forma cuando se combinan con agua las proteínas glutenina y gliadina, presentes en la harina. La gliadina es pegajosa y le da al gluten su cualidad adhesiva. La glutenina le da tenacidad y fuerza. Al

cocerse el pan, el gluten de la masa se expande debido al dióxido de carbono producido por acción de la levadura, dando a la masa una textura esponjosa y elástica. Los panes con gluten tienen mayor contenido en proteínas y menor contenido en almidón que otros panes (Fabriani, 1988).

Todos los trigos contienen cuatro tipos de proteínas: albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas; las dos últimas, conocidas también como proteínas del gluten, de almacenamiento o de reserva, son a las que se les atribuye principalmente las características de calidad en la elaboración de sus diferentes productos (pasta, pan, tortillas, galletas, entre otros). (Serna- Saldivar, 1996).

A principios del siglo XX (1907) fue realizado un estudio sistemático por Thomas Burr Osborne para desarrollar una clasificación para las proteínas de cereales basada en la extracción secuencial y diferencial de solubilidad. Este científico clasificó a las proteínas del trigo en cuatro diferentes grupos, albúminas (solubles en agua y soluciones salinas diluidas), globulinas (insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en 70 – 90% de etanol) y glutelinas (solubles en ácidos diluídos) (Tabla 1) (Atwell, 2001, Bañuelos, 2003). En cuanto a las proteínas del gluten, generalmente se reconocen dos grupos de proteínas; las gliadinas y gluteninas, aunque su composición varía de acuerdo al método utilizado para su separación. Se ha reportado también otra clasificación de estos dos grupos de proteínas de acuerdo a su estado de agregación (Jackson, *et al*, 1983). Las gliadinas son una mezcla compleja de polipéptidos simples, mientras que las gluteninas, consisten de subunidades que son agregadas principalmente por enlaces disulfuro, que si se tratan con un agente reductor, se

Tabla 1. Tipos de proteínas que se encuentran en el grano de trigo clasificadas en base a su solubilidad en diversos solventes.

Grupo de proteínas	Solubilidad	Contenido (% en base a proteína)
Albúminas	Agua	15
Globulinas	Soluciones salinas diluidas	3
Prolaminas (gliadina)	Etanol al 70%	33
Glutelinas (glutenina)	Ácidos diluidos	16
Residuo	NR	33

Fuente modificada de Atwell, 2001.

disocian en varias subunidades que pueden ser de alto o bajo peso molecular (D'Ovidio y Masci, 2004).

Las gliadinas tienen pesos moleculares comprendidos entre 30.000 y 54.000 Da, solubles en solución de etanol al 70%; las gluteninas comprenden polipéptidos de bajo (44.000 kDa) y alto peso molecular (95.000-145.000 kDa), estas últimas subunidades están consideradas entre las mayores macromoléculas de origen natural; cuando están unidas por enlaces disulfuro su tamaño llega alrededor de 3 millones de Da (Hernández, *et al.*, 2004).

## **Grupos de Trigo**

El trigo es el cereal que tiene más sistemas de clasificación por su alta versatilidad y los distintos usos terminales. En México los trigos se clasifican de acuerdo a su funcionalidad en cinco grupos los cuales se presentan en la Tabla 2 (Serna-Saldivar, 1996).

**Trigo Cristalino.** Los granos que pertenecen al denominado grupo V son conocidos como trigo cristalino y agronómicamente muestran mayor resistencia a los cambios climatológicos y registra rendimientos mas elevados por hectárea (Serna– Saldivar, 1996). Estos trigos duros pertenecen a la familia de los tetraploides.

Tradicionalmente el trigo cristalino se ha utilizado para la producción de pastas debido a que presenta características mas favorables que la harina de trigos panaderos, ya que presenta mejor textura, resistencia superficial a la desintegración, características que no se presentan en pastas elaboradas con trigos panaderos. Aunque en algunas áreas del mediterráneo el trigo cristalino ha

**Tabla 2. Clasificación de los trigos mexicanos con base en la funcionalidad del gluten.**

---

Grupo	Denominación	Características
I	Fuerte	Gluten fuerte y elástico apto para la industria mecanizada de panificación. Usados para mejorar la calidad de trigos débiles.
II	Medio-Fuerte	Gluten medio-fuerte apto para la industria artesana de panificación.
III	Suave	Gluten débil o suave pero extensible apto para la industria galletera. Usado para mejorar las propiedades de trigos tenaces.
IV	Tenaz	Gluten corto o poco extensible pero tenaz, apto para la industria pastelera y galletera
V	Cristalino	Gluten corto y tenaz, apto para la industria de pastas y sopas.

---

**Fuente: Serna – Saldivar,1996.**



sido usado en la formulación de varios tipos de pan, el uso de harina de este grano ha sido restringido debido a que generalmente la proteína de su gluten afecta la fuerza elástica de muchos trigos panaderos (Boyacioglu y D'Appolonia, 1994).

En general el trigo duro no es apto para la elaboración de pan. La característica mas destacada del trigo duro es su dureza, la cual se debe a la mayor continuidad de la matriz de proteínas dentro de la célula y los enlaces mas firmes de los gránulos de almidón con ésta matriz (Charle, *et al.*, 1988 referido en Olivas, 2001). La calidad para panificación y elaboración de otros productos a partir de los trigos duros son usualmente correlacionados con el contenido de proteína (Fabriani y Lintas, 1988).

### **Modificación del Gluten de Trigo**

Las características reológicas deseables en las harinas de trigo para panificación dependen principalmente de las proteínas del gluten (Hoseney, 1994). Para lograr modificar la calidad panificable de los trigos duros se han reportado estudios que involucran modificación genética, uso de compuestos químicos y el uso de enzimas (Boyacioglu y D'Appolonia, 1994).

### **Modificación Tecnológica Mediante el Uso de Enzimas**

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir; tienen la capacidad de acelera ciertas reacciones químicas. En los últimos años su uso en muchas industrias ha adquirido gran relevancia. La enzimología o ciencia encargada del estudio de las enzimas siempre será un tema en la biotecnología. En los últimos

años, esta ciencia ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, de detergentes, panadería, entre otras. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día mas numerosos, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores no biológicos (Horcasitas, *et al*, 2002).

Por lo general, las enzimas se usan en la industria alimentaria como auxiliares de procesos. De todos estos procesos, posiblemente el uso mas importante de las enzimas es en la hidrólisis de carbohidratos y proteínas (Fowler, 1996, citado por Olivas, 2001).

Las enzimas se han usado desde hace mucho tiempo, hoy en día tienen aplicación en un gran número de sectores industriales principalmente la industria alimentaria (Gacesa, 1986). Esta utilización se ha promovido gracias a los conocimientos que se han adquirido sobre las ventajas que presentan como catalizadores en comparación con los catalizadores inorgánicos tradicionales, tales como el alto poder catalítico que poseen lo que induce un aumento de hasta  $10^9$  a  $10^{12}$  en la velocidad de la reacción (Gacesa, 1986).

Existen diferentes tipos de enzimas, sin embargo las de mayor aplicación en la industria alimentaria son las hidrolasas, las cuales forman un grupo muy numeroso que comprende cerca de 200 enzimas y poseen en común la capacidad de introducir los elementos del agua ( $H^+$  y  $OH^-$ ), en el sustrato atacado produciendo así una hidrólisis (Leningher, 1995). Dentro de este grupo tenemos a las proteasas, las cuales, se ha visto, pueden tener aplicación para mejorar algunas propiedades en los trigos (Félix, 2002; Olivas, 2001; Galván, 2001).

## Proteasas

Los tratamientos convencionales para la modificación del gluten de trigo son mediante el uso de enzimas hidrolíticas, aunque también se ha estudiado el uso de otros tipos de enzimas como las transglutaminasas o las enzimas oxidativas (Virtanen, 2000).

Las proteasas se han dividido en cuatro grupos en base a su mecanismo de acción. Estos grupos son: serina – proteasas, aspártico – proteasas, sulfhidril – proteasas y metalo – proteasas (Badui, 1999).

Las serina – proteasas se caracterizan por tener un residuo serina muy reactivo en su sitio activo. Todas ellas son endoproteasas y además del residuo serina, también intervienen los residuos histidina y ácido aspártico en el proceso catalítico, formando la llamada triada catalítica característica de esta familia de enzimas (Whitaker, 1994). Del sistema digestivo de animales marinos se han aislado tripsina, quimiotripsina y elastasa. Estas enzimas tienen estructuras similares y comparten esencialmente la misma secuencia de aminoácidos (Miralbés, 2000).

Aunque todas las serina – proteasas presentan el mismo mecanismo de acción catalítica, su especificidad por el sustrato es muy diferente. Quimiotripsina tiene especificidad para hidrolizar el enlace peptídico por el lado carboxilo donde se encuentran los aminoácidos aromáticos. Tripsina muestra su especificidad para romper el enlace peptídico por el lado del grupo carboxilo de los aminoácidos con cadenas laterales voluminosas y con carga positiva como lisina y arginina. Elastasa rompe específicamente el enlace peptídico por el lado carboxilo de aminoácidos pequeños e hidrofóbicos como alanina y valina. Estas diferencias son

debidas a las diferencias estructurales en las cavidades donde se aloja el sustrato junto al sitio activo de la enzima. (Copeland, 2000; Whitaker, 1994).

Las amilasas y las proteasas ayudan a aumentar la extensibilidad de las masas; la proteasa se aplica en caso de que el trigo usado tenga un gluten tenaz y se requiera aumentar su extensibilidad. El uso de proteasas en la panificación es limitado para hacer pan blanco, pues solo contribuyen a relajar la masa durante el mezclado, pero se ha extendido su uso para harinas de trigos muy fuertes y tenaces usados en masas fermentables (Cosbert, 1998).

### **Fuentes de Enzimas Proteolíticas**

Las proteasas digestivas son enzimas encargadas de llevar a cabo la hidrólisis de las proteínas en el tracto digestivo del hombre y animales. Todas se sintetizan en el páncreas, estómago e intestinos. La función de las proteasas es degradar a las proteínas hasta aminoácidos sencillos y de esta forma propiciar su absorción (Badui, 1999). Los animales y las plantas fueron los organismos que primero se usaron como fuentes de enzimas, pero en la actualidad las enzimas también se extraen de microorganismos (Gacesa, 1986).

Las proteasas endógenas de la harina de trigo al parecer no tienen importancia durante el horneado (Ewart, 1977 referido en Lindahl y Eliasson, 1992). Sin embargo, las proteasas provenientes de insectos afectan a las propiedades reológicas (Aja *et al.*, 2004), y las que están presentes como resultado de la contaminación microbiológica, juegan un papel menor en la desagregación de las proteínas que están formando la fracción de la glutenina

durante el mezclado (Van Dam y Hille, 1992). Debido a ésto, cuando es necesario, se añaden proteasas de origen fúngico o bacteriano.

Debido a los problemas que implica el uso de enzimas de origen bacteriano, desde hace ya algunos años se están utilizando como fuentes enzimáticas a los desechos viscerales de origen marino. El estudio de las enzimas extraídas de organismos de origen marino se ha debido a que existe una amplia diversidad biológica y en el medio marino, los organismos se han adaptado a las condiciones de su hábitat, por lo tanto cuentan con propiedades únicas, tales como el presentar para su estabilidad, un amplio rango de temperaturas (Olivas, 2001), siendo en los peces, el tracto digestivo la parte que representa la mas rica fuente de enzimas hidrolíticas (Haard, 2000).

La producción pesquera en el estado de Sonora, pone en evidencia el potencial de fuentes de enzimas contenidas en vísceras de especies de origen marino con el que cuenta la región (Olivas, 2001; Félix, 2002; SAGARPA, 2003). Debido a lo anterior, se han realizado trabajos en los cuales se hace uso de extractos de vísceras de especies de origen marino que contienen enzimas tipo tripsina, en los cuales se reporta que dichos extractos logran un grado de modificación en las distintas propiedades tanto reológicas como químicas (Félix, 2002; Olivas, 2001). En estos estudios se ha abordado el tema del grado de hidrólisis que se logra en esta reacción enzimática, sin embargo no se ha establecido la manera en que estas actúan sobre las proteínas del trigo, por lo que hacen falta estudios para esclarecer este comportamiento.

## Cinética Enzimática

En general, el estudio de la velocidad de una reacción o el planteamiento de un modelo cinético, se verifica atendiendo fundamentalmente a conocer la influencia de diferentes variables de operación sobre la dinámica de la reacción, profundizar en el conocimiento o esclarecer el mecanismo de la reacción y determinar una expresión matemática que describa la cinética de dicha reacción, con el objeto de posibilitar el desarrollo de una ecuación de diseño útil en los procesos industriales (Pilling y Seakings, 1999).

La mayor parte de las investigaciones llevadas a cabo para el estudio de la hidrólisis enzimática de proteínas se limitan a encontrar las condiciones óptimas de operación en las que realizar el proceso con vistas a la producción industrial de hidrolizados, y solo unos cuantos abordan el estudio cinético de la reacción, en base a obtener la ecuación de velocidad en función de las variables del proceso que permita el diseño del equipo, así como un mayor conocimiento y control de la etapa hidrolítica. Esto se debe fundamentalmente a dos razones: la complejidad de la reacción (rotura simultánea de enlaces de distinta reactividad, productos que son a su vez sustrato para el proceso, inhibición e inactivación de la enzima) y su importancia económica, que determina un mayor interés por el desarrollo y patentado de procesos comerciales (Guadix, et al, 2000).

