



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DETERIORO BIOQUIMICO  
DURANTE EL SECADO DE TRIGO

CECILIA ELENA LUPANO

TESIS

- 1986 -



El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Bioquímicas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Doctora María Cristina Añón.

*A mis padres*

*A mi hermano*

## AGRADECIMIENTOS

A la Doctora María Cristina Añón por haber posibilitado mi iniciación en la investigación, brindándome su guía, dedicación y estímulo durante la dirección de este trabajo.

Al Doctor Alfredo Calvelo por haberme permitido realizar tareas de investigación en este Centro.

A la Señora Lilian Marta Macías por su dedicación en la copia dactilográfica de esta tesis.

A mis compañeros del CIDCA por su amistad y su apoyo.

A la Cátedra de Química Biológica y a los alumnos que he tenido en estos años por haberme brindado su amistad y haber contribuido a mi formación.

Al personal del Laboratorio Técnico de la Estación Regional Agropecuaria INTA de Marcos Juárez por su colaboración en la realización de los ensayos de calidad panadera.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las becas que permitieron la concreción de este trabajo.



"...Luego, agregó:

- Ve y mira nuevamente a las rosas. Volverás para decirme adiós y te regalaré un secreto."

El principito, Antoine de Saint-Exupéry





# INDICE



	Pág.
<b>INTRODUCCION</b>	
<b>1. Importancia del trigo</b>	1
<b>2. El grano de trigo</b>	1
2.1 Partes de la semilla en relación a su capacidad germinativa	2
2.1.1 El embrión	3
2.1.2 La aleurona	4
2.1.3 El endosperma almidonoso	5
2.2 Origen y función de las proteínas de almacenamiento	6
<b>3. La tecnología del trigo</b>	8
3.1 Las proteínas de la harina	8
3.2 El gluten en la panificación	9
3.3 Características de las proteínas de almacenamiento en relación a las propiedades del gluten	11
3.1.1 Composición de aminoácidos	11
3.3.2 Gliadinas	12
3.3.3 Gluteninas	13
3.4 Efecto del amasado sobre las proteínas de la harina	15
<b>4. Pérdidas post-cosecha</b>	16
4.1 Deterioro sufrido por el grano como consecuencia del secado	16
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>1. Muestra empleada</b>	19
<b>2. Procesamiento</b>	19
2.1 Humectación y secado de las semillas	19
2.1.1 Humectación	19
2.1.2 Secado	19

	Pág.
2.2 Separación del embrión	21
2.3 Separación del endosperma	23
2.4 Obtención de harina	23
<b>3. Extracción de proteínas</b>	23
3.1 De embrión	23
3.2 De endosperma	23
3.3 De harina	24
3.4 De masa	24
3.4.1 Preparación de la masa	24
3.4.2 Extracción	25
<b>4. Determinaciones analíticas</b>	25
4.1 Contenido de humedad de las semillas	25
4.2 Concentración de proteína soluble	26
4.3 Determinación de proteína total	26
<b>5. Electroforesis</b>	26
5.1 Soluciones utilizadas	26
5.1.1 Solución madre de acrilamida-bisacrilamida	26
5.1.2 Buffer del gel de "stacking"(apilador)	27
5.1.3 Buffer del gel separador	27
5.1.4 Buffer de corrida	27
5.1.5 Buffer de muestra	28
5.1.5.1 Con mercaptoetanol (ME)	28
5.1.5.2 Sin mercaptoetanol	28
5.1.6 Solución fijadora	28
5.1.7 Solución colorante	28
5.1.8 Solución decolorante	29
5.1.9 Persulfato de amonio	29
5.2 Preparación del gel	29
5.2.1 Gel separador	29

	Pág.
5.2.2 Gel de "stacking"(apilador)	29
5.3 Preparación de las muestras	30
5.4 Patrones de peso molecular	30
5.5 Equipos utilizados	30
5.6 Condiciones de corrida	31
<b>6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</b>	<b>31</b>
6.1 Aparato utilizado	31
6.2 Calibración del equipo	31
6.2.1 Calibración de temperatura	31
6.2.2 Cálculo del calor de transición, $\Delta H$	33
6.3 Preparación de las muestras	34
6.3.1 Embriones de trigo	34
6.3.2 Harina de trigo	34
6.3.3 Gluten de trigo	34
6.3.4 Masa de harina de trigo	35
6.4 Determinación de la energía de activación y del factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius	35
6.4.1 Método dinámico	35
6.4.2 Método isotérmico	36
<b>7. Ensayos de calidad panadera</b>	<b>37</b>
7.1 Ensayo de micropanificación	37
7.1.1 Ingredientes	37
7.1.2 Panificación	38
7.2 Ensayo de sedimentación de Zeleny	38
7.3 Ensayos con gluten	39
7.3.1 Determinación de gluten húmedo y gluten seco	39
7.3.2 Efecto del SDS y del ME en la estructura del gluten	39
<b>8. Ensayos de germinación</b>	<b>39</b>

	Pág.
8.1 Efecto de las condiciones de secado sobre la <u>via</u> bilidad de las semillas	39
8.2 Efecto del NaF sobre semillas calentadas y no <u>ca</u> lentadas	40
8.2.1 Medios utilizados	40
<b>9. Ensayos de respiración</b>	40
9.1 Aparato utilizado	40
9.2 Procedimiento y condiciones del ensayo	41
9.3 Cálculos	41
9.4 Soluciones utilizadas	42
<b>10. Tratamiento estadístico</b>	42
 <b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
<b>EFFECTO DEL SECADO SOBRE LAS PROTEINAS DE EMBRION DE TRIGO</b>	43
<b>1. Desnaturalización térmica de las proteínas de <u>em</u> <u>brión</u></b>	44
1.1 Determinación de la energía de activación y del factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius	49
1.2 Cálculo de los parámetros termodinámicos del <u>esta</u> do activado	54
1.3 Cinética del proceso estudiado	57
<b>2. Alteraciones sufridas por las proteínas de embrión de trigo como consecuencia del secado</b>	59
2.1 Variación del $\Delta H$ de desnaturalización con las condiciones de secado	59
2.1.1 Determinación de la temperatura del embrión <u>pa</u> ra cada condición de secado	62
2.2 Modificaciones producidas por el secado de la <u>se</u> milla sobre la estructura de las proteínas del	

	Pág.
embrión	65
2.2.1 Alteraciones en la solubilidad de las proteínas	65
2.2.2 Caracterización de algunas especies proteicas presentes en el medio de extracción	70
2.2.3 Efecto diferencial del tratamiento térmico sobre diferentes especies proteicas del embrión	73
<b>3. Cinética de insolubilización de las proteínas de em brión por efecto de la temperatura</b>	79
 <b>ALTERACIONES EN EL ENDOSPERMA DE TRIGO COMO CONSECUE<u>N</u> CIA DEL SECADO</b>	
<b>1. Ensayos de calidad panadera</b>	82
1.1 Prueba de micropanificación	82
1.2 Ensayo de Zeleny	84
1.3 Determinación de gluten húmedo y gluten seco	85
<b>2. Alteraciones en las proteínas del endosperma</b>	86
2.1 Efecto del secado de la semilla sobre la solubili <u>i</u> dad de las proteínas	86
2.1.1 En harina	87
2.1.2 En masa	88
2.2 Caracterización de diferentes especies proteicas presentes en el medio de extracción	89
2.3 Efecto del amasado sobre las proteínas de la hari <u>i</u> na	95
2.4 Modificaciones producidas en las proteínas como con <u>u</u> secuencia del tratamiento térmico de las semillas	96
2.4.1 En harina	96
2.4.2 En masa	101
<b>3. Comportamiento de las proteínas de la harina en en<u>u</u> sayos calorimétricos</b>	105



	Pág.
3.1 Ensayos con harina	105
3.2 Ensayos con gluten	108
3.3 Ensayos con masa	110
4. Uniones que intervienen en la estructura del <u>glu</u> ten	114
<b>MODIFICACIONES METABOLICAS DE LAS SEMILLAS DEBIDAS AL SECADO</b>	
1. Efecto de las condiciones de secado sobre la <u>via</u> bilidad de las semillas	119
1.1 Ensayos de germinación	120
1.1.1 Determinación de la energía de activación	123
2. Diferencias en el comportamiento metabólico <u>en</u> tre semillas calentadas y no calentadas	127
2.1 Efecto del calentamiento de la semilla sobre distintas vías metabólicas	127
2.1.1 Condiciones para la utilización de uno u otro sustrato respiratorio	127
2.1.2 Efecto del calentamiento de la semilla sobre la velocidad de producción de CO <sub>2</sub> y consumo de O <sub>2</sub> partiendo de distintos sustratos	132
2.2 Efecto del calentamiento de la semilla sobre su susceptibilidad al NaF como inhibidor de la <u>ger</u> minación	137
<b>TRATAMIENTO TERMICO. INTERRELACION PROTEINA-CALIDAD</b>	142
<b>CONCLUSIONES</b>	158
<b>APENDICE</b>	
<b>DESARROLLO DE UN ENSAYO PARA DETECTAR DETERIORO POR SECADO</b>	

