

**IDENTIFICACION DE PRODUCTOS DE *TRITICUM*
AESTIVUM EN LAS PASTAS ALIMENTICIAS IV.
LIPOPROTEINAS SOLUBLES EN ETER
DE PETROLEO (*)**

POR

F. GARCIA OLMEDO, I. SOTELO y R. GARCIA FAURE

(*) El presente trabajo ha sido financiado en parte con una subvención (Grant FG-Sp-134) del U.S. Department of Agriculture, Foreign Research and Technical Programs Division.

Se ha establecido en trabajos anteriores (1-4) que, si bien el contenido en palmitato de sitosterol es un buen índice de la presencia de productos de *Triticum aestivum* en las pastas alimenticias, algunas variedades de dicha especie no podían ser detectadas debido a que su contenido en palmitato de sitosterol era similar al de las variedades de *T. durum*. La búsqueda de nuevas diferencias bioquímicas interespecíficas está justificada, no sólo por este hecho, sino también porque para obtener una buena aproximación en la determinación cuantitativa de productos de *T. aestivum* en las pastas alimenticias es necesario emplear más de un índice bioquímico, ya que todos ellos han de presentar cierta variabilidad intraespecífica.

En un estudio preliminar con muestras compuestas (5), se seleccionaron varias características bioquímicas que potencialmente podían ser empleadas para el fin propuesto. Entre éstas se incluyeron las lipoproteínas solubles en éter de petróleo, fracción que no había sido estudiada desde que Balls y col. (6) en 1942, la caracterizaron parcialmente en *T. aestivum*. En el presente trabajo, se ha abordado la caracterización y determinación cuantitativa de estas proteínas en variedades de las especies *T. aestivum* y *T. durum*. Con posterioridad a la terminación de nuestro estudio han aparecido dos trabajos realizados por Nimmo y col. (7) y Fisher y col. (8), comparando las proteínas solubles en éter de petróleo con determinados componentes de las globulinas. En los resultados que exponemos a continuación, hemos evitado incluir algunos puntos ya tratados por dichos investigadores.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Muestras.

Se emplearon harinas de 40 variedades de *T. aestivum* y 26 de *T. durum*. Estas fueron obtenidas por molienda normal en un molino experimental Buhler.

En los experimentos para estudiar la distribución de las lipoproteínas en el grano se obtuvieron fracciones correspondientes a las tres

triturasiones, las tres compresiones, harina remolida, tercerillas y salvado hoja.

Extracción y determinación cuantitativa de la lipoproteína soluble en éter de petróleo.

Se extrae la harina (20 gr.) con 80 ml. de éter de petróleo (p.e. 35°-60° C.) en una columna de 2,5 cm. de diámetro. Se elimina el disolvente en un rotoevaporador *in vacuo* a 40° C., y el extracto se redisuelve en éter y se transfiere a un tubo de centrifuga sin que el volumen final exceda de 1,5 ml. El tubo se coloca en un baño de hielo y se añaden tres volúmenes de cloruro de hidrógeno 1 N en etanol. Después de una hora, el precipitado formado se centrifuga a $5.000 \times g$; se lava dos veces con etanol frío y dos veces con éter de petróleo, y se deja secar. El residuo seco se disuelve en agua y se determina cuantitativamente por la reacción colorimétrica del biuret, usando albúmina de suero bovino cristalina como patrón.

Electroforesis.

El fraccionamiento por electroforesis se ha efectuado sobre geles de almidón preparados con tampón lactato de aluminio, pH 3,2, fuerza iónica 0,1, y urea 3 M (9). La inserción de muestra se hizo impregnando un cuadro de papel (10 mm. \times 3 mm., Whatman, núm. 3) con una solución acuosa de la proteína (3 mg./ml. para resolver los componentes principales y 25 mg./ml. para los componentes menores).

Después de la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de nigrosina (0,05 por 100 en ácido acético: agua 50:50 V/V) durante veintiuna horas. A continuación se lavaron con agua y se destiñeron en etanol del 80 por 100 durante cinco horas. Finalmente, se transfirieron a agua. Las medidas densitométricas se realizaron en un Chromoscan (Joyce & Loeb).

Cromatografía sobre Sephadex.