Los estudios de la cinética de las reacciones representan solo una de un rango de herramientas útiles en las investigaciones bioquímicas acerca de la estructura y función de las enzimas, así se han descubierto una amplia gama de modelos de mecanismos de reacción (Fersht, 1977 citado por Gacesa, 1986). Cuando se considera la conveniencia del uso de una enzima como catalizador,

existen tres principales criterios que deben ser determinados: la velocidad de reacción (actividad catalítica), la constante de equilibrio (el orden de la reacción) y la duración de la actividad óptima de la enzima (estabilidad) (Gacesa, 1986).

### **Parámetros a Medir en una Reacción Enzimática**

Varios son los autores que han publicado la forma de medir los parámetros en una reacción enzimática (Guadix, *et al*, 2000; Segel, 1996; Lehninger, 1995; Gacesa, 1986; Pilling y Seakings, 1999). La velocidad de una reacción catalizada por una enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima ( $V_{max}$ ). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos (Guadix, *et al*, 2000).

Al seguir la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción. Para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción ( $v_0$ ). La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero. De esta forma, la medida de  $v_0$  se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la concentración

del sustrato [S] como esencialmente constante a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad (Segel, 1996)

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato  $[S]_0$  sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Cuando  $[S]_0$  es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas  $[S]_0$ , el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de  $[S]_0$ . En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima ( $V_{max}$ ) (Segel, 1996).

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial ( $v_0$ ) y la concentración inicial de sustrato ( $[S]_0$ ) Michaelis y Menten en 1913, propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas: En la primera etapa la enzima (E) y el sustrato (S) forman el complejo enzima-sustrato (ES) y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto (P), liberando el enzima libre (E):



En este esquema, se puede distinguir que existen tres constantes de velocidad  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  las cuales son las constantes cinéticas individuales de cada



proceso y en ocasiones reciben el nombre de constantes microscópicas de velocidad (Lehninger, 1995).

A través de deducciones a partir de las consideraciones tomadas para una reacción enzimática, se obtiene la expresión más conocida de Michaelis y Menten:

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

donde  $K_m$  es una relación de las tres constantes de velocidad para cada una de las etapas de la reacción,  $V_{\max}$  es la velocidad que se alcanzaría cuando toda la enzima disponible se encuentra unido al sustrato (Gacesa, 1986; Pilling y Seaking, 1999).

La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten ( $v_0$  frente a  $[S]_0$ ) es una hipérbola (Figura 2). La  $V_{\max}$  corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental, y la  $K_m$  corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la  $V_{\max}$  (Segel, 1976).

Para determinar gráficamente los valores de  $K_m$  y  $V_{\max}$  es más sencillo utilizar la representación doble recíproca ( $1/v_0$  frente a  $1/[S]_0$ ), ya que es una línea recta (Figura 3). Esta representación doble recíproca recibe el nombre de representación de Lineweaver-Burk y es una recta en la cual:

La pendiente es  $K_m/V_{\max}$

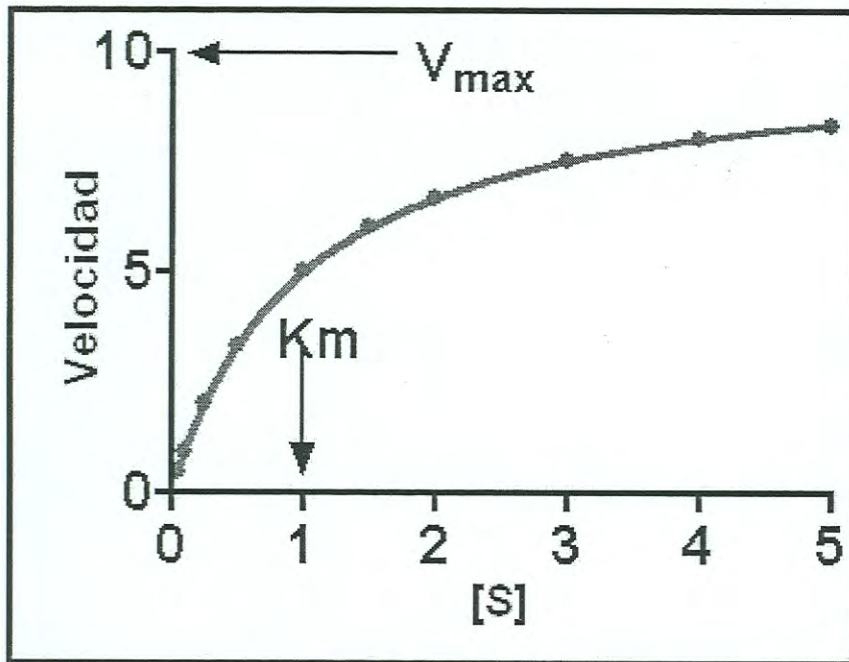


Figura 2. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten.

Fuente modificada de: <http://www.le.ac.uk>, 2004.

La abscisa en el origen ( $1/v_0 = 0$ ) es  $-1/K_m$

La ordenada en el origen ( $1/[S]_0 = 0$ ) es  $1/V_{\max}$

De esta forma, a partir de los datos experimentales se puede calcular gráficamente, los valores de  $K_m$  y  $V_{\max}$  de un enzima para diversos sustratos (Segel, 1976; Gacesa, 1986).

La determinación de  $K_m$  tiene una importancia justificada por diversas razones.  $K_m$  es la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. En efecto, si  $K_m = [S]$ , la ecuación de Michaelis-Menten se reduce a:  $v = V_{\max}/2$  (Lehninger, 1995).

El valor de  $K_m$  da idea de la afinidad del enzima por el sustrato: A menor  $K_m$  mayor afinidad del enzima por el sustrato, y a mayor  $K_m$  menor afinidad. Este hecho tiene fácil explicación si tenemos en cuenta que  $K_m$  se define como  $(k_2+k_3/k_1)$ , donde las reacciones 2 y 3 destruyen el complejo ES, mientras que la reacción 1 lo forma. Así, si  $K_m$  es grande, el complejo ES es inestable pues predomina la tendencia a destruirlo (poca afinidad hacia el sustrato), y si  $K_m$  es pequeña, el complejo ES es estable, ya que predomina la tendencia a formarlo (gran afinidad hacia el sustrato) (Gacesa, 1986).

La  $K_m$  del sustrato natural es menor que la de los sustratos análogos. Si dos sustratos del mismo enzima tienen distinta  $K_m$  el que presente mayor  $K_m$  tiene menor afinidad por la enzima, y la reacción transcurre siempre a menor velocidad

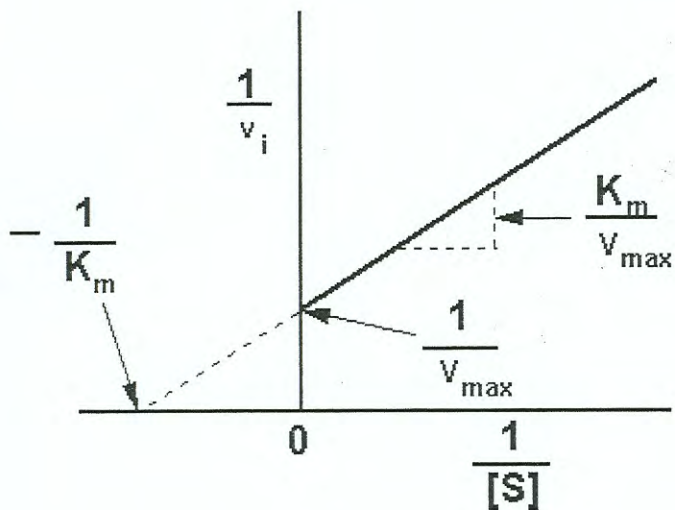


Figura 3. Representación doble recíproca ( $1/v_0$  frente a  $1/[S]_0$ ) de Lineweaver-Burk .

Fuente modificada de: <http://web.indstate.edu>, 2005

que con el sustrato de menor  $K_m$  salvo a concentraciones saturantes de sustrato, donde la  $v = V_{\max}$  (Pilling y Seakings, 1999).

Los valores de  $K_m$  de muchas enzimas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos, de forma que pequeñas variaciones en la [S] pueden suponer grandes cambios en la velocidad de toda una ruta metabólica (Pilling y Seakings, 1999).

### **Factores que Afectan la Velocidad de una Reacción Enzimática**

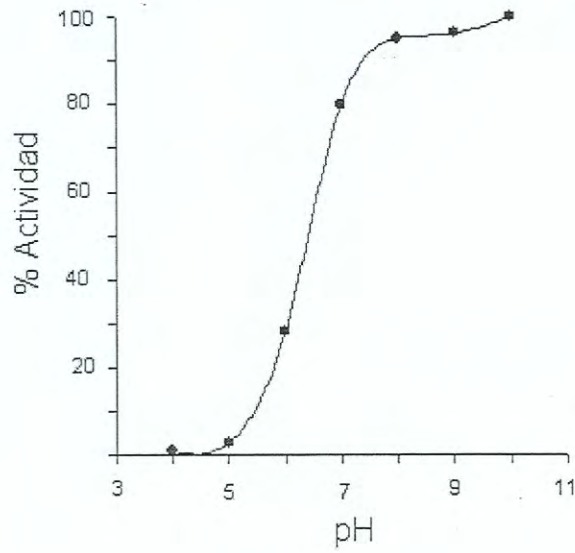
Dentro de los principales factores que afectan la velocidad de reacción de una enzima están el pH y la temperatura. El pH afecta al estado de disociación de los grupos, aunque todas las proteínas no se ven afectadas de igual forma porque algunas no tienen grupos disociables. La mayor parte de las enzimas tienen un pH óptimo. Si hay pequeños cambios de pH no se desnatura la enzima. El pH puede afectar de dos maneras: la unión del sustrato es mejor o peor que antes y/o que afecte a la velocidad catalítica de la reacción (figura 4).

Cuando la temperatura sube la velocidad de reacción aumenta. Existe una temperatura máxima a la cual la proteína se desnatura dejando de ser funcional. La mayor parte de los enzimas se desnaturizan a unos 50°C (Badui, 1999; Lehninger, 1995).

### **Grado de Hidrólisis**

Como ya se mencionó, las proteasas inducen reacciones de hidrólisis en las proteínas. Para el seguimiento y control de la hidrólisis de proteínas es necesario evaluar el grado de hidrólisis, GH, que se define como el porcentaje de

a)



b)

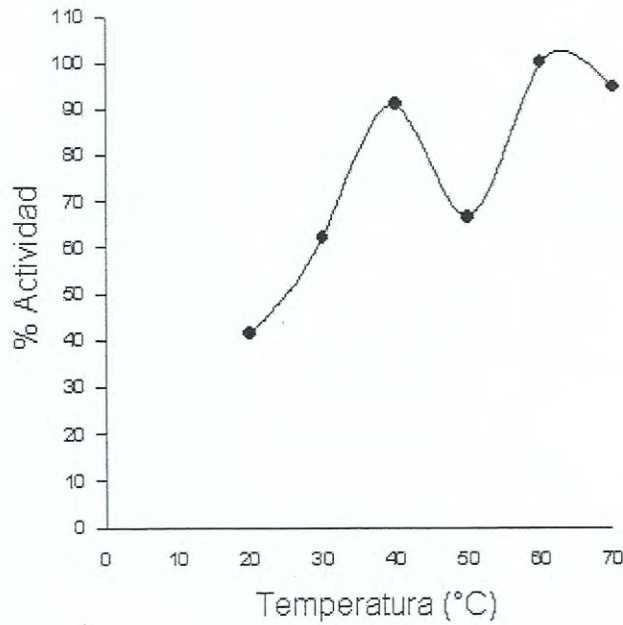


Figura 4. Variación de la actividad enzimática de la enzima tripsina de visceras de lisa (*Mugil cephalus*) con respecto a: a) pH; b) temperatura.

enlaces peptídicos hidrolizados (Guadix, et al, 2000; Nielsen, et al, 2001).

Existen diferentes métodos para determinar el grado de hidrólisis, ya que la hidrólisis de proteínas es un proceso que requiere de un control preciso en esta variable para lograr un producto con características de calidad uniforme (Horcasitas, 2002).

El pH stat es un método ampliamente usado en el monitoreo de la hidrólisis de proteínas (Ezquerro, et al, 1998; García-Carreño, et al, 1997; Nieto, et al, 2005). El método es simple, rápido, reproducible y no destructivo. Su principio se basa en que los aminoácidos poseen al menos un grupo amino primario ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ). El grado de ionización de estos grupos durante la hidrólisis va a depender del pH de la reacción y del pK de ionización. La hidrólisis de la proteína está acompañada de una liberación o consumo de grupos  $+H$ . El control de la hidrólisis, se lleva a cabo manteniendo el pH constante, pero debido a la liberación de grupos carboxilos y aminos durante la hidrólisis, se requiere de un gasto de ácido o base para mantener el pH, excepto en la región de pH 5–6 donde la liberación y consumo de protones se cancelan exactamente uno a otro (Aldler, 1986).

Otra forma de determinar el grado de hidrólisis es mediante el uso de métodos precisos que cuantifican los grupos aminos libres por métodos químicos. Entre estos métodos se encuentran la reacción trinitrobenzensulfónico (TNBS) y el o – phtaldialdehído (OPA). Estos métodos se diferencian principalmente en el tipo de interferencias y el grado de peligrosidad de los reactivos que se usan (Nielsen, et al, 2001).