	Pág.
<b>1. Introducción</b>	160
<b>2. Fundamento del método</b>	160
<b>3. Materiales y métodos</b>	160
3.1 Reactivos	160
3.1.1 Medio de incubación	160
3.1.2 Medios empleados para tratamientos previos a la incubación	161
3.2 Semillas empleadas	161
3.2.1 Semillas secadas en distintas condiciones	161
3.2.2 Semillas de otros cultivares y cosechas calentadas y no calentadas	161
3.2.3 Semillas no viables	162
3.3 Procedimiento	162
3.4 Ensayos de germinación	164
<b>4. Resultados</b>	164
4.1 Ensayos realizados en semillas de la misma <u>va</u> riedad secadas en distintas condiciones	164
4.1.1 Diferencias debidas a las condiciones de <u>seca</u> do	164
4.1.2 Correlación con los ensayos de germinación	169
4.2 Ensayos realizados con semillas de distintas <u>va</u> riedades calentadas y no calentadas	171
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	176



## INTRODUCCION



## 1. IMPORTANCIA DEL TRIGO

No existe acuerdo sobre el tiempo y el lugar exactos del origen del trigo y de sus primeros cultivos, pero se sabe que desde épocas remotas tuvo un papel preponderante en la alimentación del hombre. Después de un período de progreso lento, el trigo pasó a ser comúnmente considerado como el mejor de los cereales comestibles, y la disponibilidad de trigo como alimento fue considerada un signo de alto nivel de civilización. La calidad del trigo para la producción de pan mejoró, y el pan hecho de una u otra forma llegó a ser un alimento importante para el mundo occidental. El trigo se convirtió en un símbolo mundial, que refleja la situación alimentaria de muchos millones de personas, y un índice de la condición económica y de la estabilidad política. Las naciones con un adecuado abastecimiento de trigo se han considerado por siglos, en buenas condiciones de nutrición (Shellenberger 1978).

En la Argentina se produjeron en promedio, en las campañas 1979/80 - 1983/84, 29.712 miles de toneladas de cereales por año, correspondiendo el mayor volumen al período 1982/83 (32.957 miles de toneladas). El 95% de dicha producción lo constituyen el maíz, el sorgo granífero y el trigo.

En este período se exportaron unos 17 millones de toneladas por año, lo que equivale a 1.400 millones de dólares, datos que indican claramente su importancia en la balanza comercial del país.

## 2. EL GRANO DE TRIGO

El trigo, como otros cereales, produce frutos secos de una sola semilla, que no se abren al alcanzar la madurez. La

semilla está compuesta por un germen o embrión, y un endosperma rodeado por una epidermis nucelar y una cubierta. Esta última está estrechamente unida a la cubierta del fruto o pericarpio, que envuelve la semilla. El endosperma comprende el endosperma almidonoso y la capa de aleurona. La estructura del grano entero es importante como determinante del movimiento de la humedad durante el secado y el acondicionamiento del grano (MacMasters y col. 1978).

El trigo se utiliza normalmente como semilla, y en el caso de trigo pan, para la obtención de productos de panadería.

### **2.1 Partes de la semilla en relación a su capacidad germinativa**

Una vez terminado el período de latencia, el estímulo que inicia la germinación parece ser la imbibición de agua, a una temperatura adecuada, por las células de la semilla parcialmente deshidratada. La mayoría de las semillas en este estado, en el que el contenido de humedad se ha reducido hasta llegar a un 10% o menos, se mantienen viables y pueden responder muy rápidamente a una exposición al agua, reactivándose en minutos muchos de los procesos metabólicos que se habían detenido o tenían lugar a una velocidad muy reducida antes de la imbibición. Una pérdida en la integridad de organelas celulares o macromoléculas, tales como ácidos nucleicos o proteínas, mientras la semilla está deshidratada, podría conducir a una falta de coordinación de los procesos iniciados durante la absorción de agua, dando lugar a una eficiencia de germinación menor, por ejemplo, pérdida de vigor o de viabilidad de la semilla (Bray 1979).

**2.1.1 El embrión:** El embrión o germen está ubicado externamente, en un extremo de la semilla. Inmediatamente antes de la germinación, el embrión del grano de trigo maduro constituye una planta joven ya diferenciada en rudimentarias raíces, tallo y hojas. Un grano bien desarrollado de trigo pan contiene un embrión que representa en promedio el 2-3% en peso del grano y que tiene un contenido de humedad de alrededor del 10% en la madurez. En este estado deshidratado la síntesis de DNA, RNA y proteína en los tejidos del embrión ha cesado y la actividad metabólica es mínima (Bray 1979).

Aunque el embrión de cereal seco no sintetiza ni ácidos nucleicos ni proteínas, se ha encontrado que los sistemas enzimáticos involucrados en la síntesis de dichas macromoléculas están presentes en el embrión viable. En extractos de embriones de trigo seco se ha detectado actividad de DNA polimerasa a un bajo nivel (Mory y col. 1975); además, el embrión de trigo viable contiene tres clases de RNA polimerasa (Jendrisak y Becker 1973, Guilfoyle 1981), ribosomas, RNA de transferencia, enzimas activadoras de aminoácidos y factores de iniciación y elongación (Weeks 1981, Bray 1979), que son todos parte de un sistema activo de síntesis de proteínas. Los ribosomas aparecen como monosomas (Marcus y Feeley 1966), y esta falta de polisomas indica que el sistema de síntesis de proteínas del embrión seco es inactivo in vivo. Hay resultados que sugieren que uno de los factores que controlan la iniciación de la síntesis de proteínas en el embrión durante la germinación, podría ser el pegado de RNA mensajeros de larga vida a los ribosomas, paso que requeriría energía (Bray 1979). Bajos niveles de ATP en el embrión disminuirían la velocidad de síntesis de proteínas, y se ha demostrado que en embriones de trigo viables el nivel de ATP aumenta



rápidamente durante los primeros 30 minutos de germinación (Obendorf y Marcus 1974), tiempo en el que el contenido de polirribosomas del embrión de trigo muestra también un rápido incremento (Marcus y col. 1966, Spiegel y Marcus 1975). Se ha observado además que los contenidos bajos de ATP están asociados con una pérdida de vigor de la semilla (Bray 1979).

En cuanto a la replicación del DNA, ciertas semillas pueden germinar y alcanzar cierto grado de desarrollo posterior sin replicación del DNA, como se observó en semillas irradiadas con dosis masivas de rayos  $\gamma$  o de rayos x. El proceso de replicación del DNA está lesionado en forma irreversible en esas semillas y, sin embargo, hay crecimiento del embrión (alargamiento celular sin división), emergencia, transcripción de RNA y síntesis de proteínas (Labouriau 1983).

**2.1.2 La aleurona:** La aleurona es la capa más externa del endosperma, generalmente tiene una célula de espesor, y rodea casi completamente al grano sobre el endosperma almidonoso y el embrión (MacMasters y col. 1978). La aleurona de las semillas de cereal es un tejido secretorio que tiene dos funciones principales durante la germinación: es la fuente de enzimas para la movilización de las reservas de nutrientes del endosperma, y la principal fuente de minerales para el desarrollo del embrión. Las células de la aleurona también liberan azúcares y aminoácidos, y movilizan su propio metabolismo de un estado de quiescencia a uno de actividad completa. Estos cambios están en gran medida bajo el control directo o indirecto del embrión (Tomos y Laidman 1979).

**2.1.3 El endosperma almidonoso:** El grano de cereal maduro representa un reservorio en el cual se ha volcado la capacidad total de la planta de acumular nutrientes y sintetizar reservas. Aunque el endosperma es comúnmente considerado como el sitio de almacenamiento primario de alimentos, debería verse como el tejido de almacenamiento terciario del grano de ce-real. Las reservas primarias de alimentos, que inician la germinación, están en el embrión y comprenden lípidos, proteínas y algo de almidón. El tejido de almacenamiento secundario es la aleurona, que responde a la estimulación hormo-nal con la rápida proliferación del retículo endoplásmico y la síntesis de sus propias reservas, muy lábiles, y de enzi-mas amilolíticas y proteolíticas destinadas a hidrolizar las principales reservas (terciarias) en las células del endos-perma (Simmonds 1978).