Se prepararon columnas de Sephadex G-100 y G-50 para el fraccionamiento de las proteínas descritas anteriormente. El tamaño de columna fue en ambos casos de $1,2 \times 50$ cm. Las eluciones se realizaron con tampón lactado de aluminio, pH 3,2, urea 3 M, o, alternativamente, con cloruro sódico al 3 por 100. La muestra se aplicó en un volumen de 0,5 ml. y se recogieron fracciones de 1 ml. con un flujo de 25 ml./hora.

En los experimentos de oxidación-reducción se empleó una columna de Sephadex G-25, $0,8 \times 5$ cm., para separar el beta-mercaptoetanol. La elución se hizo con tampón Tris (trishidroximetil aminoetano) pH 8,2, urea 3 M.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Fraccionamiento y caracterización de las lipoproteínas solubles en éter de petróleo.

La heterogeneidad de las proteínas precipitadas a partir de extractos con éter de petróleo de endospermo de *T. aestivum* fue ya sugerida por Balls y col. (6), quienes cristalizaron un componente con alto contenido en azufre, al que denominaron *purotionina*. Por electroforesis del precipitado bruto se obtienen al menos seis fracciones (fig. 2). Las dos principales migran casi juntas y se corresponden al parecer con la *purotionina* (7, 8). El fraccionamiento sobre Sephadex G-50 da lugar a dos fracciones: una que es prácticamente excluida y otra cuyo volumen de elución corresponde a un peso molecular aproximado de 10,000 (figura 1). La primera es retenida en el origen durante la electroforesis, no dando bandas detectables. La segunda incluye las bandas observadas en el extracto bruto, pues aunque las de menor movilidad electroforética poseen un peso molecular algo mayor y son eluidas algo antes que el par de la *purotionina*, no son separadas totalmente de éste (fig. 1). Con la columna de Sephadex G-100 se obtienen resultados similares que con el G-50, si bien la proporción de material excluido es menor y aparece algún material intermedio de peso molecular no definido. Esto significa que la primera fracción obtenida en el Sephadex G-50 es heterogénea. Cuando se precipita el extracto bruto a partir de etanol al 90 por 100 en las condiciones empleadas por Balls y col. (6), la proporción de material excluido del Sephadex G-50 aumenta tanto en el precipitado como en el sobrenadante, lo que interpretamos como una polimerización de las unidades de *purotionina* por intercambio sulfhidrilo-disulfuro, mientras están en medio acuoso a elevada concentración (fig. 2). Este fenómeno puede ser responsable en parte del contenido relativamente alto de cistina encontrado por Nimmo y col. (7) y Fisher y col. (8) en la fracción de mayor peso molecular.

Cuando la *purotionina* se somete a condiciones reductoras selectivas para los enlaces disulfuro (Tris, pH 8,2, Urea 3 M, 10 por 100 beta-