También existen otros métodos que son poco utilizados como es el caso de la titulación con formaldehído, métodos fluorumétricos, viscosimetría, etc (Mazorra-Manzano, 1995).

### **Propiedades Fisicoquímicas de las Proteínas de Trigo**

Las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas del trigo están muy ligadas a su estructura. Esta estructura depende de la secuencia y la conformación tridimensional de la disposición de los aminoácidos (Miralbés, 2000). Estas características fisicoquímicas pueden verse modificadas al catalizar una ruptura de enlaces peptídicos ya que la cadena de aminoácidos se ve interrumpida.

#### **Punto Isoeléctrico**

Debido a los grupos ionizables de los aminoácidos que forman a las proteínas, éstas son capaces de desarrollar una carga positiva o negativa de acuerdo con el pH al que se encuentren; es decir, su carácter anfotérico les confiere la capacidad de donar y recibir protones; esta situación hace que exista un estado químico conocido como punto isoelectrico (pI) en el que se cuenta con el mismo número de cargas positivas que negativas y cuya carga neta es cero (Tejeda, *et al*, 1995; Lehninger, 1995).

El gluten en su conjunto tiene una composición de aminoácidos de aproximadamente 6% ionizables, 45% polares y 49% apolares; su baja concentración de aminoácidos ionizables y alta concentración de hidrófobos hace que sea poco soluble a pH neutro (Badui, 1999).



La velocidad de migración de una partícula a través de un líquido conductor por la acción de un campo eléctrico, despreciando efectos gravitacionales, está influenciada por algunos fenómenos físicos microscópicos como la carga de la partícula. La teoría electrocinética que ha sido desarrollada para el tratamiento de estos aspectos ha conducido a la elaboración de varios modelos, los cuales varían en su grado de complejidad. Dos modelos básicos de gran utilidad son el modelo de una esfera cargada sumergida en un medio continuo y el modelo de la doble capa. El primero es un modelo sencillo para el tratamiento que consiste en considerar a la partícula como si se tratara de una esfera sumergida en un medio continuo. Un balance de las fuerzas que actúan sobre la partícula cuando esta se mueve a una velocidad constante (en equilibrio), establece que la fuerza que actúa sobre la partícula debida al campo eléctrico es igual a la fuerza de arrastre de la partícula (Tejeda *et al*, 1995).

El modelo de la doble capa permite visualizar las interacciones de una partícula sólida cargada, con su microambiente iónico. Cuando las proteínas desarrollan grupos cargados atraen especies de la solución que presenten cargas contrarias. El modelo de la doble capa propone que este conjunto de cargas genera dos regiones o capas con diferente grado de movilidad. El modelo de la doble capa permite interpretar el hecho que la velocidad de migración de una partícula cargada en un campo eléctrico es proporcional al potencial  $Z$  de la partícula y no a su carga intrínseca. El potencial  $Z$  es el potencial electrocinético medido en la superficie de corte de la partícula (Hunter, 1981).

## **Modificación de las Propiedades Reológicas como Indicadores de la Proteólisis**

El efecto de la extensibilidad provocado por las fracciones de gliadina y la elasticidad impartida por las gluteninas ha sido reportado por algunos autores (Popineau, 1997referido en Miralbés, 2000). Las gluteninas, al impartir elasticidad, aumentan la tenacidad y la fuerza de la harina, mientras que la adición de gliadinas aumenta la extensibilidad de la harina pero reduce la fuerza de la harina. La proporción entre ambas establece las características viscoelásticas del gluten (Miralbes, 2000).

En la utilización industrial de las harinas de trigo, por ejemplo en el proceso de panificación, el volumen de las piezas de pan esta altamente correlacionado con la composición de las proteínas. Así, los mayores efectos en esta característica se le atribuyen a las subunidades de gluteninas de alto peso molecular, la relación glutenina/gliadina, la distribución del peso molecular y la proteína total (MacRichie, 1980; Payne, 1983; Gupta et al, 1992, 1993; Pechanek et al, 1997; citados por Miralbés, 2000). También el efecto de las proteasas se ha estudiado sobre las propiedades reológicas de las masas formadas; algunas publicaciones de investigaciones reportan el uso de aparatos de evaluación de dichas propiedades para estudiar la modificación que se presenta en las masas de harina de trigo al estar bajo el efecto de enzimas (Berger, et al, 1974; Perten, 1990; Ravi, et al, 2000; Galvan, et al, 2001; Rosell, et al, 2002; Caballero, et al, 2004; Aja, et al, 2004; Bonet, et al, 2005). El índice de gluten (IG) es una medición rápida de las características y la fuerza de la red viscoelástica que han formado las proteínas del gluten y es una relación de las proteínas que son separadas por

centrifugación en el sistema de centrifugación del glutomatic (Perten, 1990); este método ha sido usado ampliamente para determinar la calidad del gluten y la fuerza del mismo conferidas por el arreglo de las proteínas que los están formando (Perten, 1990; Félix, 2002; Aja *et al.*, 2004). El farinógrafo produce una curva que reproduce en forma visual el conjunto de características de calidad de la harina. La curva aumenta hasta un máximo a medida que las proteínas de la harina van formando una red viscoelástica y cae a medida que esta pierde resistencia por el amasado continuo. El farinógrafo mide la consistencia de la masa mediante la fuerza necesaria para mezclarla a una velocidad constante y la absorción de agua necesaria para alcanzar esta consistencia (Quaglia, 1991; A.A.C.C., 2001). Por otro lado el alveógrafo y las gráficas que se generan permiten relacionar los valores obtenidos con la adecuación de la harina en distintos procesos. El alveógrafo mide la extensión y la tenacidad de las masas mediante la inyección de aire en discos de masas de dimensiones estandarizadas (Quaglia, 1991; A.A.C.C., 2001).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de Gluten

A dos variedades de trigo, uno panadero (Rayón) y otro cristalino (júpare), se les acondicionó y se dejó reposar de acuerdo a la metodología de la A.A.C.C. (2001) y se llevó a molienda en un molino Quandrumat junior. La harina obtenida se dejó reposar por 24 h.

La extracción de gluten a partir de la harina obtenida se realizó de acuerdo al método 38-10 de la A.A.C.C.(2001). El gluten húmedo obtenido se congeló y posteriormente se sometió a liofilización con el fin de obtener el gluten seco sin modificaciones debidas a altas temperaturas.

### Obtención de las Fracciones Proteicas del Trigo

A partir del gluten seco se llevó a cabo la separación del mismo en sus fracciones proteicas de acuerdo a la técnica de Hernández, (2003, 2004) que consistió en suspender 100 g. de gluten en 400 ml de etanol / agua al 70% (v/v) y agitar por 12 h. La suspensión luego se sometió a una centrifugación por 20 mins a 10,000 x g. El sobrenadante se separó y se consideró como fracción rica en gliadinas y se dejó por 12 h en una corriente de aire para evaporar lo más posible el etanol. El precipitado se resuspendió en 200 ml de etanol / agua al 50% (v/v) y 200 ml de ácido acético 0.05N, se agitó por 1 h y se centrifugó por 10 min a 10,000 x g. el sobrenadante se ajustó a 70% etanol y a pH = 6.75 con NaOH 0.01N se agitó por 12 h a 4 °C y se centrifugó por 30 min a 10,000 x g y se recuperó el precipitado considerándolo como fracción rica en gluteninas. Las

fracciones ricas en gliadinas y gluteninas se congelaron para posteriormente ser liofilizadas.

### Obtención de la Tripsina

Para la obtención de la enzima purificada se llevó a cabo primeramente una semipurificación de la misma a partir de vísceras de la especie *Scomberomorus sierra* capturada en el Golfo de California en el mes de noviembre de 2004 siguiendo para el proceso la metodología descrita por Olivas (2001).

### **Fraccionación con Sulfato de Amonio**

Las vísceras del pelágico se molieron, congelaron y liofilizaron. De las vísceras se pesaron entre 40-50 g. A los cuales se le adicionaron 5 volúmenes de solución amortiguadora de extracción 0.05M de Tris-HCl a un pH de 7.8, conteniendo 0.02M de  $\text{CaCl}_2$  a 4°C (1:5 p/v). La mezcla obtenida se agitó por 4 h. a 4 °C y se centrifugó por 30 min. a 3,000 x g; el precipitado se descartó y al sobrenadante (F1) se le añadió solución Brij 35 (polioxietilen laurel eter) hasta obtener una concentración final de 0.3%. El sobrenadante se mantuvo por 8 h a 4°C, después se centrifugó a 10,000 x g por 30 min. a 4 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante, se fraccionó con sulfato de amonio a 4 °C (entre 30 – 60 % de saturación). Posteriormente se centrifugó a 6,000 x g por 30 min. 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se disolvió en 100 ml de solución amortiguadora de extracción 0.05M de Tris-HCl a un pH de 7.8, conteniendo 0.02M de  $\text{CaCl}_2$  a 4°C para obtener la fracción (F2). La solución obtenida se

dializó por 16 h con tres recambios de la solución amortiguadora obteniéndose así la fracción (F3).

### **Cromatografía de Afinidad**

Para la purificación de la tripsina, la fracción (F3) se hizo pasar por una columna de afinidad. La columna de afinidad se preparó de acuerdo a Pharmacia Fine Chemicals (1979). La fracción (F3) fue bombeado dentro de la columna de afinidad SBTI – Sefarosa 4B (5 ml) a una velocidad de flujo de 0.2 ml/min. El material retenido fué eliminado por lavados con solución amortiguadora Tris – HCl, después la tripsina fue eluída con HCl 5 mM. El eluato de la columna fué colectado en fracciones de 1.5 ml.

### **Actividad de Tripsina**

La actividad de tripsina se midió en cada una de las fracciones (F1, F2, F3) y en el extracto conteniendo la tripsina purificada. Para ello se utilizó el sustrato sintético Benzoil-Arginina-p-Nitroanilida (BAPNA) de acuerdo a Erlenger *et al*, (1961). Se disolvió el BAPNA en dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una solución 1 mM. Después se ajustó el volumen con una solución amortiguadora Tris – HCL 50 mM, a pH de 7.8. La determinación se realizó a 37 °C. En tubos de ensayo se adicionaron 1.25 ml de la solución amortiguadora conteniendo el BAPNA y 0.025 ml de cada fracción colectada (F1, F2, F3). La reacción se detuvo a los 15 min. añadiendo 0.25ml de ácido acético al 30% y la absorvancia se leyó a 410 nm. La actividad tripsina se obtuvo de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\left[ \frac{(Abs_{410nm} / \text{min}) * 1000 * \text{ml.de.reacción}}{8800 * \text{mg.de.proteína}} \right]$$

Donde: 8800 es el coeficiente de extinción de la p-nitroanilida.

Las unidades de actividad se definieron como: una unidad de actividad cataliza la hidrólisis de una  $\mu\text{mol}$  de BAPNA a 25°C y pH de 7.8.

## **Determinación de Proteína**

En la etapa de extracción y purificación de la enzima se determinó la concentración de proteína soluble en las fracciones obtenidas utilizando el método de Bradford (1976) y para medir el contenido de proteína en el gluten y sus fracciones se usó el método Microkjeldahl (AACC, 2001).

### **Determinación de Grado de Hidrólisis**

Para la hidrólisis de las fracciones proteicas del gluten (gliadinas y gluteninas), se siguió la metodología descrita por Nielsen, *et al.* (2001), haciendo reaccionar o-phthaldialdehído (OPA) con los grupos amino en presencia de dithiothreitol (DTT), formando un compuesto colorido que se detecta a 340 nm en el espectrofotómetro.

En la preparación de OPA se usaron 25 ml de tetraborato de sodio 100mM con 2.5 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% y 40 mg de OPA disuelto en 1 ml de metanol, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y el volumen se ajustó a 50 ml con agua desionizada.

En la muestra que contenía 10 mg de proteína se añadieron 10 ml de buffer Tris 50 mM y pH 8.0 en un vaso de precipitado de 50 ml (por triplicado y otro

triplicado de la muestra a la cual no se le agregará enzima, teniendo en total 6 vasos por cada muestra), y se agitó por una hora. Después se ajustó el pH a 8.0. se añadió 1 ml de la enzima purificada y se incubó por 1 hora a 37 °C. Posteriormente se ajustó el volumen a 25 ml con agua desionizada. Se tomó una alícuota de 2.5 ml y se transfirió a un vaso de precipitado de 50 ml conteniendo 10 ml de SDS al 1% y se tapó con un vidrio de reloj. Se colocó en un baño a 75 °C por 45 min y después se transfirió a un matraz de 25 ml y se ajustó el volumen con SDS al 1%, se tomó una alícuota de 125 µl y se transfirió a un tubo (por triplicado) con 2 ml de solución OPA, se mezcló y se incubó por exactamente 2 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 340 nm (contra blanco de agua).

Se graficó la absorbancia a 340 nm contra concentración de leucina usando 0, 50, 75 y 125 µl de estándar de leucina (1.5 mM) correspondiente a 0, 0.075, 0.1125 y 0.1875 meq respectivamente.

El grado de hidrólisis se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$GH = \left( \frac{h}{h_o} \right) * 100$$

Donde  $h$  es el total de meq de leucina por muestra y  $h_o$  es específica para cada materia prima y para la proteína de trigo, la cantidad de meq de leucina en la proteína de trigo correspondiente a 0.5187. (Nielsen *et al.*, 2001).

El total de meq de leucina por muestra se calculó a partir de la curva estándar de leucina y las diferencia entre la absorbancia de la muestra con enzima y el blanco (muestra sin enzima).