En el germen y en la aleurona hay gotas de lípidos que son fácilmente degradados para dar los esqueletos carbo-nados y la energía para la síntesis de aminoácidos. Además, hay proteínas solubles en agua y solubles en soluciones sali-nas, junto con minerales esenciales y cofactores enzimáticos (Simmonds 1978). En los cereales, las enzimas que actúan so-bre los productos de almacenamiento están frecuentemente asociadas con ellos en la célula, por ejemplo, proteasa áci-da, fosfatasa ácida, fitasa, y en algunos casos  $\beta$ -glucosida-sa y  $\beta$ -amilasa. (Ory y Henningsen 1969, Adams y Novellie 1975, Adams y col. 1976). En el endosperma, por el contrario, la fuente de carbohidratos y de energía, el almidón, es rela-tivamente resistente al ataque, tanto por su estructura como por el hecho de estar lejos de la fuente de su principal en-zima degradativa, la  $\alpha$ -amilasa. Además, la mayor parte de la proteína del endosperma es insoluble en agua o en solucio-

nes salinas. No hay proliferación del retículo endoplásmico en el endosperma de la semilla en germinación, y por lo tanto no hay síntesis in situ de enzimas hidrolíticas. Como resultado de esta partición de actividades metabólicas, los nutrientes están disponibles para el desarrollo del embrión de una manera controlada y sostenida (Simmonds 1978).

## **2.2 Origen y función de las proteínas de almacenamiento**

La deposición de proteína de almacenamiento comienza aproximadamente en el séptimo día después de la fertilización, y a partir de este momento la síntesis de proteína continúa hasta que el grano alcanza la madurez. El primer depósito de proteína de almacenamiento en los tejidos del endosperma es en la forma de cuerpos proteicos, (Kasarda y col. 1976) corpúsculos rodeados de membrana que están en el endosperma almidonoso y en la aleurona de las monocotiledóneas. En las células de la aleurona, los cuerpos proteicos contienen inclusiones globoides, que serían un depósito de ácido fítico, y cristalinas, que contendrían proteínas, carbohidratos y nicotina. Los cuerpos proteicos del endosperma almidonoso, por otro lado, tienen una estructura granular homogénea. En el tejido maduro, la forma de los cuerpos proteicos, que era esférica, se distorsiona en gran medida debido a la deshidratación del grano y a la compresión por los gránulos de almidón. Muchos cuerpos proteicos pequeños se fusionan durante el desarrollo, por lo que la matriz de proteína de almacenamiento del grano de trigo maduro tiende a ser un continuo que rodea los gránulos de almidón (Simmonds y O'Brien 1981). Cuando las células del endosperma se aproximan a la madurez, se vuelven cada vez más llenas de almidón y proteínas de reserva, la humedad disminuye y los procesos de síntesis de almi

dón y proteínas son progresivamente interrumpidos. En las etapas finales de la madurez, la célula va perdiendo humedad, la proteína de almacenamiento queda comprimida entre los gránulos de almidón, y la extensa red del retículo endoplásmico colapsa. El retículo endoplásmico es rico en lípidos derivados de membrana, y éstos llegan a estar estrechamente asociados a las proteínas de almacenamiento bajo las condiciones de compresión y ruptura que acompañan a la maduración (Simmonds 1978).

La desaparición de estas proteínas de reserva durante la germinación indica que desempeñan un papel al comienzo del desarrollo de la plántula, ya sea suministrando aminoácidos, o sustratos respiratorios, o por algún otro proceso en el que participen (Labouriau 1983). Son ricas en aminoácidos como el ácido aspártico y el ácido glutámico, que juegan un rol central en el metabolismo y la interconversión de aminoácidos en el tejido de la planta. Las proteínas de almacenamiento de la mayoría de los cereales son muy heterogéneas, lo que puede ser el resultado de la naturaleza poliploide de este tejido en algunos casos, o de la ausencia de fuertes presiones evolutivas para conservar una composición de aminoácidos en particular (Simmonds 1978).

Por otra parte, estas proteínas tienen mucha importancia en la nutrición del hombre y de algunos animales domésticos, a tal punto que, para muchas especies cultivadas, la cantidad y la composición de las proteínas de semillas ya reflejan mucho más una selección humana intencional que los requisitos nutricionales óptimos de una semilla en germinación (Labouriau 1983).

### 3. LA TECNOLOGIA DEL TRIGO

Una definición moderna describe la tecnología como una acción en la que el hombre transforma deliberadamente los productos naturales y la energía de manera de satisfacer sus necesidades . En este caso, la tecnología del trigo es la transformación del grano en productos de panadería. Estos productos no sólo son importantes nutricionalmente y por poseer ciertas propiedades mecánicas, sino también por tener una alta palatabilidad.

La calidad panadera del trigo depende de su capacidad de producir un producto de buen volumen. A pesar del gran número de investigaciones realizadas, el problema de la calidad panadera aún no ha sido resuelto. Lo que sí se sabe con certeza es que la cantidad y la calidad de la proteína de trigo juegan un papel importante en este aspecto (Wassermann 1978).

#### 3.1 Las proteínas de la harina

La harina común es el endosperma molido de la semilla, por lo que las proteínas de la harina son las proteínas del endosperma, que comprenden dos grupos generales, relacionados con el rol de este tejido de proveer residuos de aminoácidos y glucosa para el desarrollo del embrión: el primer grupo es el llamado citoplasmático o metabólicamente activo, aunque algunos de sus componentes pueden tener un rol estructural en las paredes celulares del endosperma. Las proteínas de este grupo se clasifican por su solubilidad en albúminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en soluciones salinas diluidas), y entre ellas hay un número de enzimas que

tienen como sustrato compuestos de almacenamiento o paredes celulares. El segundo grupo comprende las proteínas de almacenamiento, que están también involucradas en el metabolismo del grano en germinación, pero en un sentido pasivo (Simmonds 1978). Se clasifican por su solubilidad en prolaminas (gliadinas en el trigo), que son solubles en alcohol 70-90%, y glutelinas (gluteninas en el trigo), que son insolubles en los medios anteriores y se extraen con ácidos, álcalis, detergentes, urea, etc. (Kasarda y col. 1976).

Las globulinas de la harina de trigo aparentemente contienen cantidades apreciables de nucleoproteínas (Bourdet y Feillet 1967), la composición de aminoácidos de esta fracción comprende una proporción de aminoácidos básicos que es semejante a la de las histonas (Kasarda y col. 1978). Por otro lado, se ha aislado y purificado una proteína extraída con solución salina de gránulos de almidón de trigo grandes (tipo A) (Lowy y col. 1981), que se extraería con las globulinas. En esta fracción y en la fracción de glutelinas habría probablemente también grandes cantidades de proteínas relacionadas con membranas y paredes celulares (Doll 1977).

### **3.2 El gluten en la panificación**

Se ha demostrado la existencia de una relación positiva entre el contenido de proteínas de la harina y el volumen de pan obtenido a partir de estas harinas.

Una gran proporción de la proteína de harina de trigo comprende el complejo viscoelástico del gluten, que es en gran medida responsable de las propiedades de la masa y de la capacidad de panificar de esta harina. El gluten es el material viscoelástico que se forma cuando una masa de harina

y agua se lava con un exceso de esta última para separar el almidón y otros componentes solubles. Usualmente sólo alrededor del 75-85% de su peso seco comprende de hecho proteínas, el resto es almidón residual, lípidos, hemicelulosas, etc. La composición proteica del gluten consiste principalmente en gliadinas, gluteninas y proteínas del residuo proteico (estas últimas son las que permanecen insolubles después de haber extraído las demás). Las gliadinas le confieren extensibilidad, mientras que las gluteninas y las proteínas del residuo le confieren elasticidad. También hay usualmente presentes algunas albúminas y globulinas, dependiendo del lavado (Schofield y Booth 1983).

La importancia primaria de las proteínas del gluten en la preparación del pan es la "fuerza" que imparten a la masa, es decir, su resistencia a la extensión y su estabilidad durante el mezclado. Las masas "fuertes" tienen la capacidad de retener burbujas de gas en la estructura. Una miga fina y suave es el resultado de una distribución pareja de pequeñas burbujas de gas que se expanden en el proceso de panificación. Si las propiedades reológicas del gluten son tales que la masa es demasiado tenaz e insuficientemente extensible, la resistencia a la expansión de las burbujas de gas será demasiado grande y resultará un volumen de pan pobre, de textura algo gomosa. Inversamente, para masas que contienen gluten demasiado blando y extensible, las burbujas de gas se expanden excesivamente y coalescen unas con otras, este pan tendrá una textura muy abierta con una estructura tosca.