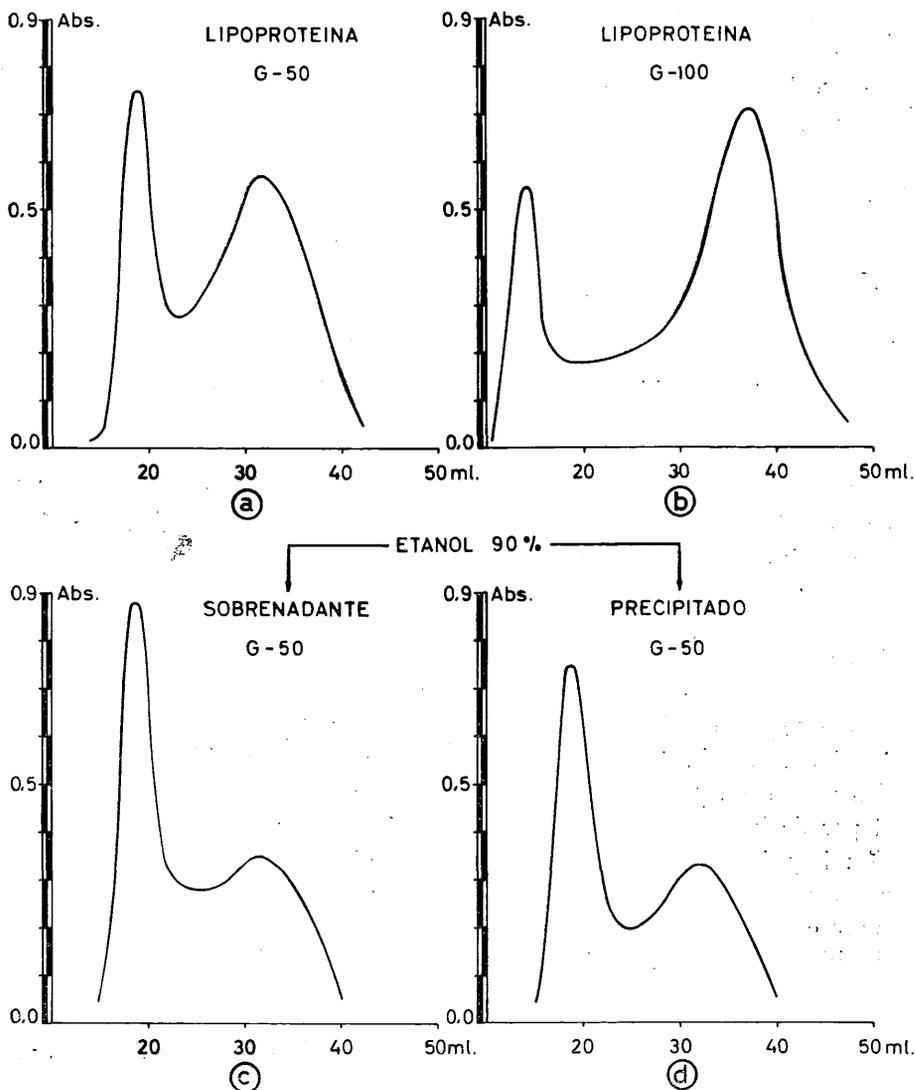


Fig. 1. — *a*) Fraccionamiento de la lipoproteína extraída por éter de petróleo sobre Sephadex G-50. *b*) Idem sobre Sephadex G-100. *c*) y *d*) Sobrenadante y precipitado que resulta de la purificación por precipitación con etanol.

mercaptoetanol) se produce una reducción cuantitativa e inmediata del par de bandas de la puortionina, que dan lugar a una sola banda de movilidad electroforética notablemente menor (fig. 3). En medio ácido (lac-

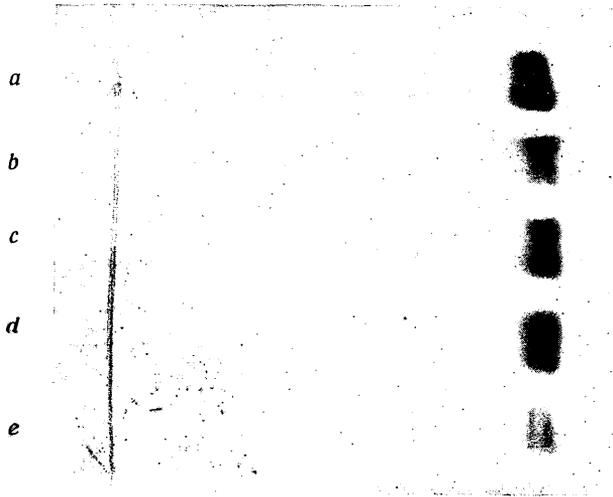


Fig. 2. — Fraccionamiento por electroforesis de: *a*) lipoproteína total extraída por éter de petróleo, *b*) fracción 35 de la figura 2-*a*, *c*) fracción 31, *d*) fracción 29, *e*) fracción 27.