### **Determinación de los Parámetros Cinéticos de la Reacción**

Se realizaron pruebas de grado de hidrólisis mediante la metodología anteriormente descrita, con diferentes concentraciones de sustrato (fracciones proteicas de trigo), es decir para diferentes concentraciones de gluten, gliadina y glutenina por separado, con el fin de determinar los parámetros cinéticos de la reacción ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) (Nielsen *et al.*, 2001)

### **Determinación del Punto Isoeléctrico en el Gluten de Trigo.**

La medición del potencial zeta o potencial electrocinético en función del pH permite determinar su punto isoeléctrico es decir cuando el valor del potencial zeta sea cero. Se midió el potencial zeta de partículas de gluten de las dos variedades de trigo nativo e hidrolizado por la enzima en función del pH (25 mediciones en cada valor de pH estudiado reportando en gráficas el promedio y desviación estándar) por medio del equipo ZETA-METER 3.0+ (Zeta-meter, Inc, 2003) en una suspensión de 10 mg de gluten en 100 ml con una fuerza iónica proporcionada por NaCl 1mM. Se usaron 15 minutos para estabilizar el pH del sistema. Se estimó el punto isoeléctrico o potencial zeta cero mediante la interpolación de las curvas que se construyeron con los datos de potencial zeta. La concentración de la enzima usada para medir el potencial zeta en el gluten hidrolizado fue de 0.139 mg/ml.

### **Evaluaciones de las Propiedades Reológicas de las Masas Bajo la Acción de la Enzima**

Las evaluaciones de las propiedades reológicas se realizaron usando

concentraciones de enzima y contenido de proteína en la harina que asegurara una  $V_{\max}$  de reacción en base a la cinética previamente establecida para gluten, con el fin de atribuir los cambios solo a las variaciones en las dosis de enzima.

### **Índice de Gluten (IG)**

El Índice de gluten (IG) fue determinado de acuerdo al método 38-12A de la AACC (2001). Previo al lavado de la masa, esta se formó con una solución conteniendo la enzima en tres concentraciones (0.0, 4.6 y 10.0 mU de actividad) y se dejó reposar a 37 °C para cinco diferentes intervalos de tiempo (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 h). Después del reposo, se determinó el gluten húmedo, el gluten seco y el índice de gluten conforme al método estándar usando un glutomatic (Perten, Huddinge, Sweden).

### **Ensayos en el Farinógrafo**

Se pesaron 50 g. de harina y se le determinó el porcentaje de absorción de agua en cada una de las harinas de las dos variedades de trigo para posteriormente correr el ensayo con el farinógrafo con dicha cantidad de agua en los ensayos a los que se les añadiría la enzima. La enzima se añadió tomando la cantidad de unidades de actividad previamente fijada (0.0, 23.0 y 46.0 mU de actividad) a partir de la solución de la enzima purificada y diluyéndola con agua destilada hasta obtener el volumen correspondiente al porcentaje de absorción de agua. Se comenzó el amasado en conforme al método 54-21 de la AACC (AACC,

2001) y después de los 20 min de amasado se dejó reposar la masa 1.5 h lo anterior seguido por 20 min mas de amasado.

### **Ensayos en el Alveógrafo**

La modificación reológica debida a la proteólisis también se evaluó mediante el alveógrafo Chopin (Tripette et Renaud, Paris, Francia) con la metodología descrita por Rosell, et al (2002) analizando el cambio en la energía de deformación (W) después de 3 h de reposo a 25 °C. Se realizaron ensayos con un control de cada variedad de harina y dos concentraciones de enzima aplicada (140.0 y 280.0 mU de actividad).

La cantidad de enzima añadida se seleccionó de acuerdo a Hsu, et al (1977) y considerando que con la concentración de sustrato presente en la harina se alcanzaría una velocidad máxima de hidrólisis con las dos dosis de enzima.

### **Diseño Experimental y Tratamiento Estadístico**

En la etapa de obtención de la tripsina, los ensayos se realizaron por triplicado para asegurar la confiabilidad de los resultados.

Las medias de las absorbancias a 340 nm en las determinaciones de grado de hidrólisis se compararon aplicando un análisis de varianza con una posterior prueba de Tukey haciendo uso del paquete JMP versión 4.0.

Las determinaciones de la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima, se obtuvieron realizando el ajuste de Lineweaver-Burk.

Los datos arrojados en las tres repeticiones en cada uno de los tiempos de reposo en el caso del índice de gluten fueron usados para obtener una media de

éstos y una desviación estándar en un diseño factorial de 3 x 5 (3 concentraciones de enzima y 5 tiempos de reposo).

En el caso del alveógrafo Chopin, este equipo cuenta con programa de procesamiento de datos integrado en su software. Haciendo uso de las repeticiones en el aparato y las curvas que de éstas se obtienen, se da una curva promedio de la cual se tomaron los datos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Semipurificación de la Tripsina

Los resultados de la etapa de extracción de la enzima y su purificación se presentan en la tabla 3. En esta se observa que se logró una purificación de la tripsina de 52.08 veces la actividad específica que la determinada para el extracto crudo. Estos datos son semejantes a los reportados en estudios publicados (Olivas, 2001; Simpson et al, 1984) en lo referente a la actividad donde se reportan valores de hasta 72.7 veces para tripsinas extraídas de otras especies, tales como la lisa (*Mugil cephalus*).

### Cromatografía de Afinidad

La actividad específica mas alta se determinó para la enzima purificada lo cual era lo esperado ya que la cromatografía de afinidad es ampliamente recomendada para este tipo de separación (Tejeda, et al, 1995).

La actividad de tripsina desde el extracto crudo presentó valores más altos que los reportados para tripsinas extraídas de otras especies marinas (Olivas, 2001; Simpson y Haard, 1984). En la fracción obtenida después de la etapa de cromatografía se obtuvo un valor de 2.22 U/mg de proteína, el cual es alto en relación al 0.24 U/mg de proteína reportado por Olivas (2001) quien trabajó con la especie *Mugil cephalus*, sin embargo se ha reportado para la misma especie una actividad específica 1.356 U/mg de proteína (Guizani, et al, 1991).

Las diferencias detectadas en la actividad enzimática en organismos marinos se atribuyen a diferentes factores principalmente ambientales (Haard,

Tabla 3. Esquema de la purificación de tripsina a partir del intestino de Sierra (*Scomberomorus sierra*).

Etapa	Proteína (mg /ml)	Actividad específica (U / mg de proteína)	Purificación
Extracto crudo	4.700	0.042	1
Fraccionación con sulfato de amonio	2.120	0.124	2.90
Dializado	1.860	0.160	3.74
Cromatografía	0.139	2.220	52.08

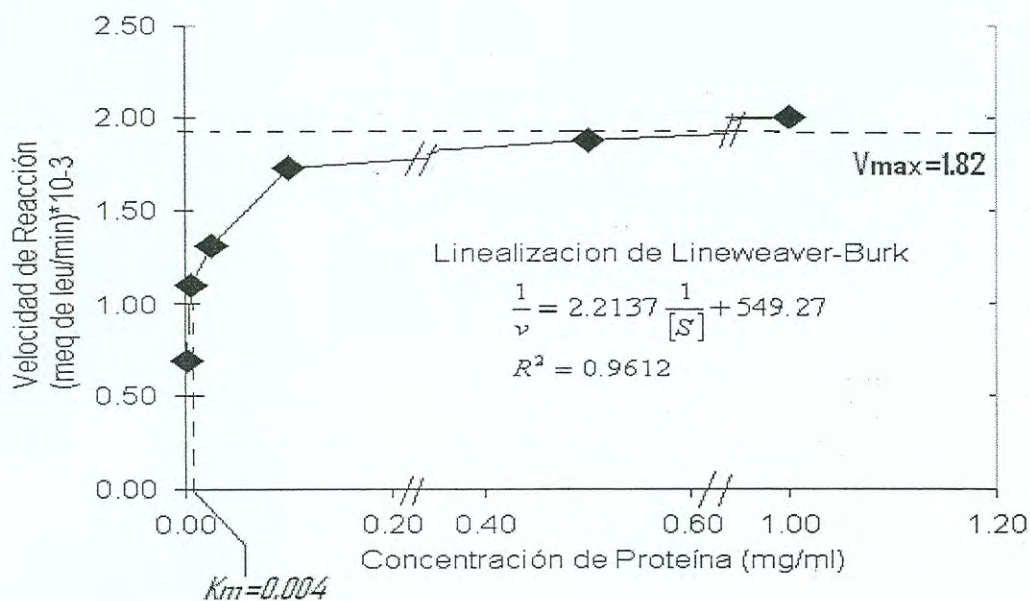
1992). Ya se mencionó que la temperatura influye sobre la actividad de la enzima, además se sabe que dependiendo del habitat del organismo, es la alimentación de éste, y esto también influye sobre los sistemas enzimáticos. De ahí que las diferencias detectadas pueden atribuirse al hecho de que la sierra es una especie carnívora capturada principalmente en los meses fríos mientras que la lisa se obtiene en meses más cálidos (Pérez y Luna, 1985).

### Parámetros Cinéticos

En las figuras 5, 6 y 7, se pueden observar la velocidad que la reacción de hidrólisis desarrolló en función de las diferentes concentraciones de los distintos sustratos. A partir de los datos de velocidad de reacción y de concentración de sustrato se obtuvieron las ecuaciones (figuras 5, 6 y 7) de las rectas de doble recíproca de Lineweaver-Burk con los datos inversos de velocidad y concentración de sustrato correspondientes a la gráfica de Michaelis-Menten, cuya pendiente y constante aditiva aparecen como  $K_m$  y  $V_{\max}$  respectivamente en la tabla 4.

La tabla 4 muestra los datos de  $K_m$  y  $V_{\max}$  obtenidos a partir de la relación de Lineweaver-Burk. La  $V_{\max}$  de mayor magnitud (1.94 meq de leu/min) la presentó la reacción de hidrólisis de las gluteninas de trigo júpare, sin embargo ésta no presentó una diferencia significativa con la desarrollada por la hidrólisis del gluten de trigo variedad rayón. En cuanto a la constante de Michaelis-Menten, las gluteninas de ambas variedades de trigo presentaron la  $K_m$  de menor magnitud en relación a las otras fracciones proteicas (gluten y gliadinas) en la misma variedad, lo cual es un índice de la afinidad que tiene la enzima por este sustrato

a)



b)

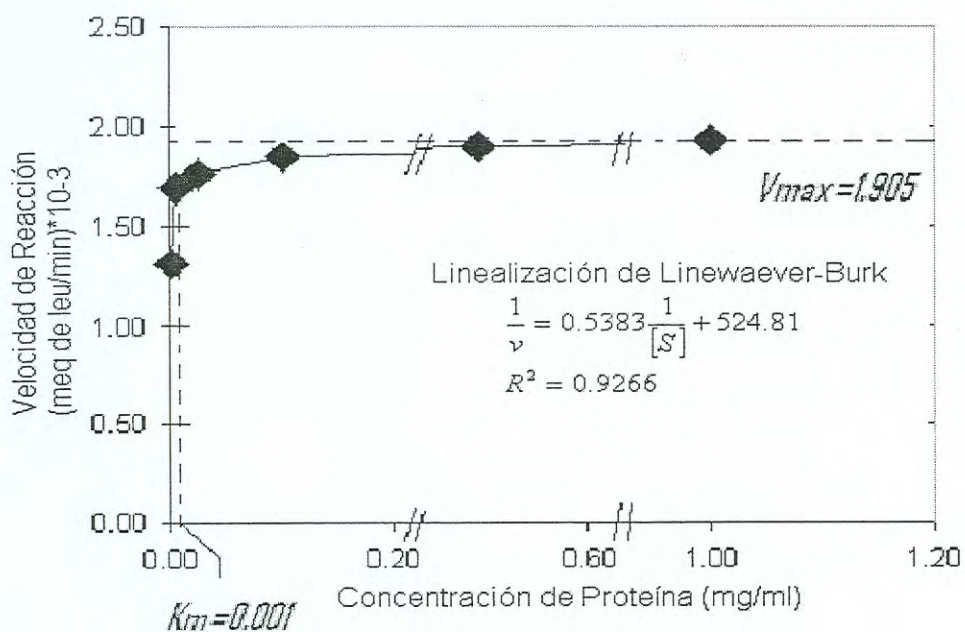


Figura 5. Gráfica de Michaelis-Menten para determinar las características cinéticas de la hidrólisis de: a) gluten de trigo variedad Júpares; b) gluten de trigo variedad Rayón, y linealización de Lineweaver-Burk.