Harinas con contenidos de proteína o de gluten equivalentes pueden tener el gluten demasiado, o insuficientemente

extensible, o con características óptimas. Así, no sólo es importante para la calidad panadera el contenido de proteína o gluten de la harina, sino también la calidad de esas proteínas. Esto hace que el criterio más importante y definitivo para la calidad de una harina sea el ensayo de panificación (Schofield y Booth 1983).

### **3.3 Características de las proteínas de almacenamiento en relación a las propiedades del gluten**

**3.3.1 Composición de aminoácidos:** la composición de aminoácidos de las fracciones de gliadinas y gluteninas muestra algunas similitudes, aunque hay ciertas diferencias entre ambas. Se acepta generalmente que en las proteínas de almacenamiento de trigo 1/3 o más de sus residuos aminoácidos corresponderían a restos de glutamina, y 1/7 o más a residuos de prolina (Kasarda y col. 1976). Una gran proporción de glutámico está como glutamina, y la mayor parte del aspártico está como asparagina. Esto, junto con los contenidos relativamente bajos de aminoácidos básicos, ha hecho que algunos autores consideren a ciertas gliadinas dentro de las proteínas conocidas menos cargadas (Kasarda y col. 1976).

Los homopolipéptidos sintéticos de glutamina forman estructuras que son estables bajo condiciones muy severas (Krull y col. 1965), debido al gran número de puentes hidrógeno que se pueden formar. Hay observaciones que sugieren que los puentes hidrógeno juegan un papel importante en las interacciones entre las proteínas de trigo. Además, la presencia de niveles relativamente altos de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas indica que hay también una proporción importante de interacciones hidrofóbicas en estas proteínas (Schofield y



Booth 1983).

**3.3.2 Gliadinas:** las gliadinas comprenden un grupo heterogéneo de proteínas, que se clasifican por su movilidad electroforética en geles con buffer lactato de aluminio, en gliadinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  (Woychik y col. 1961).

Casi todos sus restos de glutámico están como glutamina, que provee una fuente de nitrógeno que puede ser fácilmente utilizada por la semilla en germinación. Las gliadinas tienen también altos contenidos de prolina (entre el 15 y el 30% del total de sus restos aminoácidos), probablemente por la misma razón que la glutamina: su incorporación directa en las vías que conducen a la síntesis de otros aminoácidos. La presencia de prolina facilita el plegamiento de las cadenas polipeptídicas, que en estas proteínas adoptan conformaciones de tipo globular (Wu y Dimler 1964).

Las gliadinas están presentes en el gluten o en la harina en forma monomolecular, y la evidencia disponible sugiere que tienen estructuras algo asimétricas, compactas, que están estabilizadas por puentes disulfuro intramoleculares. En general, contienen una importante proporción de estructura en  $\alpha$ -hélice (Wu y Cluskey 1965, Wu y col. 1967, Kasarda y col. 1968) (aproximadamente el 35% de la estructura de algunas  $\alpha$ -gliadinas es  $\alpha$ -hélice) y cantidades menores (10%) de estructura  $\beta$ . Las  $\omega$ -gliadinas son ricas en una estructura llamada vueltas- $\beta$ , y parecen no tener estructura en  $\alpha$ -hélice o en hoja plegada, mientras que en las  $\alpha$ -gliadinas, y probablemente en las  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas, las vueltas- $\beta$  están concentradas en dominios específicos (Tatham y col. 1985).

Los pesos moleculares de la mayoría de las gliadinas caen en el rango de 30.000 a 45.000 daltons (Bietz y Wall

1972, Ewart 1973, Sexon y Wu 1972). Las  $\omega$ -gliadinas, sin embargo, tienen pesos moleculares mucho mayores, como 75.000 y 79.000 daltons, y son además deficientes en aminoácidos sulfurados por lo que no tienen, o tienen muy pocos, puentes disulfuro intramoleculares (Booth y Ewart 1969).

**3.3.3 Gluteninas:** en general se considera que las gluteninas son complejos de alto peso molecular formados por subunidades unidas por puentes disulfuro (Kasarda y col. 1978), aunque hay otros modelos propuestos para su estructura. El peso molecular de estos complejos va de 50.000 a varios millones (Jones y col. 1961). Además de los puentes disulfuro, los enlaces no covalentes tienen una considerable importancia en las interacciones entre subunidades de gluteninas, y entre gluteninas y gliadinas y otras proteínas de trigo (Schofield y Booth 1983).

Las subunidades de gluteninas tienen pesos moleculares entre 11.000 y 133.000, determinados por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) (Bietz y Wall 1972). Aunque las gliadinas y la mayor parte de las gluteninas reducidas tienen pesos moleculares similares (Nielsen y col. 1962), y frecuentemente su composición de aminoácidos también es similar, pudiendo aún tener secuencias parciales idénticas de restos aminoácidos en sus cadenas polipeptídicas (Ewart 1966), debe haber diferencias significativas entre estas dos fracciones ya que tienen estructuras diferentes. Las diferencias en la estructura primaria darían a las gluteninas una estructura plegada más laxa y una tendencia a formar puentes disulfuro intermoleculares, en contraste con las gliadinas que tienen puentes disulfuro intramoleculares (Beckwith y Wall 1966) y estructuras estrechamente plega

das (Kasarda y col. 1978).

Se ha propuesto que el entrecruzamiento entre las subunidades de glutenina es limitado, dando principalmente polímeros lineales (Kasarda y col. 1976). La formación de estos agregados lineales de subunidades proteicas explica la viscoelasticidad de las gluteninas, en base a las fuertes interacciones que habría entre ellos. La gran cantidad de glutamina en las proteínas de almacenamiento hace que necesariamente muchos de estos residuos estén en la superficie de las subunidades, haciéndolas pegajosas debido a su capacidad de formar puentes hidrógeno. Habría también interacciones hidrofóbicas y iónicas (Kasarda y col. 1976). Por otro lado, la rápida disminución en la viscosidad de las preparaciones de gluteninas después de la ruptura de los puentes disulfuro (Pence y Olcott 1952, Nielsen y col. 1962), y la sensibilidad de la masa a reactivos que atacan puentes disulfuro (Jones y col. 1974), han proporcionado fuertes evidencias de que los puentes disulfuro son importantes en la determinación de las propiedades de las gluteninas (Kasarda y col. 1976).

Las subunidades de gluteninas de alto peso molecular tienen en su dominio central una estructura del tipo de las vueltas- $\beta$ , estructura que está regularmente distribuida, reflejando una secuencia de restos aminoácidos regular. Los dominios N- y C-terminales de estas subunidades probablemente tengan una estructura de  $\alpha$ -hélice, y contienen los únicos residuos de cisteína detectados en estas proteínas (Tatham y col. 1985). Estos autores proponen, además, que estas subunidades son los principales componentes elásticos del gluten. Las vueltas- $\beta$  repetidas en el dominio central forman una espiral- $\beta$  elástica, y estos monómeros elásticos estarían en

samblados en polímeros de gluten por puentes disulfuro intermoleculares entre los residuos de cisteína de los dominios de  $\alpha$ -hélice cercanos a los extremos N- y C-terminales.

### **3.4 Efecto del amasado sobre las proteínas de la harina**

En la formación de la masa, los componentes de la harina, y las proteínas en particular, deben primero hidratarse, y luego la aplicación de un esfuerzo de cizalla a la masa hidratada, por medio de un trabajo de mezclado, da como resultado una reorientación de las proteínas para producir una masa con características reológicas apropiadas (Schofield y Booth 1983).

La mayoría de los estudios enfatizan el rol de las estructuras poliméricas de gluteninas en los cambios que ocurren durante el amasado. En cuanto al papel de los grupos sulfhidrilo, se observó que éstos disminuyen al formarse la masa (Mecham y col. 1963). Sin embargo, el hecho que los reactivos que bloquean sulfhidrilos y los agentes oxidantes de estos grupos tengan efectos similares, no se explica fácilmente. Tampoco se explica la observación que la disminución en los grupos sulfhidrilo no se corresponde con un incremento equivalente de puentes disulfuro (Tanaka y Bushuk 1973). Algunos informes recientes han sacado a la luz el papel del glutatión y su forma oxidada dipeptídica en las propiedades reológicas de la masa; el efecto de los mejoradores oxidantes, como por ejemplo el bromato, se ha atribuido frecuentemente a reacciones que involucran al glutatión más que a los sulfhidrilos de las proteínas directamente. Las evidencias disponibles indican que las reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro, ocurren durante el mezclado entre glutatión y proteína

(Jones y Carnegie 1971). No se sabe si ocurren entre proteínas solas, aunque si se rompen puentes disulfuro presumiblemente deba haber formación de nuevos puentes entre las especies proteicas, ya que la distribución de pesos moleculares durante el amasado se mantiene constante (Meredith y Wren 1969).