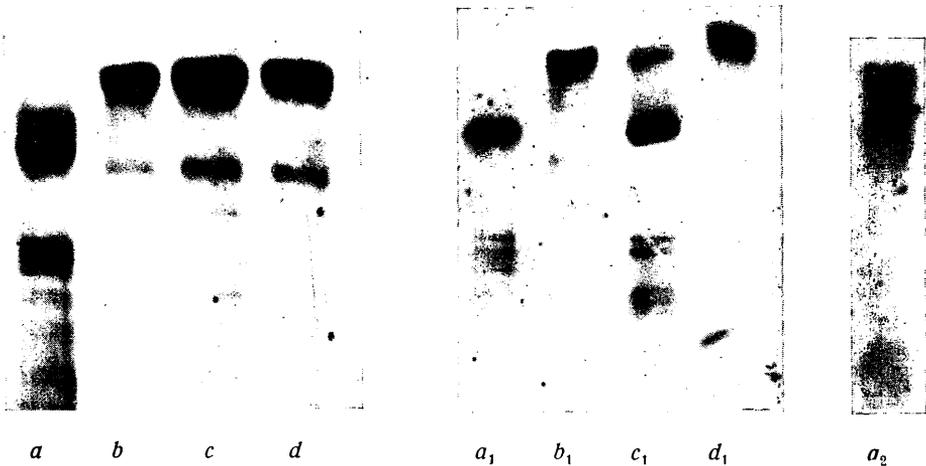


Fig. 3. — Electroforesis sobre gel de almidón, lactado de aluminio, pH 3,2 urea 3M, de purotionina bruta disuelta en: *a*) Tampón Tris, pH 8,2 urea 3M 10 % de beta-mercaptoetanol; tiempo, un minuto. *a*₁) Idem a las veinticuatro horas. *a*₂) Idem veinticuatro horas después de eliminar el beta-mercaptoetanol. *b*) Tampón Tris, pH 8,2 urea 3M; tiempo, un minuto. *b*₁) Idem a las veinticuatro horas. *c*) y *c*₁) Tampón lactato, pH 3,2 urea 3M, 10 % beta-mercaptoetanol al minuto y a las veinticuatro horas. *d*) y *d*₁) Tampón lactato de aluminio, pH 3,2 urea 3 M, al minuto y a las veinticuatro horas.

tato de aluminio, pH 3,2, Urea 3 M, 10 por 100 beta-mercaptoetanol) la reducción transcurre muy lentamente, y a las veinticuatro horas aún no se ha completado. Si se separa el beta-mercaptoetanol mediante una columna de Sephadex G-25, eluyendo con tampón básico (Tris, pH 8,2, Urea 3 M) se consigue la reoxidación de la *purotionina* después de veinticuatro horas al aire, dando las dos bandas primitivas (fig. 3). Estos resultados sugieren la posibilidad de que el par de bandas de la *purotionina* corresponda a dos formas oxidadas de la misma cadena polipeptídica.

Determinación del contenido total de lipoproteína.

El método descrito en la sección correspondiente permite la determinación cuantitativa $\left(\frac{S}{X} < 0,05\right)$ de la proteína total extraída con éter de petróleo. No se obtuvieron incrementos significativos en el rendimiento ni doblando el volumen de éter de petróleo empleado en la extracción, ni moliendo el endospermo a un mayor grado de finura.

Distribución de la proteína extraída por éter de petróleo en el grano de trigo.

Se ha estudiado la variación del contenido en lipoproteína con el rendimiento en la molienda. Se obtuvieron nueve fracciones de molienda y se ordenaron de menor a mayor contenido de cenizas. En la figura 4 se presentan los contenidos en lipoproteína y cenizas de las fracciones sucesivamente acumuladas frente a rendimiento en la molienda. Se observa una distribución uniforme de la lipoproteína en el endospermo, tanto en *T. durum* como en *T. aestivum* (fig. 4). Variaciones normales en el rendimiento en la molienda no afectan, por tanto, al contenido en lipoproteína de la harina.

Estudio de variedades individuales. Cantidad mínima de T. aestivum en una mezcla en función de la lipoproteína total.

Se ha determinado y fraccionado por electroforesis la lipoproteína extraída con éter de petróleo en 40 variedades de *T. aestivum* y 26 de *T. durum*. No se encontraron diferencias interespecíficas en las distribuciones electroforéticas de las variedades estudiadas. Por el contrario, la cantidad total de lipoproteína sí resultó ser una característica específica, siendo superior en *T. aestivum* que en *T. durum*. En el cua-