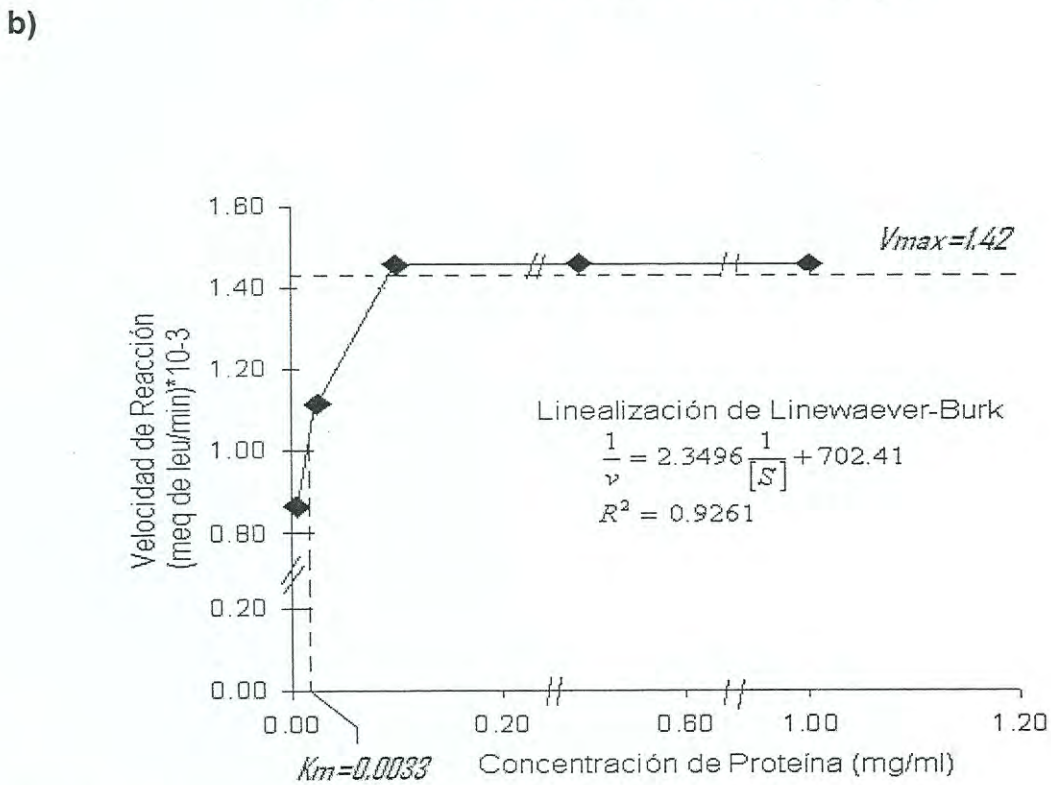
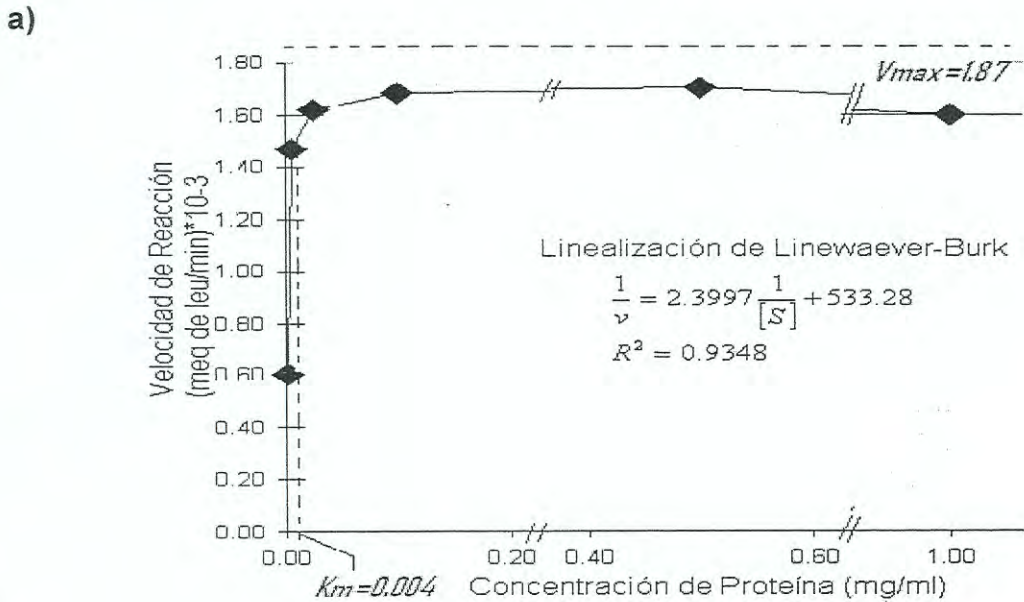
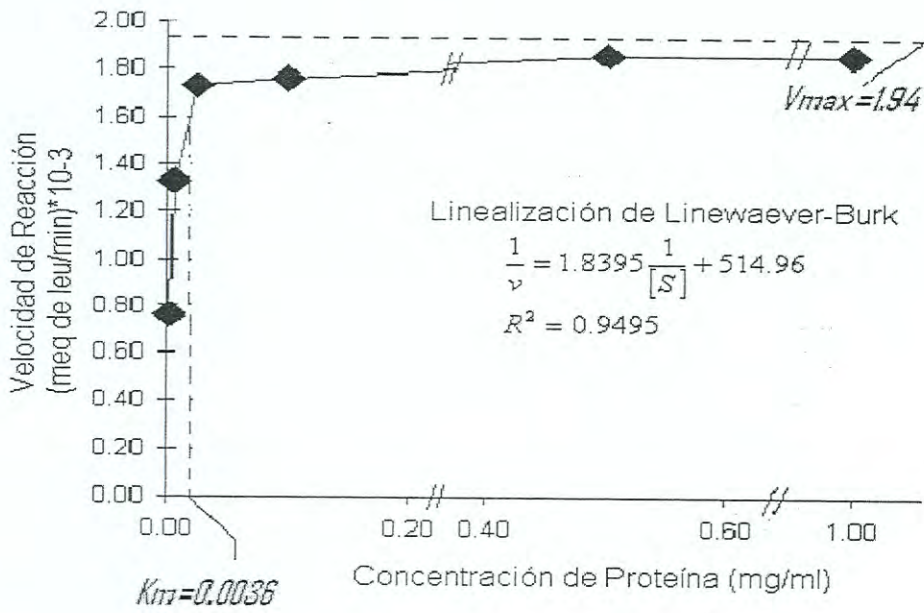


Figura 6. Gráfica de Michaelis-Menten para determinar las características cinéticas de la hidrólisis de: a) gliadinas de trigo variedad Júpares; b) gliadinas de trigo variedad Rayón, y linealización de Lineweaver-Burk.

a)



b)

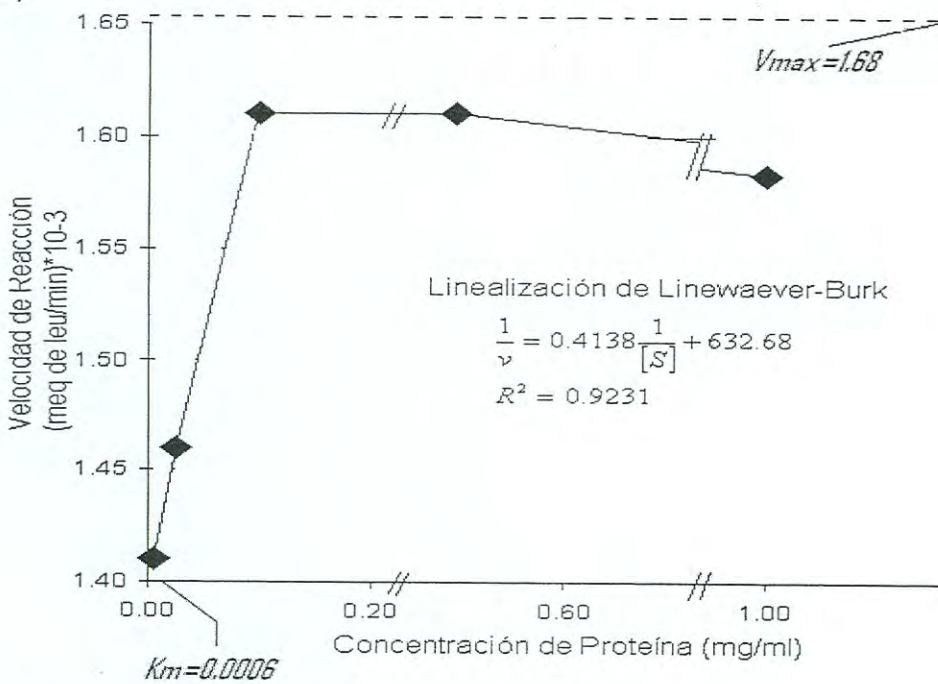


Figura 7. Gráfica de Michaelis-Menten para determinar las características cinéticas de la hidrólisis de: gluteninas de trigo variedad Júpares; b) gluteninas de trigo variedad Rayón.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la hidrólisis de las distintas fracciones proteicas de las dos variedades de trigo y comparación con el sustrato BAPNA.

Sustrato	$K_m$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$V_{max}$ (meq de leu/min) $\times 10^{-3}$
BAPNA	0.054	*
<u>Trigo Júpare</u>		
Gluten	4.028	1.82
Gliadinas	4.48	1.87
Gluteninas Júpare	3.56	1.94
<u>Trigo Rayón</u>		
Gluten	1.025	1.905
Gliadinas	3.33	1.42
Gluteninas	0.69	1.68

\* $9.86 \times 10^{-3}$  mM/s

(Segel, 1976; Badui; 1999; Whitaker, 1995). Lo anterior es tal vez debido a que los aminoácidos lisina y arginina están presentes en mayor proporción en esta fracción proteica del gluten (Atwell, 2001; Anderson, *et al.*, 1989; Thompson, *et al.*, 1985 ) ya que la tripsina, como se ha mencionado, presenta una preferencia alta por sustratos con residuos de lisina y arginina (Copeland, 2000).

La reacción con el gluten de ambas variedades de trigo, según se muestra en la Tabla 4, presentó una  $K_m$  con un valor intermedio en relación a los que muestran las fracciones proteicas que lo están formando. Los valores de  $K_m$  son menores a los reportados para la reacción de hidrólisis de proteínas de suero de leche y de caseína (5.6 y 2.7 mg/ml respectivamente) catalizada por serina – proteasas de *Bacillus licheniformis* (Madsen, *et al.*, 1997), esto indica que la enzima en este estudio alcanza sus velocidades máximas de catálisis con una concentración de sustrato menor que la reportada para esa bacteria.

A partir de los resultados sobre los parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de proteínas y comparándolos con los presentados en otras investigaciones (Guadix, *et al.*, 2000; Madsen y Qvist, 1997), puede establecerse que la enzima tripsina obtenida a partir de víscera de sierra, puede hidrolizar las proteínas del trigo, y esta habilidad dependerá del tipo de proteína.

La enzima tripsina tiene afinidad por sustratos que contengan lisina-arginina. A pesar de que se ha reportado el bajo contenido de los mencionados aminoácidos en la proteína del gluten y sus fracciones (Cervantes, *et al.*, 2002; Madsen y Qvist, 1997) la hidrólisis de las mismas ha registrado parámetros

comparables a los determinados para la misma reacción con diferente enzima y diferente sustrato (Madsen y Qvist, 1997; Guadix, *et al.*, 2000).

Las  $K_m$  mostradas en la tabla 4 resultan menores a la  $K_m$  determinada para la enzima tripsina procedente de la especie *Litopeneus vannamei* con el sustrato artificial BAPNA reportado por Burgos, *et al.*, (2005) donde  $K_m$  tiene un valor de 0.1 mg/ml. La mayor afinidad que la enzima presenta da por el sustrato natural (proteínas del trigo), es debida a las diferencias en las especies marinas y en la metodología de extracción. La  $K_m$  para la tripsina de *Scomberomorus sierra* en estudio en la reacción con BAPNA fue de 0.054  $\mu$ g/ml.

### **Grado de Hidrólisis de las Proteínas de Trigo**

El grado de hidrólisis alcanzado por las distintas fracciones proteicas de las dos variedades de trigo como sustrato se presenta en la tabla 5. Los datos reportados para la hidrólisis de proteínas usando proteasas obtenidas a partir de otras fuentes (Nielsen *et al.*, 2001; Nieto, *et al.*, 2005; Olivas, 2001), son mayores a los resultados obtenidos en la hidrólisis de las distintas fracciones proteicas de las dos variedades de trigo estudiadas, sin embargo con las enzimas comerciales se presentan una diferencia considerable de 10–14% con respecto al grado de hidrólisis determinado en la presente investigación ya que comparando los valores reportados por Nielsen *et al.* (2001) de 30.12 - 34.07% son evidentemente superiores al 18.56 – 22.44% determinado en estas evaluaciones; pero comparando estos últimos con los reportados para la hidrólisis con enzimas de origen marino por Nieto *et al.* (2005) y Olivas (2001) de 21.61-24.29%

**Tabla 5. Grado de hidrólisis alcanzado por las distintas fracciones proteicas de las dos variedades de trigo como sustrato de la tripsina del tracto digestivo de *Scomberomorus sierra*.**

Fracción proteica	Grado de hidrólisis (%)	Desv. Std.
<b><u>Gluten</u></b>		
Trigo variedad Júpare	20.31 <sup>a</sup>	0.528
Trigo variedad Rayón	22.44 <sup>b</sup>	0.180
<b><u>Gliadinas</u></b>		
Trigo variedad Júpare	18.56 <sup>a</sup>	0.269
Trigo variedad Rayón	22.37 <sup>c</sup>	0.248
<b><u>Gluteninas</u></b>		
Trigo variedad Júpare	21.75 <sup>b</sup>	0.196
Trigo variedad Rayón	19.70 <sup>c</sup>	0.526

a, b, c mismo carácter en el superíndice corresponde a sin diferencia significativa

es indicativo de que la enzima tripsina obtenida en este estudio es apta para hidrolizar las proteínas del gluten de trigo.