#### **4. PERDIDAS POST-COSECHA**

Cuando las sociedades primitivas pasaron de una economía nómada de recolección a una agricultura sedentaria, se encontraron con el problema de la conservación de los alimentos entre dos cosechas sucesivas.

Los granos de cereal constituyen la principal fuente de alimentos del hombre y de los animales domésticos, por lo que el conocimiento de los fenómenos que rigen su conservación y el dominio de las técnicas de almacenamiento son determinantes para la supervivencia de millones de personas. No es entonces sorprendente que cada sociedad, con su cultura y su tecnología propias, se haya interesado por esta cuestión (Multon 1982).

En nuestro país un volumen importante de la producción de cereales (5-20% según el tipo de grano) se pierde antes de su industrialización o exportación debido a deterioros sufridos por el grano durante su acondicionamiento y almacenamiento.

##### **4.1 Deterioro sufrido por el grano como consecuencia del secado**

La cosecha anticipada de trigo, practicada con el objeto de dejar la tierra disponible para el cultivo de soja, y

también problemas climáticos, obligan al productor a secar el grano artificialmente para llevarlo a un contenido de humedad no mayor al 14%, límite establecido para su posterior almacenamiento.

En los últimos años se ha observado un aumento en el porcentaje de trigo secado artificialmente; de acuerdo a datos suministrados por fuentes oficiales y privadas, en 1980 se secaba aproximadamente el 10% de la producción de trigo, en tanto que en 1983 se secó un 34% de este cereal.

Por razones económicas se trata de secar el trigo lo más rápidamente posible después de la cosecha, y para ello se emplean muchas veces temperaturas demasiado elevadas, que pueden provocar un deterioro del grano afectando tanto su uso como semilla como su calidad industrial (Wassermann 1978, Booth y col. 1980).

Las exposiciones agudas a altas temperaturas pueden conducir a la desnaturalización de proteínas, a la ruptura de membranas (Steponkus 1981), a la desnaturalización de ácidos nucleicos, y eventualmente a modificaciones no enzimáticas del almidón y reacciones de Maillard (Multon 1982).

Esto trae como consecuencia la pérdida de viabilidad de las semillas, que se considera, junto con el volumen de pan, uno de los parámetros más sensibles para medir el deterioro térmico (Mašková y col. 1982, Schreiber y col. 1981).

Comparado con la capacidad germinativa, el contenido de gluten del grano de trigo disminuye más lentamente con el secado, aunque las propiedades del gluten experimentan un cambio más rápido (Mašková y col. 1982).

Para la calidad panadera, es esencial que la harina contenga suficiente gluten, y que la proteína del gluten sea

de buena calidad o funcionalidad (Booth y col. 1980).

En estudios realizados calentando gluten en distintas condiciones, se observó que las propiedades del mismo en panificación disminuyen progresivamente con el calentamiento. Esto va acompañado de una pérdida de extractabilidad de las proteínas del gluten, siendo las gluteninas las proteínas más afectadas por el tratamiento térmico (Schofield y col. 1983). Se ha postulado que las gluteninas se despliegan a temperaturas mayores de 75°C, y esto facilita las reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro entre los grupos expuestos. Esta redistribución de enlaces disulfuro haría que la proteína se mantenga en el estado desnaturalizado durante el enfriamiento (Schofield y col. 1983).

Se han realizado numerosos estudios midiendo el deterioro producido por el secado a través de ensayos de viabilidad, actividad de determinadas enzimas, volumen de pan, contenido de gluten, solubilidad de proteínas, etc., tratando de correlacionar los resultados obtenidos con las condiciones de secado (Mašková y col. 1982, Schreiber y col. 1981, Yakovensko y col. 1979, Wassermann 1978). Sin embargo, los resultados son válidos sólo para el tipo de secadero utilizado, y no pueden referirse a otros secaderos sin investigaciones adicionales (Schreiber y col. 1981).

El objetivo de este trabajo fue planteado en otros términos: se buscó estudiar el deterioro experimentado por la semilla de trigo como consecuencia del secado, tanto en el embrión como en el endosperma y en la semilla como un todo, principalmente a nivel de la desnaturalización de proteínas, y correlacionar los datos referentes a las alteraciones proteicas con parámetros de calidad industrial y viabilidad.

## MATERIALES Y METODOS





## **1. MUESTRA EMPLEADA**

Para los ensayos se utilizaron semillas de trigo (*Triticum aestivum*) cultivar Marcos Juárez-INTA, provenientes de Pergamino (Argentina) cosecha 1982/1983. Las pruebas que se realizaron con otras semillas están expresamente indicadas.

## **2. PROCESAMIENTO**

### **2.1 Humectación y secado de las semillas**

Las semillas se procesaron de acuerdo al siguiente esquema: se humectaron hasta alcanzar tres porcentajes diferentes de humedad, y posteriormente se secaron en distintas condiciones de tiempo y temperatura, hasta llegar a un contenido de humedad adecuado para ser almacenadas. Como control para los ensayos posteriores, se utilizaron semillas que no habían sufrido este procesamiento.

**2.1.1 Humectación:** se hicieron ensayos tendientes a elevar el contenido de humedad de las semillas hasta un determinado valor, que pasaría a ser el porcentaje de humedad inicial. Para ello, las semillas se pusieron en agua destilada a temperatura constante, y se midió el contenido de humedad a diferentes tiempos, secándolas previamente con un género y dejándolas aproximadamente 1 h 30 min a temperatura ambiente (20°C) para medir solamente el contenido interno de humedad. Así se determinaron la temperatura y el tiempo de humectación necesarios para que las semillas alcancen contenidos de humedad de 17, 21 y 25%.

**2.1.2 Secado:** las semillas se pusieron en una estufa con ventilación dentro de una red de algodón, formando una capa de

dos semillas de espesor como promedio. Esta red estaba a su vez apoyada sobre otra red del mismo tipo, permitiendo de esta manera que las semillas de las superficies superior e inferior estuvieran en contacto con el aire. Además, debido al escaso espesor de la capa de semillas, las condiciones de secado fueron similares para todas ellas.

La temperatura durante el secado se midió con termocuplas de Cobre-Constantan, que fueron colocadas en el aire, en la superficie de las semillas y en el interior de las mismas. Se registró la temperatura cada 30 segundos, obteniendo historias térmicas como la que se muestra en la Figura 1. La oscilación en la temperatura de la historia térmica superior se debe a pulsos de ventilación forzada. La temperatura del aire fue de 110°C, 125°C y 140°C, y se hicieron ensayos para determinar los tiempos de secado correspondientes a cada temperatura y a cada porcentaje de humedad inicial, necesarios para llevar el contenido de humedad a un rango de 10 a 14%, considerado adecuado para el almacenamiento.

El contenido de humedad inicial se midió inmediatamente antes de secar las semillas, y el final después del tratamiento.

En la Tabla I se muestran, para cada condición de secado, el contenido de humedad inicial y final, el tiempo, la temperatura aproximada del aire de secado, y la temperatura alcanzada por la semilla al final del tratamiento, obtenida a partir de los datos proporcionados por las termocuplas ubicadas en el interior de las mismas.