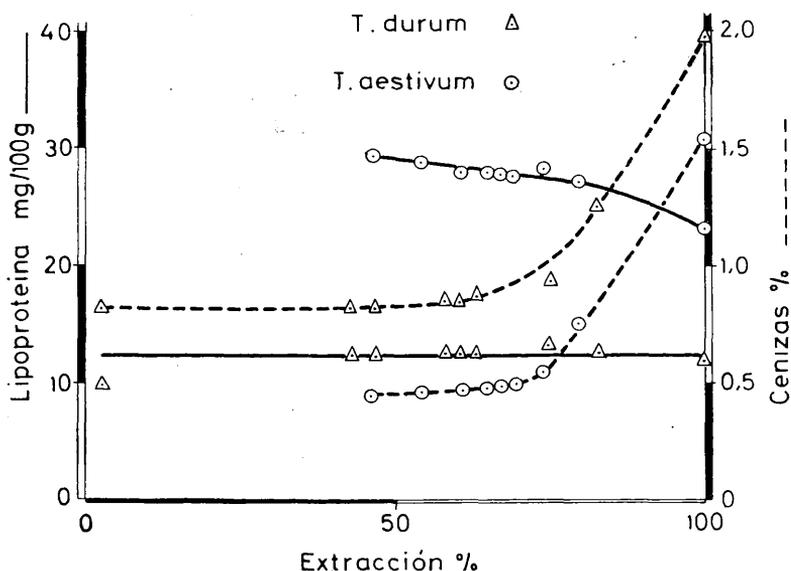


Fig. 4. — Variación del contenido en lipoproteína extraída por éter de petróleo con el grado de extracción en la molienda.

dro I se consignan los contenidos en lipoproteína de la harina de las 66 variedades estudiadas. Los valores obtenidos para *T. durum* no superan los 20 mg./100 gr. Sólo cuatro variedades de *T. aestivum* están comprendidas en el intervalo de *T. durum*, y 5 más están próximas a

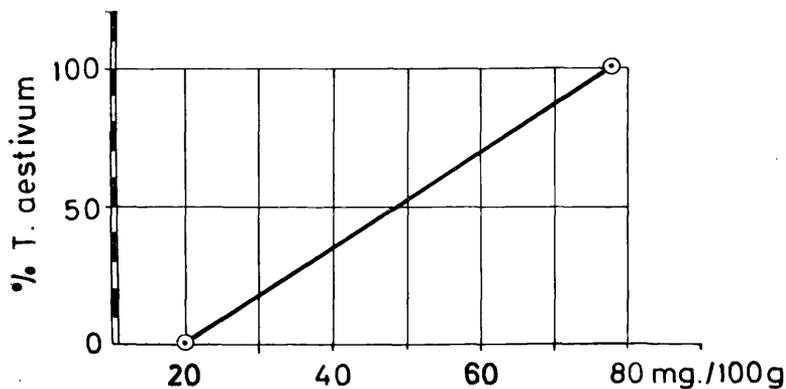


Fig. 5. — Contenido mínimo de *T. aestivum* en una mezcla en función de la lipoproteína extraída por éter de petróleo.

él. Los límites superior e inferior de los intervalos de variación de *T. durum* y *T. aestivum* se han confirmado analizando muestras de las variedades extremas procedentes de distintas zonas de cultivo. Tomando como base los valores superiores obtenidos para cada especie, puede calcularse la cantidad mínima de *T. aestivum* en función del contenido en lipoproteína (fig. 5). Contenidos por encima de los 20 mg./100 gr. indican la presencia de *T. aestivum*, pero niveles inferiores a éste no implican su ausencia. Sin embargo, las variedades no detectadas por este método sí lo son por el del palmitato de sitosterol (cuadro I), por lo que el uso conjunto de ambos índices resuelve el problema sin excepciones.

CUADRO I. — Contenido en lipoproteína (éter de petróleo) de variedades de *T. aestivum* y *T. durum*.

<i>T. aestivum</i>				<i>T. durum</i>	
Variedad	mg/100 g	Variedad	mg/100 g	Variedad	mg/100 g
"Dr. Mazet"	78	"Languedoc"	29	"Bxipi"	20
"Jeja"	51	"Restauração"	28	"Híbrido D"	20
"Negrillo"	49	"Cabezorro"	28	"Griffoni"	20
"Chamorro"	49	"Pirana"	28	"Farto"	19
"País"	48	"Autonomía"	28	"Ledesma"	18
"Impeto" (*)	47	"Mucaba"	27	"Kubanka"	17
"Líbero" (*)	46	"Dimas"	27	"Mindum"	15
"Navarro 105" (*)	45	"H. Red Winter A"	27	"Garigliano"	15
"F. Aurora"	41	"H. Red Winter B"	26	"Alcalá la Real" ..	14
"Cascón"	40	"Pané 2"	26	Mezcla comercial, USA (A)	13
"Ariana"	40	"Chaimite"	25	"Bidi 17"	12
"Mara" (*)	35	"Rieti"	23	"Oviachic"	12
"Rex"	35	"Pané 3"	23	"S. Capelli"	11
"Navarro 122" (*)	35	"Mocho"	23	"Speelmarz"	10
"Híbrido J-1"	35	"Mexicano"	23	"Amarelejo"	9
"Pané 247" (*)	34	"Colorado"	20	Mezcla comercial, USA (B)	9
"Candéal"	34	"Mort"	18	"Valenciano"	8
"Estrella"	32	"Roma"	18	"Wells"	8
"Lusitano"	30	"Ardica"	11	"Zaramek"	8
"Aragón 03"	29			"Leeds"	8
				"Alaga"	8
				"Lakota"	7
				"Capeiti"	7
				"Jerez 36"	5
				"Andalucía"	3

(*) Variedades no detectables por el método del palmitato de sitosterol.

