

19. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HARINAS DE TRIGO COMUN (*TRITICUM VULGARE*) EN SEMOLAS Y PASTAS ALIMENTICIAS

19.1. Principio.

El método se basa en la detección y cuantificación de un componente designado CM, del extracto cloroformo-metanol del endospermo de trigo o de productos derivados de él, cuyo control genético radica en el cromosoma 1D de *Triticum Vulgare* y que por tanto no se encuentra en *T. durum*.

El mencionado extracto, al que se designa proteína CM, se fracciona por electroforesis sobre gel de almidón, y el componente CM, se estima visualmente o se cuantifica densitométricamente.

19.2. Material y aparatos.

19.2.1. Balanza analítica.

19.2.2. Equipo de electroforesis.—Fuente de tensión, corriente continua 0-500 v, -100 mA. Placas de vidrio de 20 x 20 cm marcos de plástico de 20 x 20 cm exterior, de 18 x 18 cm interior y de 3 mm de espesor. Depósitos de electrodos de 20 x 10 x 10 centímetros.

19.2.3. Densitómetro de reflexión, en el caso de que se quiera cuantificar.

19.2.4. Tubos de 8 x 50 mm o similar, con tapones de corcho.

19.2.5. Gradilla.

19.2.6. Dos placas de acero inoxidable de 5 x 7 x 1 cm o dimensiones similares.

19.2.7. Jeringa de vidrio de 1 ml de capacidad.

19.2.8. Capilares de 10 cm de largo.

19.2.9. Placa de porcelana con pocillos.

19.2.10. Probetas de 100 ml y 1.000 ml.

19.2.11. Vasos de 500 ml y de 1.000 ml.

19.2.12. Baño de agua con termómetro.

19.2.13. Cubeta de plástico de al menos 25 x 25 x 5 cm.

19.3. Reactivos.

19.3.1. Cloroformo.

19.3.2. Metanol.

19.3.3. Éter dietílico libre de peróxidos.

19.3.4. Etanol del 70 por 100.

19.3.5. Papel Albet número 502, o similar, y papel de filtro.

19.3.6. Almidón hidrolizado para electroforesis Connaught o similar.

19.3.7. Tampón lactato de aluminio-ácido láctico, 0,1 N, pH 3,2 en urea 3 M.—Diluir 4,9 g de lactato de aluminio en agua destilada, añadir 10,6 ml de ácido láctico purísimo y 180 g de urea, completando hasta 1 litro con agua destilada. Este tampón sirve tanto para el gel de almidón como para los compartimentos de los electrodos.

19.3.8. Solución de nigrosina soluble en agua al 0,5 por 100 en acético-agua (1/1) (v/v).

19.3.9. Gel de almidón.—Mezclar 24,5 g de almidón y 180 ml de tampón en un vaso de 500 ml, agitar suavemente con una varilla en baño de agua a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta que gelifique (2-3 minutos). El gel caliente se vierte sobre una placa de vidrio a la que se ha superpuesto un marco de plástico de las mismas dimensiones que la placa y de 3 mm de espesor, extender uniformemente con la varilla y, finalmente, prensar suavemente con una placa de vidrio de las mismas dimensiones sin dejar burbujas. Dejar reposar durante al menos 3 horas.

19.4. Procedimiento.

19.4.1. Extracción y preparación para electroforesis de la proteína CM.—Pesar 50 mg de harina, semola, grano o pasta alimenticia y transferirlos a un tubo de 8 x 50 mm o similar. El grano y la pasta se aplastan por presión entre dos placas de acero inoxidable antes de ser transferidas al tubo. Añadir aproximadamente 0,5 ml de éter dietílico en cada tubo y dejar reposar durante no menos de 30 minutos, agitando ocasionalmente. Después de la última agitación se deja sedimentar por gravedad y el sobrenadante se elimina con la ayuda de una jeringa. El disolvente residual se deja evaporar a la temperatura ambiente o en una estufa a  $35^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Agregar aproximadamente 0,25 ml de cloroformo-metanol (2/1) (v/v) a cada tubo, tapar y dejar reposar durante 2 horas, agitando ocasionalmente.

Después de la última agitación, dejar sedimentar por gravedad y transferir el extracto sobrenadante con un capilar a una pieza de papel Albet número 502 o similar, de dimensiones 3 x 10 mm. Con el capilar se satura el papel, que se deja evaporar antes de una nueva adición (ver 19.4.1), repitiendo la operación hasta agotar el sobrenadante. Para esta operación, las piezas de papel a las que se van a transferir las distintas muestras se depositan en distintos pocillos de una placa de porcelana o similar. Se recomienda realizar la transferencia entre 10 y 20 muestras simultáneamente.

19.4.2. Electroforesis sobre gel de almidón de la proteína CM.—Separar cuidadosamente una de las placas de vidrio con la ayuda de una espátula y recubrir la superficie expuesta del gel con un plástico fino. Marcar en dicha superficie una fila de ranuras (1 cm de largo cada una) a 3 cm de uno de los

bordes del gel. Alojar en dicha ranura las piezas de papel Albet número 502 o similar que portan las muestras, previamente impregnadas con tampón. Disponer el gel horizontalmente apoyado sobre las cubetas de electrodos y establecer la conexión eléctrica mediante puentes de papel de filtro (20 papeles de dimensiones apropiadas superpuestos).