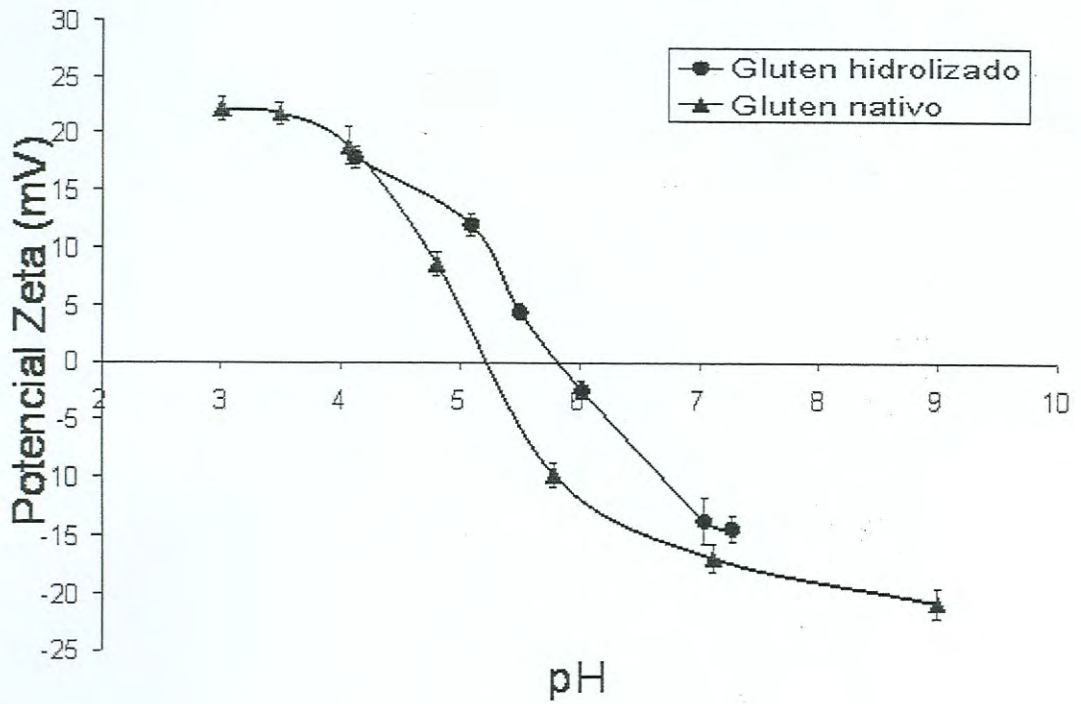
Se ha reportado un estimación del grado de hidrólisis para gluten de trigo por enzimas obtenidas de víscera de *Mugil cephalus*, determinado mediante la técnica de caída de pH en donde se observó que la tripsina del tracto digestivo de esta especie, es capaz de hidrolizar al gluten de trigo presentan valores semejantes para el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados (Olivas, 2001). El grado de hidrólisis determinado por Nieto (Nieto, *et al.*, 2005) para harina de pescado haciendo uso de extracto de hepatopancreas de *Litopeneus vannamei* también hizo uso del método del pH-stat.

Tanto los resultados del grado de hidrólisis como los de las características cinéticas son congruentes entre si, ya que el grado de hidrólisis se midió usando una concentración de sustrato que aseguró el desarrollo de la velocidad máxima de reacción. Así, el gluten de trigo variedad Rayón, el cual presentó la velocidad máxima de mayor magnitud (tabla 4), también obtuvo el mayor grado de hidrólisis (tabla 5).

### **Efecto de la Hidrólisis de las Proteínas de Trigo en el Punto Isoeléctrico**

La figura 8 presenta la variación del potencial zeta en función del pH para el gluten de trigo variedad Júpare y Rayón respectivamente. La variación del punto isoelectrico es presentada en la tabla 6. Una variación mayor se detectó en el gluten de trigo variedad Júpare a pesar de que este presentó un

a)



b)

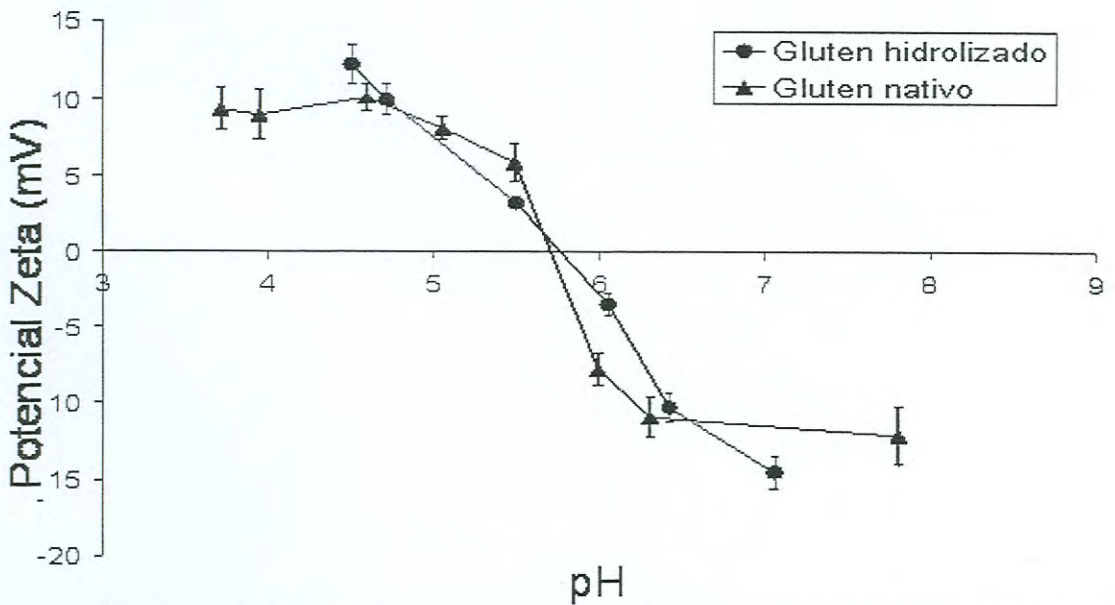


Figura 8. Variación del punto isoeléctrico en las partículas de a) gluten de trigo variedad Júpate; b) gluten de trigo variedad Rayón, al ser hidrolizados.



**Tabla 6. Variación del punto isoeléctrico del gluten obtenido a partir de la intersección de las curvas de las figuras 8 a) y b) en el potencial electrocinético cero.**

<b>Gluten</b>	<b>Punto isoeléctrico del gluten nativo.</b>	<b>Punto isoeléctrico del gluten hidrolizado.</b>
Trigo variedad Júpare	5.095	5.830
Trigo variedad Rayón.	5.708	5.768

grado de hidrólisis menor que el gluten de trigo variedad Rayón, sin embargo la variación del punto isoeléctrico esta en función de la exposición de grupos cargados de la partícula de gluten y esta característica está a su vez determinada por la composición de aminoácidos ionizables (Shigeru, et al, 1985; Badui, 1999).

La variación del punto isoeléctrico de las partículas de gluten tendiente hacia pH básicos indica que quedaron expuestos aminoácidos con grupos R ácidos después de la hidrólisis los cuales pudiesen ser ácido glutámico ya que se ha reportado que este aminoácido se encuentra en mayor proporción tanto en gliadinas (41.1% del total de sus aminoácidos) como en gluteninas (34.2% del total de sus aminoácidos) (Atwell, 2001). Esta tendencia ha sido reportada por Potus y colaboradores (1996) y se lo atribuyen a que durante las transformaciones tecnológicas, el pH de los productos derivados de las proteínas de cereales es próximo a la neutralidad y presenta pocas variaciones, debido al efecto tampón ejercido por las mismas proteínas.

El punto isoeléctrico de las proteínas nativas de trigo de las dos variedades se localizó en pH ligeramente ácidos (tabla 6). Se ha reportado un valor para el punto isoeléctrico de 5.6 – 5.9 correspondiente a tripsina obtenida de especies marinas (Hjemeland y Raa, 1982). La coincidencia en el rango de pH donde se encuentra el punto isoeléctrico tanto de los sustratos (gluten) como de la enzima, indica que ambos compuestos muestran una tendencia similar en la variación de las solubilidades en función del pH.

## Efecto de la Hidrólisis en las Características Reológicas de Masas

### Índice de Gluten (IG)

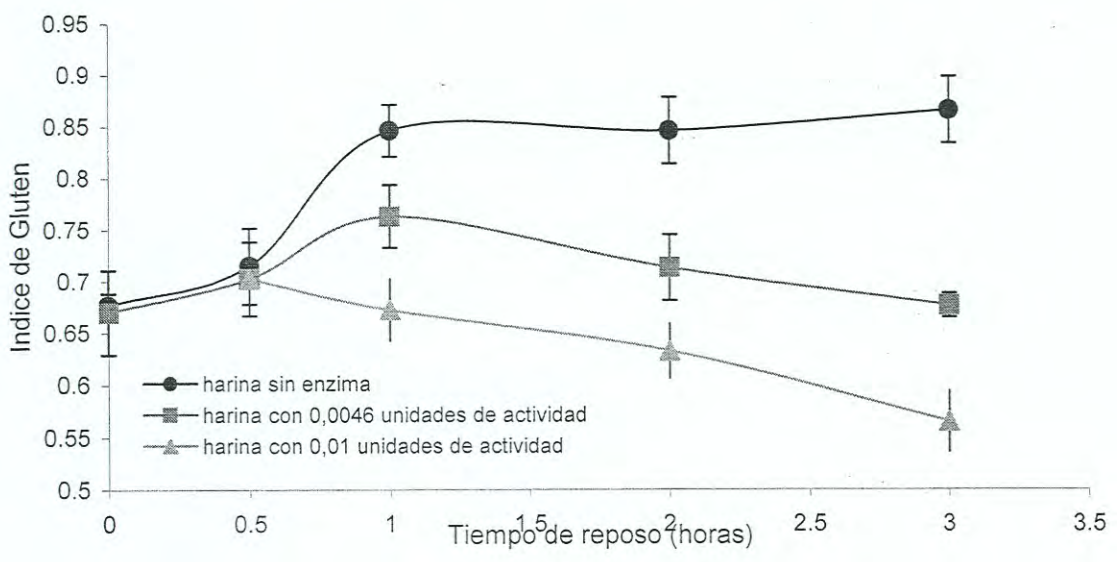
La tendencia que siguió el comportamiento del IG en ambas harinas se muestra en las figuras 9. El grado de hidrólisis que se presenta en el gluten se refleja en la caída de este índice ya que la red de proteína formada se ve debilitada con la acción de la enzima (Lindahl y Eliasson, 1992). Este efecto también se ha reportado en el gluten de trigos atacados por insectos que inyectan enzimas proteolíticas en el grano previamente a la cosecha (Aja, et al, 2004). Sin embargo en nuestro estudio la acción enzimática se indujo con el fin de modificar las características del gluten.

Las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) solo se encontraron en todos los IG determinados después de 0.5 h de reposo con la enzima inoculada en ambas variedades de trigo.

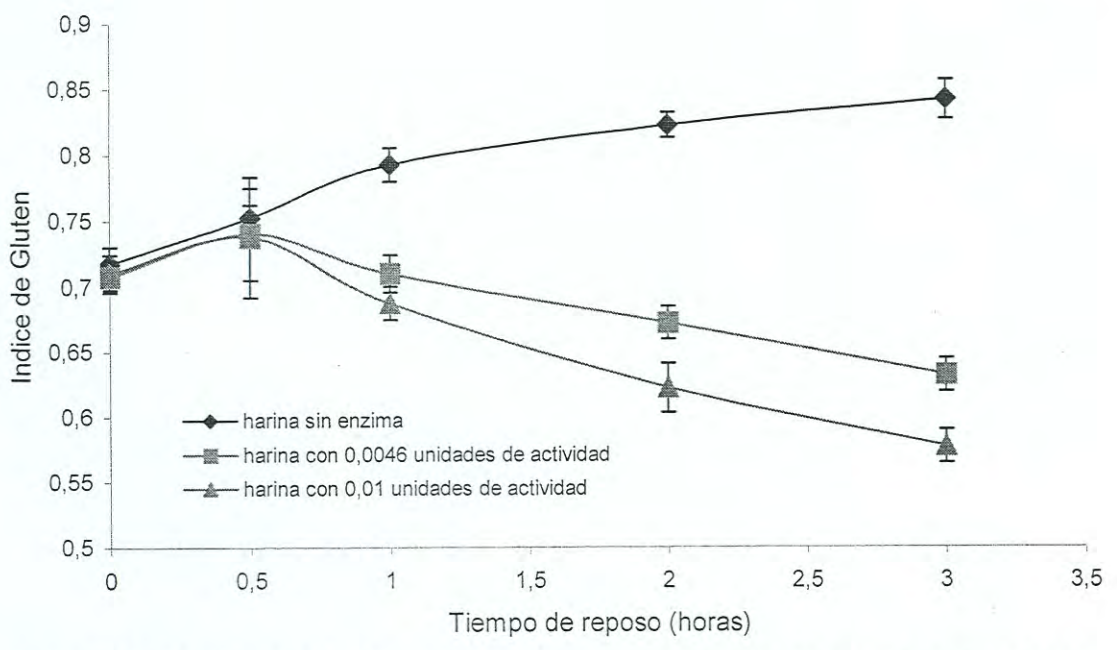
El índice de gluten de la harina de trigo de variedad Rayón, sin reposo y sin añadir enzima, presentó un valor de 0.676 y la harina de trigo Júpare presentó un valores cercanos a éste a las 2 h con 0.0046 unidades de actividad (0.672) y a la hora de reposo con 0.01 unidades de actividad (0.687) (figura 9).