TABLA I: Condiciones de secado

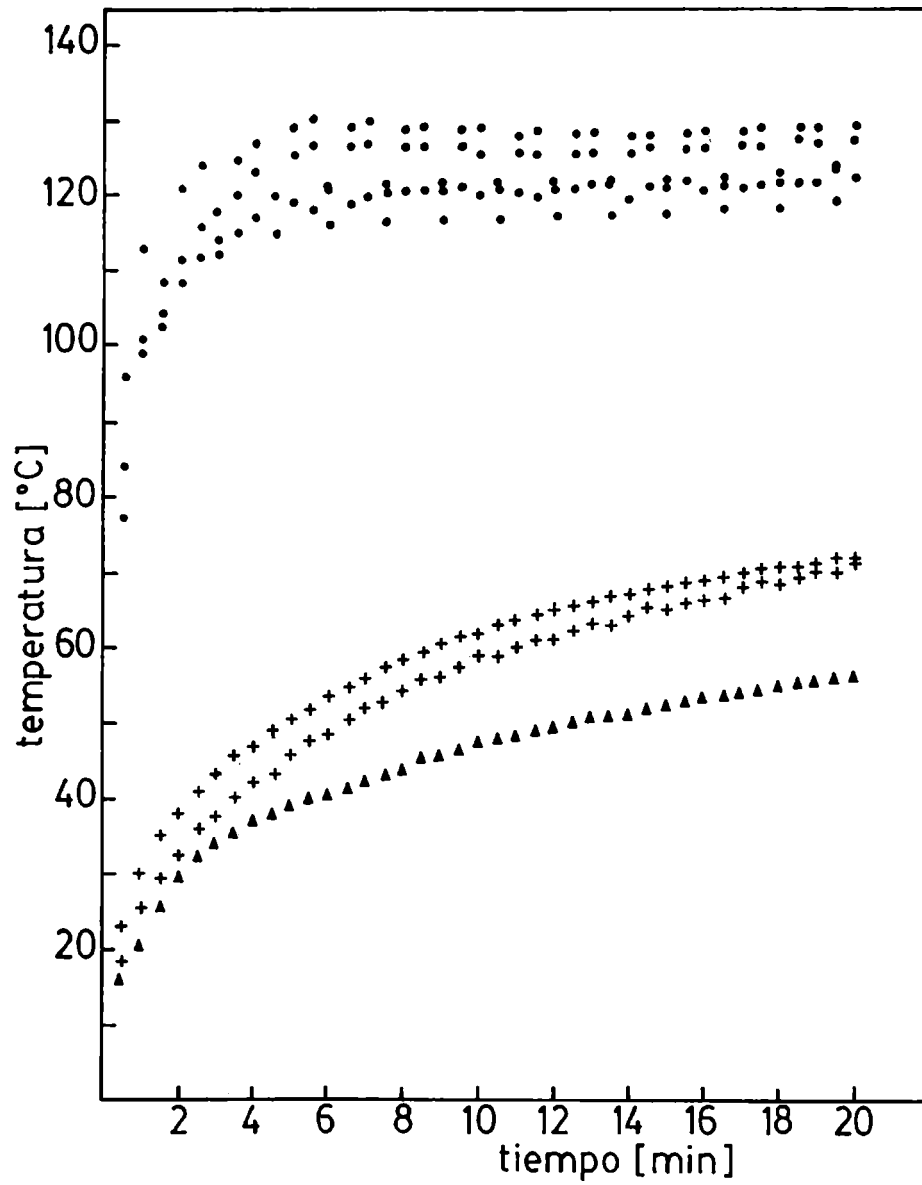
	Cont. de humedad inicial <sup>(1)</sup> (%)	Cont. de humedad final <sup>(1)</sup> (%)	Tiempo de secado (min)	Temperatura del aire (°C)	Temperatura final de las semillas <sup>(2)</sup> (°C)
I <sub>a</sub>	16,9	12,3	25	110	53
I <sub>b</sub>	17,1	13,4	20	125	56
I <sub>c</sub>	16,9	12,7	15	140	62
II <sub>a</sub>	20,9	14,1	40	110	59
II <sub>b</sub>	20,6	12,1	35	125	57
II <sub>c</sub>	20,9	12,2	30	140	63
III <sub>a</sub>	25,5	12,3	65	110	60
III <sub>b</sub>	25,1	12,1	55	125	61
III <sub>c</sub>	25,1	12,7	45	140	70

(1) Expresado como gr agua/100 gr de materia húmeda.

(2) El hecho que la temperatura del lote de semillas II<sub>b</sub> sea inferior a la del lote II<sub>a</sub>, se debería a una posición diferente de la termocupla en el interior de la semilla.

## 2.2 Separación del embrión

Los embriones fueron cortados y separados manualmente de las semillas con una pinza.



**Figura 1.** Historias térmicas obtenidas durante el secado de las semillas Ib. • Temperatura del aire. + Temperatura de la superficie de las semillas. ▲ Temperatura del interior de las semillas.

### **2.3 Separación del endosperma**

Las semillas se pusieron previamente en agua destilada alrededor de 20 min., y se separó el endosperma manualmente con una pinza. Posteriormente se trituraron en forma manual.

### **2.4 Obtención de harina**

Las semillas se molieron en un molino Brabender Jr, con un rendimiento de aproximadamente el 50%. La harina obtenida no se tamizó. Se obtuvo harina de semillas control, I<sub>a</sub>, I<sub>b</sub>, I<sub>c</sub>, II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub>, II<sub>c</sub>, III<sub>a</sub>, III<sub>b</sub> y III<sub>c</sub>.

## **3. EXTRACCION DE PROTEINAS**

### **3.1 De embrión**

Las proteínas del embrión se extrajeron a partir de 25 semillas de cada uno de los lotes secados en las condiciones especificadas en la Tabla I, y de dos lotes control que no habían recibido ningún tratamiento. La extracción se realizó en tubos de centrífuga de 10 ml, con una solución de NaCl 5%, y se extrajo con una relación solvente:sólido de 25:1. Los embriones fueron triturados con una varilla, y estuvieron en contacto con la solución de extracción con agitación ocasional por 3 hs 20 min. Al cabo de este tiempo las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 20 min. La temperatura de extracción fue de 0-5°C. Los sobrenadantes se guardaron a - 60°C.

### **3.2 De endosperma**

Las proteínas de endosperma se extrajeron de 15 semillas

de cada uno de los lotes secados en las condiciones de la Tabla I, y de dos lotes control que no habían recibido ningún tratamiento. La extracción se realizó en tubos de centrífuga de 30 ml con una relación solvente:sólido de 20:1. La solución de extracción utilizada fue SDS 2%-Tris/HCl 0,1M, pH 8 (Bottomley y col. 1982). Las muestras estuvieron en contacto con la solución de extracción; con agitación ocasional, durante aproximadamente 24 hs. Al cabo de este tiempo se centrifugaron a 17.000 x g por 1 hora 10 min. La temperatura de extracción fue de 0-5°C. Los sobrenadantes se guardaron a -60°C.

### **3.3 De harina**

Se extrajeron proteínas de harina provenientes de semillas control,  $I_b$ ,  $I_c$ ,  $II_a$ ,  $III_b$  y  $III_c$ . La extracción se realizó en tubos de centrífuga de 30 ml, con una relación solvente:sólido de 25:1 (0,1 gr harina + 2,5 ml solución de extracción). La solución de extracción utilizada fue SDS 2% - Tris/HCl 0,1M, pH 8 (Bottomley y col. 1982). Las muestras estuvieron en contacto con la solución de extracción, con agitación ocasional, por 24 hs. Al cabo de este tiempo se centrifugaron a 17.000 x g durante 1 h 10 min . La temperatura de extracción fue de 0-5°C. Los sobrenadantes se guardaron a - 60°C.

### **3.4 De masa**

**3.4.1 Preparación de la masa:** La masa se hizo con harina proveniente de semillas control,  $I_b$ ,  $I_c$ ,  $II_a$ ,  $III_b$  y  $III_c$ .

La preparación de la masa se realizó en cápsula de porcelana, con agua destilada, en una relación de 0,6 ml de agua destilada por gramo de harina. Se amasó con varilla has

ta que se desprendiera de las paredes y se dejó descansar una hora a temperatura ambiente (20°C) antes de agregar la solución de extracción.

**3.4.2 Extracción:** La extracción de proteínas se hizo en tubos de centrífuga de 30 ml, con una relación solvente:harina de 25:1 (relación solvente:masa de 15,6:1). La solución de extracción usada fue SDS 2% - Tris/HCl 0,1 M, pH 8 . La masa se disgregó con una varilla y se dejó en contacto con la solución de extracción, con agitación ocasional, durante aproximadamente 24 hs. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 17.000 x g durante 1 hora 10 min. La temperatura de extracción fue de 0-5°C. Los sobrenadantes se guardaron a - 60°C.

#### 4. DETERMINACIONES ANALITICAS

##### 4.1 Contenido de humedad de las semillas

El contenido de humedad se midió por diferencia de peso antes y después de secar las semillas en estufa a 130°C durante 2 hs, y se expresó como gr agua/100 gr de muestra húmeda.

La correlación entre este método de determinación de humedad y el método oficial de la A.O.A.C., (A.O.A.C. 1980a) que consiste en secar en estufa a 130°C durante 2 hs las semillas previamente molidas, es la siguiente (Giner y Calvelo 1986):

$$M_R = \frac{0,9258 M_C + 0,0279}{1,0279 - 0,0742 M_C} \quad (1)$$

donde  $M_R$  y  $M_C$  son los contenidos de humedad decimales en base húmeda determinados por el método de la A.O.A.C y por el



empleado en el presente trabajo respectivamente.