RESUMEN

Se han caracterizado las lipoproteínas extraídas por éter de petróleo en el endospermo de *Triticum aestivum* y *Triticum durum*, empleando las técnicas de electroforesis y filtración molecular sobre Sephadex G-50 y G-100.

Se propone un método reproducible ($\frac{S}{\bar{X}} < 0,05$) para la determinación de la lipoproteína total. Se ha demostrado que el contenido en lipoproteína de la harina no es afectado por variaciones normales en el rendimiento de la molienda. Se ha determinado dicho contenido en 40 variedades de *T. aestivum* y 26 de *T. durum*. En esta última especie no se han encontrado valores que superen los 20 mg./100 gr., mientras que todas las variedades de *T. aestivum*, excepto cuatro, presentan valores superiores a éste (hasta 78 mg./100 gr.). Todas las variedades de *T. aestivum* con bajo contenido en palmitato de sitosterol lo tienen alto en lipoproteína (por encima de 30 mg./100 gr.) y viceversa. El uso de ambos parámetros permite la diferenciación interespecífica sin excepciones. Se calcula la cantidad mínima de *T. aestivum* en una mezcla en función del contenido en lipoproteína.

SUMMARY

"Identification of *Triticum aestivum* products in alimentary paste. IV. Petroleum ether soluble lipoproteins", by F. GARCÍA-OLMEDO, I. SOTELO and R. GARCÍA-FAURE, *Anal. Inst. Nac. Invest. Agr.* (Madrid), XVII, 2 (1968).

Total petroleum ether extractable protein is determined by a reproducible procedure ($\frac{S}{\bar{X}} < 0,05$).

Petroleum ether lipoprotein content of flour is not significantly effected by normal variations in milling yield. A survey of 40 *T. aestivum* and 26 *T. durum* varieties shows that lipoprotein content of the later does not exceed 20 mg./100 gr. All but 4 of the *T. aestivum* varieties have contents higher than that (up to 78 mg./100 gr.).

All *T. aestivum* varieties with low sitosteryl palmitate content have high lipoprotein (above 30 mg./100 gr.) and viceversa. Consequently, using both biochemical parameters no ambiguity is left in the interspecific differentiation.

Minimum amount of *T. aestivum* in a mixture is calculated as a function of lipoprotein content.

Further characterization of the pet. ether extracted protein by electrophoresis and gel filtration did not show consistent interspecific differences.

(Los autores desean agradecer la valiosa asistencia técnica de A. M. Mingo Castel.)

BIBLIOGRAFIA

1. GARCÍA FAURE, R.; GARCÍA OLMEDO, F.; SOTELO, I.; SALTO, M.: *Boletín I.N.I.A.*, 53, 395, 1965.
2. GARCÍA OLMEDO, F.: *Boletín I.N.I.A.*, 53, 409, 1965.
3. GARCÍA FAURE, R.; GARCÍA OLMEDO, F.; VALLEJO, J. M.: *Tecn. Mol.*, 19, 4, 114, 1968.
4. GARCÍA FAURE, R.; GARCÍA OLMEDO, F.; VALLEJO, J. M.: *J. Sci. Food Agric.*, 19, 6, 322, 1968.
5. GARCÍA FAURE, R.: *3rd Annual Report*, March 1967, U.S.D.A. Proyect E25-AMS-7, Grant FG-Sp-134.
6. BALLS, A. K.; HALE, W. S.; HARRIS, T. H.: *Cereal Chem.*, 19, 279, 1942.
7. NIMMO, C. C.; O'SULLIVAN, M. T.; BERNARDIN, J. E.: *Cereal Chem.*, 45, 28, 1968.
8. FISHER, N.; REDMAN, D. G.; ELTON, G. A. H.: *Cereal Chem.*, 45, 48, 1968.