#### 19.5. Interpretación de resultados.

19.5.1. Detección de trigo exaploide.—La electroforesis del extracto CM de trigo exaploide («T. Vulgare») muestra tres bandas, designadas CM1, CM2 y CM3, mientras que la de trigo tetraploide («T. durum») sólo presenta las CM2 y CM3.

El trigo exaploide se detecta en una mezcla por la aparición de CM1 en el perfil electroforético. Para el tamaño de muestra anteriormente propuesto, CM1 se detecta en mezcla de 10-15 por 100. Usando muestras de tamaño doble, el umbral de detección se reduce proporcionalmente.

19.5.2. Cuantificación de trigo exaploide en mezclas.—La acotación del porcentaje de «T. Vulgare» en una mezcla se basa en la cuantificación de la relación CM1, CM2 y en la estimación de la variabilidad intraspecifica de CM1 y CM2.

En la figura 1-A se presenta la forma de acotar gráficamente el porcentaje de trigo exaploide en mezclas basándose en la medida de la relación CM1, CM2 mediante densitometría de reflectancia con luz de 620 nm. En la figura 1-B se representa la variación de la amplitud de la acotación según el valor obtenido.

Una estimación semicuantitativa, más imprecisa que la anterior, puede obtenerse por comparación visual del problema con una serie de mezclas conocidas que pueden incorporarse al mismo gel.

#### 19.6. Observaciones.

19.6.1. Las condiciones de electroforesis son 10 V/cm durante seis horas.

19.6.2. La tinción se realiza con nigrosina al 0,05 por 100 en acético.—Agua (1/1) (v/v) durante 14-18 horas en una cubeta de plástico de dimensiones apropiadas, dejando el gel con la cara opuesta a la de inserción hacia arriba.

19.6.3. La decoloración del fondo se realiza en pocos minutos con etanol al 70 por 100.

19.6.4. Cuando se manejan 10-20 muestras, después de una transferencia se devuelve el capilar al tubo y se pasa a la muestra siguiente. Cuando se llega a la muestra final, ya se ha evaporado la primera y está en condiciones de una nueva transferencia.

#### 19.7. Referencias.

1. B. García Faure y F. García Olmedo. «A new Method for the Estimation of Common Wheat in Pasta Products». Lebensm. Wis. U. Technol. Vol. 2. 1969.

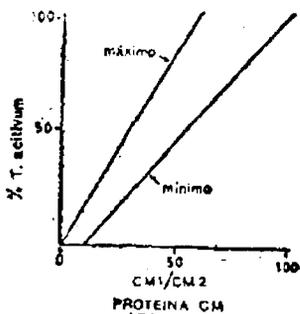


Fig. 1-A

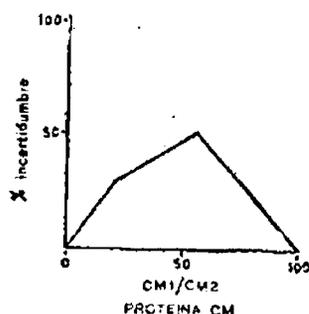


Fig. 1-B

## 20. DETECCIÓN DE HARINAS DEGRADADAS POR EL ATAQUE DE PLANTATÓMIDOS

### 20.1. Principio.

Se detecta la degradación de la calidad panadera de la masa de harina mediante la determinación del exceso de actividad proteolítica.

### 20.2. Material y aparatos.

Como en 14.2.

### 20.3. Reactivos.

Como en 14.3.

### 20.4. Procedimiento.

Como el 14.4 con las siguientes modificaciones:

20.4.1. El número de piezas de masa serán seis.

20.4.2. Transcurrido el tiempo normal de 26 minutos del comienzo de amasado, extraer tres piezas de la cámara del alveógrafo y analizarlas obteniendo sus correspondientes curvas. El resto de las piezas se analizan sobre el mismo papel después de un período de reposo de tres horas.

Si alguno de los alveolos o curvas fuera claramente anormal debe desecharse la curva.

### 20.5. Expresión de los resultados.

Si existe una actividad proteolítica excesiva, la segunda serie de curvas presentará menor extensibilidad y tenacidad, siendo mayor la diferencia entre ellas, a mayor actividad.

Cuantificar esta actividad calculando la degradación de W y G en la forma siguiente:

Calcular los valores de estos índices por separado para la primera serie de curvas (con tiempo de reposo normal)  $W_0$  y  $G_0$  y para la segunda (con tiempo de reposo de 3 horas)  $W_1$  y  $G_1$ .

$$\text{Porcentaje de degradación de } W = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \cdot 100$$

$$\text{Porcentaje de degradación de } G = \frac{G_0 - G_1}{G_0} \cdot 100$$

### 20.6. Referencias.

1. Harinas. Actividad proteolítica. H-80277-A. Ministerio del Aire