#### 4.2 Concentración de proteína soluble

El contenido de proteína soluble se determinó por el método de Lowry (Lowry y col. 1951), utilizando para los cálculos una curva de calibración de seroalbúmina bovina. En los casos en que la muestra contenía SDS, el patrón para la curva de calibración se preparó en las mismas condiciones. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

#### 4.3 Determinación de proteína total

Se determinó el contenido de proteína total en embrión y en harina por el método de Kjeldahl, utilizando un aparato Büchi 425 como digestor y un aparato Büchi 320 como unidad de destilación. Los ensayos se hicieron por duplicado, y los porcentajes de proteína total se calcularon como %N x 6,25 para embrión, y %N x 5,7 para harina (Yakovensko y col. 1979, Shurpalekar y Haridas Rao 1977, A.A.C.C. 1983a).

### 5. ELECTROFORESIS

Se hicieron electroforesis en placa (180 x 140 x 0,7 mm) en geles de poliacrilamida con SDS, de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (Laemmli 1970, Laemmli y Favre 1973).

#### 5.1 Soluciones utilizadas

##### 5.1.1 Solución madre de acrilamida-bisacrilamida:

	<u>para 100 ml</u>	<u>concentración</u>
acrilamida	30 gr	30 %
bisacrilamida	0,8 gr	0,8 %

A.D. c.s.p. 100 ml

Se filtró y se guardó en frasco color caramelo.

### 5.1.2 Buffer del gel de "stacking"(apilador):

	<u>para 25 ml</u>	<u>concentración</u>
Tris	1,5138 gr	0,5 M
SDS	0,1 gr	0,4 %

Se llevó a pH 6,8 con HCl 1N

TEMED	0,1 ml	0,4 %
A.D.	c.s.p. 25 ml	

### 5.1.3 Buffer del gel separador:

	<u>para 100 ml</u>	<u>concentración</u>
Tris	18,165 gr	1,5 M
SDS	0,4 gr	0,4 %

Se llevó a pH 8,8 con HCl 1N

TEMED	0,4 ml	0,4 %
A.D.	c.s.p. 100 ml	

### 5.1.4 Buffer de corrida:

	<u>para 1000 ml (3,5x)</u>	<u>concentración final (1x)</u>
Tris	21,0 gr	0,05 M
Glicina	100,8 gr	0,384 M
SDS	3,5 gr	0,1 %

Se llevó a pH 8,3 con HCl 1N

A.D. c.s.p. 1000 ml

Se preparó una solución concentrada (3,5x) que se diluyó hasta 1x antes de usar.

#### 5.1.5 Buffer de muestra:

##### 5.1.5.1 Con mercaptoetanol (ME)

	<u>para 10 ml</u>	<u>concentración</u>
Tris	12,1 mg	0,01 M
EDTA	2,9 mg	0,001 M
SDS	100 mg	1 %
ME	0,5 ml	5 %
Glicerol	4 ml	
azul de bromofenol		

Se llevó a pH 8 con HCl 1N.

A.D. c.s.p. 10 ml

##### 5.1.5.2 Sin mercaptoetanol

Se preparó de la misma manera sin agregar mercaptoetanol.

#### 5.1.6 Solución fijadora:

	<u>para 250 ml</u>	<u>concentración</u>
Isopropanol	62,5 ml	25 %
Acido acético glacial	25 ml	10 %
A.D.	c.s.p. 250 ml	

#### 5.1.7 Solución colorante:

	<u>para 250 ml</u>	<u>concentración</u>
Coomassie Brilliant		
Blue R-250	0,05 g	0,02 %

Acido acético glacial	17,5 ml	7 %
A.D.	c.s.p. 250 ml	

Se filtró inmediatamente antes de usar.

#### 5.1.8 Solución decolorante:

	<u>para 500 ml</u>	<u>concentración</u>
Metanol	125 ml	25 %
Acido acético	50 ml	10 %
A.D.	c.s.p. 500 ml	

#### 5.1.9 Persulfato de amonio:

	<u>para 50 ml</u>	<u>concentración</u>
Persulfato de amonio	1 gr	2 %
A.D.	c.s.p. 50 ml	

Se fraccionó y se guardó a - 60°C.

### 5.2 Preparación del gel

#### 5.2.1 Gel separador:

Concentración de acrilamida-bisacrilamida: 12,6 %

	<u>para 45 ml</u> (2 placas)
Buffer del gel separador	11,3 ml
Solución madre de acrilamida-bisacr.	18,4 ml
A.D.	14,1 ml
Persulfato de amonio	1,2 ml

#### 5.2.2 Gel de "stacking"(apilador):

Concentración de acrilamida-bisacrilamida: 4%

	<u>para 10 ml</u> (2 placas)
Buffer del gel de "stacking"	2,5 ml
Solución madre de acrilamida-bisacr.	1,3 ml
Glicerol-agua destilada	5,9 ml
Persulfato de amonio 2%	0,3 ml

### 5.3 Preparación de las muestras

A las muestras se les agregó buffer de muestra con o sin mercaptoetanol en una relación muestra:buffer de 2:1 y 3:1 según los casos. Antes de sembrarlas se calentaron a Baño María durante 5 min. a 100°C.

### 5.4 Patrones de peso molecular

El peso molecular de las diferentes bandas correspondientes a especies proteicas se estimó utilizando un kit de calibración de Pharmacia. Las proteínas patrón utilizadas y sus pesos moleculares correspondientes fueron los siguientes: fosforilasa b (94.000 daltons), seroalbúmina bovina (67.000 daltons), ovoalbúmina (43.000 daltons), anhidrasa carbónica (30.000 daltons), inhibidor de tripsina de soja (20.100 daltons), y  $\alpha$ -lactalbúmina (14.400 daltons). Los pesos moleculares se calcularon con una curva de calibración en la que se graficó log PM vs distancia recorrida por la especie proteica en el gel separador.

### 5.5 Equipos utilizados

Las corridas se hicieron en un equipo de electroforesis Pharmacia GE-2/4. Las densitografías de los geles fueron hechas utilizando un espectrodensitógrafo Shimadzu TLC Scanner CS-910 de doble longitud de onda, seleccionando como

longitud de onda para la muestra 570 nm, y como longitud de onda de referencia 395 nm. El densitógrafo estaba conectado a un integrador Shimadzu C-R 1A chromatopac.

## **5.6 Condiciones de corrida**

Las corridas se hicieron en una cuba refrigerada con una intensidad de corriente de 25 mA como máximo, y un tiempo de corrida de 24 hs.

## **6. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)**

### **6.1 Aparato utilizado**

Para las corridas de calorimetría diferencial de barrido se utilizó un calorímetro Du Pont Model 910 System con un registrador Hewlett Packard 7046 B.

### **6.2 Calibración del equipo**

La calibración se hizo a través de las endotermas de fusión del Indio. Para ello se pesaron 15 mg de Indio con una precisión de 0,01 mg, dentro de una cápsula de DSC de aluminio hermética que posteriormente se selló.

**6.2.1 Calibración de temperatura:** para la calibración de temperatura se hicieron corridas de DSC de Indio, obteniendo termogramas de flujo de calor vs temperatura (en mV). La cápsula con Indio se calentó a velocidad constante en un rango de temperaturas que incluyó la temperatura de fusión de este metal (156,6°C), utilizando como referencia una cápsula equivalente vacía. Así se obtuvieron las endotermas de fusión del Indio a distintas velocidades de calentamiento ( $\beta$ ) (de 3°C/min a 22°C/min), y para cada velocidad se calcularon las correcciou

nes de temperatura en mV. La corrección de temperatura incluye dos términos:

- Retardo térmico (conocido como thermal lag),  $TL_0$
- Corrección por velocidad de calentamiento,  $\beta_0$

La resistencia térmica  $R_0$  se calculó según la expresión:

$$R_0 \text{ (adimensional)} = \frac{b \text{ (cm)} \cdot S_x \text{ (mV/cm)}}{a \text{ (cm)} \cdot S_y \text{ (mV/cm)}} \quad (2)$$

donde  $S_x$  y  $S_y$  son las sensibilidades en abscisas y en ordenadas respectivamente, y  $b/a$  es la inversa de la pendiente correspondiente a la porción lineal de la primera parte de la endoterma. El término de corrección por retardo térmico para cada velocidad queda expresado entonces como:

$$TL_0 \text{ (mV)} = R_0 \cdot h \text{ (cm)} \cdot S_y \text{ (mV/cm)} \quad (3)$$

donde  $h$  es la altura del pico desde la línea de base.

La temperatura de fusión del Indio ( $T_f$ ), obtenida de tablas, es  $156,6^\circ\text{C}$ , que para las termocuplas tipo K (cromel-alumel) del sensor de la celda del DSC es equivalente a  $6,403$  mV. Este valor tiene que coincidir con la temperatura del pico corregido por los términos  $TL_0$  y  $\beta_0$ :

$$6,403 = T_{In} - TL_0 - \beta_0 \quad (4)$$

donde  $T_{In}$  es la temperatura del pico de fusión del Indio en los termogramas de DSC, expresado en mV. De esta expresión se puede calcular  $\beta_0$  en mV.