Estos resultados indican que la fuerza del gluten de la harina de trigo Júpare debida a la tenacidad que las proteínas sin hidrolizar le estaban confiriendo, fue decayendo proporcionalmente a las dosis de enzimas con las que se trabajó y conforme la hidrólisis transcurrió.

a)



b)



**Figura 9. Variación del índice de gluten con respecto al tiempo de reposo de la masa de: a) harina de trigo Rayón; b) harina de trigo Júpate, con distintas dosis de enzima.**

## Ensayos con el Farinógrafo

Los resultados de los ensayos con el farinógrafo para las harinas de trigo variedad Júpare y Rayón se muestran en las tablas 7 y 8. La absorción de agua entre el control y las muestras a las que se les adicionó la enzima se mantuvo constante debido a que el catalizador se agregó dentro de la cantidad de agua marcada como el porcentaje de absorción en el control. Una diferencia de 2 puntos porcentuales en esta propiedad fue encontrada entre las dos variedades de trigo, esto debido a la diferencia entre la especie de los trigos usados.

Los ensayos en el farinógrafo mostraron que durante los primeros 20 minutos de amasado la estabilidad no se ve severamente afectada ya que solo disminuyó hasta 2 min por la acción de la enzima, sin embargo la consistencia después del periodo de reposo de 1.5 h registró un aumento de hasta 50 Unidades Brabender (UB) de cambio mas grande (tabla 7). Este resultado coincide con el efecto observado en los tiempos de reposo más largos en las determinaciones del índice de gluten el cual baja con mayor notoriedad debido tal vez a que la enzima tripsina del tracto digestivo de sierra (*Scomberomorus sierra*) altera la red viscoelástica de gluten, transformando así las propiedades reológicas de la masa de harina de trigo.

Algunas investigaciones advierten que el efecto de un sobreamasado puede reflejarse en la pérdida de consistencia en la masa (Feillet, *et al.*, 1996). En los ensayos realizados, el control que se sometió al mismo tratamiento de 20 minutos de amasado, 1.5 h de reposo más 20 min de amasado, presentó un decaimiento de 180 y 90 UB en la masa de harina de trigo panadero y de trigo duro, respectivamente. Así mismo, para la masa de la variedad Júpare, el valor

Tabla 7. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de los farinogramas en la harina de trigo variedad Júpare.

	Concentración de enzima**		
	0.00 UA (control)	0.023 UA	0.046 UA
Tiempo de llegada (min)	1.50	1.00	1.25
Tiempo de desarrollo (min)	3.00	3.00	3.00
Estabilidad (min)	12.50	11.00	10.50
Tiempo de salida (min)	14.00	12.00	12.00
Índice de tolerancia al amasado (UB)**	30	60	60
Decaimiento a los 20 minutos (UB)**	50	80	80
Tiempo de caída a (min)	6.50	6.00	5.00
Grado de ablandamiento (UB)**	40	70	70
Absorción de agua (%)	65	*	*
Decaimiento en consistencia después de 1.5 horas de reposo y 20 minutos de mezclado (UB)**	90	110	140

\*No se determinó en la presencia de la enzima, sino que se usó la determinada en el control. Este decaimiento presentó una tendencia

\*\* UA= Unidades de actividad; UB= Unidades Brabender.

Tabla 8. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de los farinogramas en la harina de trigo variedad Rayón.

	Concentración de enzima**		
	0.00 UA (control)	0.023 UA	0.046 UA
Tiempo de llegada (min)	2.00	2.25	2.50
Tiempo de desarrollo (min)	4.5	5.00	4.75
Estabilidad (min)	10.00	10.75	7.75
Tiempo de salida (min)	12.00	13.00	10.25
Índice de tolerancia al amasado (UB)**	40	30	40
Decaimiento a los 20 minutos (UB)**	60	50	70
Tiempo de caída a (min)	7.00	8.00	4.5
Grado de ablandamiento (UB)**	50	40	60
Absorción de agua (%)	63	*	*
Decaimiento en consistencia después de 1.5 horas de reposo y 20 minutos de mezclado (UB)**	180	200	210

\*No se determinó en la presencia de la enzima, sino que se usó la determinada en el control.

\*\* UA= Unidades de actividad; UB= Unidades Brabender.

del índice de tolerancia al amasado aumentó en 20 UB con las dos dosis de enzima, indicando que la tenacidad de la red de gluten se debilitó. Se sabe que al utilizar enzimas proteasas se provocan cambios en las respuestas del farinógrafo que dependen de la dosis y de la fuente de enzima (Miralbés, 2000), tal es el caso de obtener una disminución en la tolerancia al amasado que indica que es necesario reducir el tiempo de amasado durante la elaboración de un producto.

### **Ensayos con el Alveógrafo**

La tabla 9 muestra los resultados obtenidos para los ensayos en el alveógrafo. Se observa que la actuación de esta tripsina no se traduce en una modificación de las propiedades viscoelásticas de las harinas (medidas con el alveógrafo) semejante a la reportada en estudios hechos a harinas atacadas con enzimas provenientes de insectos (Aja, et al, 2004).

La extensibilidad (L) presentó un comportamiento proporcional a la cantidad de UA añadidas; resultados semejantes a este comportamiento se ha reportado para el uso de proteasas comerciales (Miralbes, 2000). Sin embargo esta proporcionalidad se ha visto, en el caso del uso de proteasas comerciales, como un comportamiento exponencial donde la cantidad de enzima es cada vez mayor para conseguir incrementos menores en L (Galvan et al, 2001). La (L) mayormente modificada en la harina de trigo Júpate, es debida tal vez al grado de hidrólisis alcanzado en mayor proporción en las gluteninas (tabla5), las cuales son responsables de la extensibilidad en las masas de harina de trigo (Miralbes, 2000; Popineau, 1997). El efecto después de 3 h y no en la



Tabla 9. Efecto de la concentración de enzima sobre las características de los alveogramas de las harinas de trigo Rayón y Júpare.

28 min	Harina de Trigo Júpare			Harina de Trigo Rayón		
	0.00 UA	0.14 UA	0.28 UA	0.00 UA	0.14 UA	0.28 UA
P (mmH <sub>2</sub> O)	139	146	104	66	65	65
L (mm)	36	34	39	129	132	128
P/L	3.86	4.29	2.67	0.51	0.49	0.45
W (x 10 <sup>-4</sup> J)	211	195	199	255	245	235
G	13.4	13.0	15.6	25.3	25.6	24.2
<b>3 horas</b>						
P (mmH <sub>2</sub> O)	139	112	107	62	59	60
L (mm)	35	45	52	133	133	138
P/L	3.97	2.49	2.06	0.47	0.44	0.43
W (x 10 <sup>-4</sup> J)	207	149	214	250	242	253
G	13.2	14.9	16.1	25.7	25.7	26.1

primera determinación a los 28 min de reposo refleja lo obtenido en las determinaciones de IG ya que en dichos ensayos (figura 9) puede observarse que a las 0.5 h la enzima no ha modificado este índice como para presentar diferencias significativas. El comportamiento de la tenacidad (P) fue inversamente proporcional a la concentración de enzima.

La relación P/L, ó equilibrio de la curva, presentó una tendencia a disminuir similar a la de P tanto en la harina de trigo panadero como en la de trigo cristalino, debido tal vez a que la influencia de la adición de enzima es mayor, en cuanto a la proporcionalidad, en la tenacidad que en la extensibilidad. La energía de deformación (W) no presentó una tendencia claramente definida en relación a la cantidad de UA añadidas.

## CONCLUSIONES

En las condiciones realizadas en este estudio, se avanzó en el conocimiento de la capacidad catalítica de la enzima tripsina purificada de visceras de sierra (*Scomberomorus sierra*) y en el grado de modificación fisicoquímica que provoca en las proteínas del gluten de trigo. Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos,  $V_{max}$  y  $K_m$ , indicaron que esta tripsina tiene una mayor afinidad por las gluteninas de los trigos de variedades Júpare y Rayón. Así mismo, el grado de hidrólisis medido utilizando el método OPA en presencia de DTT, evidenció la capacidad catalítica que tiene la enzima ante el gluten y sus fracciones separadas, gliadina y glutenina, de las dos variedades, que resultó ser muy parecida a la que han presentado otras proteasas de origen marino con sustratos naturales. En lo referente al efecto en las características fisicoquímicas de estas proteínas, el punto isoeléctrico medido por la técnica del cambio en el potencial electrocinético en función del pH, fue modificado en mayor grado en el gluten de la variedad Júpare con un desplazamiento hacia el pH neutro pero sin llegar a éste, indicando que este gluten hidrolizado queda con un mayor número de aminoácidos con grupos R ácidos expuestos.

Con el conocimiento previo de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ , de la reacción enzimática tripsina-gluten, es posible conocer el grado de modificación reológica de la harina. El índice de gluten de la harina de la variedad Júpare pudo cambiarse hasta lograr que este indicador se asemeje al trigo Rayón. De los parámetros obtenidos con el farinógrafo resalta únicamente

el decaimiento en consistencia de las masas después de un reposo de 1.5 horas, registrándose un mayor efecto en la harina de trigo Júpare. De igual manera, de los datos obtenidos con el alveógrafo se advierte un aumento en la extensibilidad de las masas corroborando el hecho de que la enzima ha actuado con mayor afinidad hacia las gluteninas de las dos variedades de trigo.

Con esta investigación se ha avanzado en la demostración de la aplicación de una de las enzimas más abundantes del sistema digestivo de *Scomberomorus sierra* en la industria de elaboración de productos a base de trigo. Esta aplicación pudiese estar dirigida hacia las etapas de amasado ya que su acción sobre las proteínas del gluten ha quedado demostrada en las pruebas que simulan esta operación, además, con las investigaciones previas se conoce que la actividad de la enzima se ve favorecida en ambientes con pH cercanos al neutro como los que se presentan en esta etapa del proceso.

## RECOMENDACIONES

El estudio del mecanismo de reacción de la hidrólisis estudiada puede ser completada con análisis electroforéticos que permitan conocer el tipo de productos que se están generando e indagar en las posibilidades de interacciones que se efectúan después de detenida la hidrólisis.

Los estudios de las modificaciones en las propiedades reológicas pueden ser mejorados introduciendo otras variables a la reacción tal como temperatura.

La confirmación de la modificación de las propiedades reológicas de las masas bajo el efecto de la tripsina de estudio puede realizarse mediante el uso de técnicas de microscopía y/o criofractura.

Es recomendable también un estudio donde se investigue la aplicación en procesos industriales que añaden nuevas variables a la reacción como por ejemplo el efecto combinado de la fermentación y la hidrólisis en el proceso de panificación.

## REFERENCIAS

- A.A.C.C. 2001.** Approved Methods of Análisis. American Association of Cereal Chemist. St Paul, M.N. U.S.A.
- Adler, J. 1986.** Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Applied Science Publishers. Elsevier. 110-169.
- Aja, S.; Pérez, G.; Rosell, C. M. 2004.** Wheat Damage by *Aelia* spp. And *Eurygaster* spp.: Effects on Gluten and Water-Soluble Compounds Released by Gluten Hydrolysis. Journal of Cereal Science 39 (187-193).
- Anderson, O. D. ; Greene, F. C. ; Yip, R. E. ; Halford N. G. ; Shewry, P. L. ; Malpica, J. M. ; 1989.** Nucleotide Sequences of the Two High-molecular Weight Glutenin Genes from the D-Genome of a Hexaploide Bread Wheat *Triticum aestivum*. Nucleic Acid Research. 17(461).
- Atwell, W. A. 2001.** Wheat Flour Practical Guides for the Food Industry. Eagan Press Handbook Series. St Paul MN, U.S.A.
- Badui S. 1999.** Química de los Alimentos. 3<sup>ra</sup>. Edición. Editorial Alambra Mexicana. México. pp 123-210.
- Bañuelos, I. G. 2003.** Caracterización de las Proteínas del Gluten de los Trigos Cristalinos (*Triticum durum*) Cosechados en el Estado de Sonora y su Relación con Indicadores de Calidad. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora.
- Berger, M.; Grandvoinnet, P. de la Gueviere, J.; Bussiere, G. 1974.** Tests de Rheologie Pratique Utilisables pour L'appréciatio des Activités Protéolytiques. Annales de Technologie Agricole. 23(2): 233-239.

- Birschbach, N. F.; Henderson, W.; Willrett, D. 2004.** Enzymes: Tools for Creating Healthier and Safer Foods. *Food Technology* 58 (4): 20-26.
- Blanco, L. J. R. 1976.** *Catálisis Fundamentos y Aplicaciones Industriales*. Ed. Trillas. México, D. F.
- Bonet, A.; Caballero, P.; Gómez, M.; Rosell, C. 2005.** Microbial Transglutaminase as a Tool to Restore the Functionality of Gluten From Insect Damaged Wheat. *Cereal Chemistry*. 82 (4): 425-430
- Boggini, G. and Pogna, N. E. 1989.** The Breadmaking Quality and Storage Protein Composition of Italian Durum Wheat. *Journal of Cereal Science*. 9: 131-138.
- Boyacioglu, M. H. and D'Appolonia, B. L. 1994.** Durum Wheat and Bread Products. *Cereal Food World* 39 (3): 168.
- Bradford M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. *Anales Biochem*. 72: 248-254.
- Burgos-Hernández, A.; Farias, S. I.; Torres-Arreola, W.; Ezquerro-Brauer, J. M. 2005.** In Vitro Studies of Aflatoxin B<sub>1</sub> on Trypsin-Like Activity from the Hepatopancreas of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* xx (2005) xxx-xxx on line [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- Caballero, B. A. 2001.** Efecto de la Harina de Arroz sobre las propiedades Funcionales de Masas de Harina de Trigo. *Alimentación, Equipo y Tecnología* 163: 49-55.

- Caballero B. A. 2004.** Estudio de las Propiedades Funcionales del Trigo Hard Red Spring Procedente de E.E.U.U. y Canadá. Alimentación, Equipo y Tecnología 188: 63-69.
- Caballero, P.; Bonet, A.; Rosell, C.; Gómez, M. 2005.** Effect of Microbial Transglutaminase on the Rheological and Thermal Properties of Insect Damaged Wheat Flour. Journal of Cereal Science. Publicado por Elsevier Ltd.
- Cervantes, M.; Copado F.; Cervantes, M. 2; Soto, R.; Torrentera, N.; Figueroa, J. L. 2002.** Predicción del Contenido de Aminoácidos en el Trigo con Base en su Valor de Proteína. Interciencia. 27(12): 1-13
- Colot, V.; Bartels, D.; Thompson, R.; Flavell, R.; 1989.** Molecular Characterization of an Active Wheat LMW Glutenin Gene and its Relation to Other Wheat and Barley Prolamin Genes. Mol. Genet. 216: 81.
- Copeland, R. A. 2000.** Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Segunda edición. John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Cosbert, J. 1998.** Las Enzimas de la Buena Mesa Tecnología Enzimática Aplicada en la Panificación. Revista Pan 538: 66-86.
- Crozet, N.; Pastors, A. Petit, L. 1974.** Structure Submicroscopique des Fractions Protéiques du Gluten de ble Soumises a l'action de Différentes Enzymes Protéolytiques. Annales de Technologie Agricole. 23(2): 54-63
- D'Ovidio, R. and Masci S. 2003.** The Low Molecular Weight Glutenin Subunits of Wheat Gluten. Journal of Cereal Science 39: 321-339.



- De la Rosa, M. P.; Priego, R.; Huerta, R.; Toledano, A. M. y Medina, L. M. 2000.** Influencia de Aditivos Menores en las Propiedades Panarias de la Harina de Trigo. Alimentación, equipo y tecnología 1: 137-146.
- Erlanger B.F., Kokwski N. and Cohen W. 1961.** The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrate of Trypsin. Archs. Biochemistry Biophysical. 95:271-278.
- Ezquerro, J.; García, F.; Civera, R.; Haard, N. 1997.** pH-stat Method to Predict Protein Digestibility in White Shrimp (*Peneaeus vannamei*). Aquaculture. 157: 251-262.
- Ezquerro, J.; García, F., Carrillo O. 1998.** In Vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). Acuaculture. 163: 123-136.
- Fabriani, G. and Lintas, C. 1988.** Durum Wheat: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.
- FAO. 2004.** <http://www.fao.org/>
- Feillet, P.; Guinet, R.; Morel, M. H.; Rouau, X. 1996.** Capítulo 10. La Masa Formación y Desarrollo. La Panificación Aspectos Socioeconómicos, Materias Primas, Agentes de Fermentación, Tecnología, Calidad. Montagud Editores. Barcelona, España. Pp. 245-295.
- Félix, A. V. 2002.** Efecto de de la Adición de Proteasas del Tracto Digestivo de la Lisa (*Mugil cephalus*) Sobre las Propiedades Reológicas de la Harina de Trigo Cristalino (*Triticum durum*). Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- Gacesa, P.; Hubble, J. 1987.** Enzyme Technology. Open University Press Milton Keynes. Philadelphia. PA. USA.

- Galván, M.; Rubio, C. Frías, I. y Hardisson, A. 2001.** Optimización Reológica de una Harina Utilizando Proteasas. Alimentación, Equipo y Tecnología 163: 57-62.
- García-Carreño, F.; Navarrete, A.; Ezquerro, M. 1997.** Digestive Shrimp Proteases for Evaluation of Protein Digestibility in Vitro. I: Effect of Protease Inhibitors in Protein ingredients. Journal of Marine Biotechnology. 5: 36-40.
- Guadix A., Guadix E., Paez M., Gonzalez P., Camacho F. 2000.** Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteínas. Ars Pharmaceutica. 41(1): 79-89.
- Guizani, N.; Rolles, R. S.; Marshal, M. R.; Wei, C. I. 1991.** Isolation, Purification and Characterization of Trypsin from the Pyloric Ceca Of Mullet (*Mugil cephalus*). Comp Biochemistry Physiology. 98(4): 517-521.
- Haard, N. F. and Simpson, B. K. 2000.** Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood quality. Academic Press. USA.
- Haard, N. F. 1992.** A Review of Proteolytic Enzymes from Marine Organisms and Their Application in the Food Industry. Journal of Aquatic Food Products Technology. 1(1): 17-31.
- Hamer, R. J. and Hoseney, R. C. 1998.** Interactions: the Keys to Cereal Quality. Published by the American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, MN. USA.
- Hammes, G. G. 1978.** Principles of Chemical Kinetics. Academic Press. USA.
- Hernández, P.; Kanavouras, A.; Perry, K. W.; Gavara, R. 2003.** Development and Characterization of Biodegradable Films Made from Wheat Gluten Protein Fractions. Journal of agricultural and food chemistry. 51: 7647-7654.

- Hernández, p.; López, A.; Del Valle, V.; Almenar, E.; Gavara, R. 2004.** Mechanical and Barrier Properties of Glutenin films Influenced by Storage Time. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52: 79-83.
- Hjelmeland, K. et al. 1982.** Characteristics of Two Type Isoenzymes Isolated from the Artic Fish Capelin (*Mallotus villosus*). *Biochemistry & molecular biology*. 71(4): 557-562.
- Horcasitas, M. M. C. y Magaña, P. I. 2002.** Enzimas con Aplicación Industrial. *Avance y Perspectiva*. 21: 279-282.
- Hoseney, R. C. 1994.** Principles of Cereal Science and Technology. Second edition. Published by the American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, MN. USA.
- Hsu, H.W. Vavak D.L. Stterle L.D. and Miller G.A. 1977.** A Multienzyme Technique for Estimating Protein Digestibility. *Journal of Food Science*. 42(5): 1269-1273.
- <http://www.le.ac.uk>, 2004.
- <http://web.indstate.edu>, 2005.
- Hunter, R. J. 1981.** Zeta Potencial in Colloid Science Principles and Application. Academic Press, NY, USA.
- INEGI. 1997.** Instituto Nacional de Estadística, geografía e Informática. Datos de 1988-1997.
- Jackson, E. A.; Holt, L. M.; Payne, P. I.; 1983.** Characterization of High-Molecular-Weight Gliadin and Low-Molecular-Weight Glutenin Subunits of Wheat Endosperm by Two-Dimensional Electrophoresis and Chromosomal Localization of Their Controlling Genes. *Theor. Appl. Genet.* 66: 29-37.

- Kent, N. L.** 1984. Technology of Cereals. An Introduction for Students of Food Science and Agriculture. 3<sup>rd</sup>. Edition. Pergamon Press. Great Britain. Pp. 1-16.
- Kruger, J. E. ; Lineback, D.; Stauffer, C. E.** 1987. Enzymes and their Role in Cereal Technology. Published by the American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, MN. USA.
- Lehninger, A.** 1995. Bioquímica. 2da ed. NY. USA.
- León, A.; Rosell, C. M.; Benedito, de B. C.** 2003. A Differential Scanning Calorimetry Study of Wheat Proteins. European Food Research Technology. 217: 13-16.
- Lindahl, L.; Eliasson, A. C.** 1992. Influence of Added Enzymes on the Rheological Properties of a Wheat Flour Dough. Cereal chemistry. 69 (5): 542-546.
- Liu, C. Y.; Shepherd, K. W.; Rathjen, A. J.** 1996. Improvement of Durum Wheat Pastamaking and Breadmaking Qualities. Cereal Chemistry 73(2): 155-166.
- Madsen, J. S.; Qvist, K. B.** 1997. Hydrolysis of Milk Protein by a *Bacillus licheniformis* Protease Specific for Acidic Amino Acid Residues. Journal of Food Science. 62(3): 579-582.
- Mazorra-Manzano M.** 1995. Elaboración de Hidrolizados Proteicos Funcionales para Consumo Humano a Partir de Especies Marinas Subutilizadas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Tesis de Maestría.
- Miralbés, C.** 2000. Enzimas en Panadería. Montagud Editores. Barcelona, España.

- Montes M. y Magaña P. 2002.** Enzimas con Aplicación Industrial. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avance y Perspectiva 21: 279-282.
- Nielsen, P. M.; Petersen, D.; Dambmann, C. 2001.** Improved Method For Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. Journal of Food Science 66(5): 642-646.
- Nieto, G.; Cruz, L.; Ricque, M.; Ezquerro, M. 2005.** Técnica de Digestibilidad in Vitro de Ingredientes y Alimento para Camarón. Ciencia UANL. 8(1): 65-73.
- Olivas, B. H. 1999.** Actividad Proteolítica del Sistema Digestivo de la Sierra (*Scomberomorus concolor*). Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Olivas, B. H.; Ezquerro, B. J. M.; Rouzaud, S. O.; Pacheco, A. R. 2001 .** Protease activity and partial characterization of the trypsin-like enzyme in the digestive tract of the tropical sierra (*Scomberomorus concolor*). Journal of Aquatic Food Product Technology. 10 (4): 51-64.
- Olivas, B. H. 2001.** Purificación y caracterización de la tripsina del intestino de la lisa (*Mugil cephalus*) y evaluación de su capacidad hidrolítica sobre el gluten de trigo duro (*triticum durum*). Tesis de maestría. Universidad de Sonora.
- Pérez, G.; Bonet, A. Rosell, C. 2005.** Relationship Between Gluten Degradation by *Aelia* spp and *Eurygaster* spp. and Protein Structure. Journal of the Science of Food and Agriculture.85: 1125-1130.
- Pérez, S. L. A. y Luna, R. A. 1985.** Los Animales Comestibles de Importancia Comercial en Aguas Mexicanas. Ed. C.E.C.S.A. México, D.F.
- Perten, H. 1990.** Rapid Measurement of Wet Gluten Quality by the Gluten Index. Cereals Foods World. 35(4): 401-402.

- Pharmacia Fine Chemicals.** 1979. Affinity Chromatography: Principles and Methods.
- Pilling, M. J.; Seakins, P. W.** 1999. Reaction Kinetics. Oxford Science publications. Great Britain.
- Pitts, E.G., Rafalski, J.A. Hedgcoth, C.** 1988. Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of a genomic region for a low molecular weight glutenin. Nucleic Acids Res. 16(11): 376.
- Pomeranz, Y.** 1988. Wheat: Chemistry and Technology. Published by the American Association of Cereal Chemist, inc. St. Paul, Minnesota.
- Potus, J.; Drapron, R. Poiffait, A.** 1996. Capítulo 15. Las Enzimas. La Panificación Aspectos Socioeconómico, Materias Primas, Agentes de Fermentación, tecnología, Calidad. Montagud Editores. Barcelona, España.
- Quaglia, G.** 1991. Capítulo 7: Los Mejorantes. Ciencia y Tecnología de la Panificación. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Ravi, R.; Sai, R.; Haridas, P.** 2000. Influence of Additives on Rheological Characteristics and baking Quality of Wheat Flours. European Food Research Technology. 210: 202-208.
- Rharrabti, Y.; Elhani, S.; Martos-Nuñez, V.; García, M. L.** 2001. Protein and Lysine Content, Grain Yield, and Other Technological Traits in Durum Wheat under Mediterranean Conditions. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 49: 3802-3807.
- Rosell, C.; Aja, S; Bean, S.; Lookhart, G.** 2002. Effect of *Aelia* spp. And *Eurygaster* spp. Damage on Wheat Protein. Cereal Chemistry. 79(6): 801-805.

- SAGARPA. 2005.** [http:// www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx)
- SAGARPA. 2004.** <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Segel, I. H. 1976.** Chapter 4: Enzymes. Biochemical calculation. Second edition. John Wiley and sons. U.S.A.
- Serna, S. R.; 1996.** Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. AGT editor, S. A. México.
- Shigeru, H.; Shuryo, N. 1985.** Relationship of Hydrophobicity and Net Cxharge to the Solubility of Milk and Soy Proteins. Journal of Food Science. 50: 486-491.
- Simpson, B. K., Haard, N. F. 1984.** Trypsin from Greenland Cod (*Gadus ogac*) Isolation and Comparative Properties. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 79(4): 613-622.
- Tejeda A., Montesinos R., Guzman R 1995.** Bioseparaciones. Editorial Unison. Hermosillo Sonora.
- Thompson, R. D., Barteles, D. Harberd, N. P. 1985.** Nucleotid Sequence of a Gen from Chromosome 1D of Wheat Encoring a HMW-Glutenin Subunit. Nucleic Acids Res. 13: 6833.
- Van Dam, H. W.; Hille, J. D. R. 1992.** Yeast and Enzymes in Breadmaking. Cereal Foods World. 37 (3).
- Virtanen, S. A.; Autis, K.; Tenkanen, M. 2000.** Modification of Wheat Gluten with Oxidative Enzymes. VTT Symposium. 299-304.
- Weegels, P. L.; Hamer, R. J. 1992.** Improving the Breadmaking Quality of Gluten. Cereal Foods World. 37 (5): 379-385.

**Whitaker J. R.** 1994. Principles of Enzymology for the Food Science. 2<sup>nd</sup> ed. New York. Marcel Dekker Inc. Pp. 63-115.

**Zeta-meter, Inc.** 2003. <http://www.zeta-meter.com/>