La temperatura del pico en los termogramas de embrión de trigo fue calculada para cada velocidad de calentamiento,

con la expresión:

$$T_{\text{máx}} = T_p - R_o \cdot h \cdot S_y - \beta_o \quad (5)$$

donde  $T_{\text{máx}}$  es la temperatura corregida del pico en mV,  $T_p$  es la temperatura medida en los termogramas en mV,  $S_y$  es la sensibilidad del eje y en mV/cm para la muestra,  $h$  es la altura del pico de la muestra en cm,  $R_o$  y  $\beta_o$  son los valores calculados para el Indio, para cada velocidad de calentamiento. El término  $R_o \cdot h \cdot S_y$  fue despreciable para el pico obtenido en las corridas de embrión de trigo, y en los cálculos se consideró solamente la corrección por velocidad de calentamiento,  $\beta_o$ . Los valores de  $T_{\text{máx}}$  en mV se pasaron luego a °C con la tabla de conversión mV - °C del manual del equipo para termocuplas tipo K (cromel-alumel). Estos valores se utilizaron en el método de Ozawa (Ozawa 1970).

**6.2.2 Cálculo del calor de transición,  $\Delta H$ :** para el cálculo del calor de transición,  $\Delta H$ , de la muestra, se utilizaron como referencia endotermas de fusión de Indio, registradas como flujo de calor,  $\frac{\partial H}{\partial t}$ , en función del tiempo, y teniendo como datos su masa y su calor de fusión:

$$\Delta H_{\text{muestra}} = \Delta H_{\text{In}} \frac{m_{\text{In}}}{m_{\text{muestra}}} \times \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{In}}} \times \frac{S_{y_{\text{muestra}}}}{S_{y_{\text{In}}}} \times \frac{S_{x_{\text{muestra}}}}{S_{x_{\text{In}}}} \quad (6)$$

donde  $\Delta H$  es el calor de transición en cal/gr,  $m$  es la masa en mg,  $A$  es el área bajo la curva en  $\text{mm}^2$ ,  $S_y$  es la sensibilidad en ordenadas en mcal/sg.cm, y  $S_x$  es la sensibilidad en abscisas en min/mm.

La velocidad de calentamiento fue de 10°C/min.

Para cada endoterma se trazó la correspondiente lí-



nea de base. El área resultante se midió con un analizador de imágenes Morphomat 34 Zeiss.

El peso seco de las muestras se calculó haciendo un orificio en la cápsula después de la corrida, y secándola en estufa a 100°C durante la noche.

### **6.3 Preparación de las muestras**

**6.3.1 Embriones de trigo:** los embriones se cortaron y se separaron manualmente de las semillas con una pinza. Las muestras, (10 embriones, con un peso de aproximadamente 6 mg) se pusieron dentro de cápsulas de DSC de aluminio no herméticas, excepto para el método isotérmico (Materiales y Métodos pág. 36), para el que se utilizaron cápsulas herméticas. A continuación se sellaron las cápsulas, asegurando un buen contacto entre la muestra y el fondo de la cápsula. Todas las muestras utilizadas para calorimetría diferencial de barrido tenían aproximadamente el mismo contenido de humedad (alrededor del 12%). Durante las corridas se usó como referencia una cápsula vacía equivalente.

**6.3.2 Harina de trigo:** se hicieron corridas de calorimetría diferencial de barrido de harina de trigo obtenida de las semillas en estudio. Las corridas se hicieron en cápsulas herméticas, usando como referencia una cápsula equivalente vacía.

**6.3.3 Gluten de trigo:** las corridas de DSC de gluten de trigo se hicieron en cápsulas de aluminio herméticas, utilizando como referencia cápsulas equivalentes dobles o de doble base.

El gluten se preparó de acuerdo al método de la A.A.C.C. (A.A.C.C. 1983b), a partir de 5 gr o de 2,5 gr de

harina obtenida de semillas control, por lavado de la masa bajo canilla.

**6.3.4 Masa de harina de trigo:** se hicieron corridas de masa preparada con harina de trigo proveniente de las semillas en estudio, en cápsulas de aluminio herméticas, usando como referencia cápsulas dobles.

La masa se preparó con agua destilada, en una proporción de 0,6 ml de agua destilada por gramo de harina.

#### **6.4 Determinación de la energía de activación y del factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius**

Para calcular la energía de activación y el factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius de la transición térmica observada en los termogramas de DSC de embriones de trigo, se utilizó un método dinámico, en el que se mide el corrimiento de los picos por efecto de la velocidad de calentamiento.

**6.4.1 Método dinámico:** se hicieron corridas de DSC de embriones de trigo a diferentes velocidades de calentamiento (3°C/min, 5°C/min, 7°C/min, 10°C/min, 15°C/min, 18°C/min, 20°C/min y 22°C/min), obteniendo termogramas de flujo de calor  $\frac{\partial H}{\partial t}$  vs temperatura. Sobre cada endoterma se determinaron las temperaturas  $T_{m\acute{a}x}$  de los picos, según se explicó en la pág. 31. La energía de activación,  $E_a$ , y el factor preexponencial,  $Z$ , de la ecuación de Arrhenius, se calcularon graficando  $-\ln(\beta/T_{m\acute{a}x}^2)$  vs  $1/T_{m\acute{a}x}$  de acuerdo con la ecuación de Ozawa (Ozawa 1970):

$$\ln(\beta/T_{m\acute{a}x}^2) = \ln\left(\frac{ZR}{E_a}\right) - \frac{E_a}{R T_{m\acute{a}x}} \quad (7)$$

donde  $\beta$  es la velocidad de calentamiento (K/min),  $T_{\text{máx}}$  es la temperatura del pico (K),  $Z$  es el factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius (1/min), y  $R$  es la constante de los gases (cal/mol.K). Se aplicó una regresión lineal por cuadrados mínimos sobre 46 puntos experimentales, seleccionando  $-\ln(\beta/T_{\text{máx}}^2)$  como variable independiente (Pravisani y col. 1985).

**6.4.2 Método isotérmico:** este método consiste en calcular la vida media para la reacción a una temperatura determinada, utilizando los valores de energía de activación y factor preexponencial obtenidos por otro método, en este caso, por el método de Ozawa. Para ello se postuló una cinética de primer orden con respecto al tiempo y se estimó el tiempo de vida media como  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$  (min), para tres temperaturas diferentes (70°C, 72°C y 75°C). Los embriones extraídos de semillas control, se cortaron en dos partes, obteniéndose dos muestras equivalentes de mitades de embriones. Una de estas muestras se puso en cápsulas herméticas de DSC, y se sumergió en un baño de agua termostatzado a una temperatura determinada (70°C, 72°C ó 75°C), durante un período de tiempo equivalente al tiempo de vida media calculado para esa temperatura. Al cabo de este tiempo la cápsula se sumergió en un baño de agua-hielo para frenar el tratamiento isotérmico en forma brusca. Las cápsulas tratadas de esta manera se calentaron luego en el equipo de DSC a una velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Con las muestras obtenidas con la otra mitad de los embriones, se hicieron corridas en las mismas condiciones, pero sin el tratamiento isotérmico previo. Se midieron luego las áreas de las endotermas obtenidas en los dos casos, y se compararon los valores (Duswalt 1974).

## 7. ENSAYOS DE CALIDAD PANADERA

### 7.1 Ensayo de micropanificación

Se hicieron ensayos de micropanificación con harina obtenida de semillas secadas en las condiciones de la Tabla I y de semillas control (Materiales y Métodos pág. 21).

El método utilizado fue el método oficial del Ministerio de Agricultura de La Nación, modificado en el Laboratorio de la Estación Experimental Regional Agropecuaria de Marcos Juárez (INTA), adaptado para pequeñas cantidades de muestra.

#### 7.1.1 Ingredientes:

	cantidad	concentración
harina	10 gr	---
sal fina	0,1 gr	1 %
azúcar	0,25 gr	2,5 %
levadura prensada	0,3 gr	3 %
malta-harina	0,01 gr	0,1 %
A.D.	4-5 ml	

La cantidad de malta-harina ( $\alpha$ -amilasa) a agregar se determinó por medio del número de caída (falling number), definido como el tiempo en segundos requerido para agitar y permitir que caiga un agitador una distancia medida, a través de un gel de harina y agua caliente, que está experimentando licuefacción (A.O.A.C. 1980b).

El número de caída se determinó con 7 gr de harina y 25 ml de agua destilada.

**7.1.2 Panificación:** para preparar la masa, se disolvieron la sal y el azúcar en agua a 30°C, y lo mismo se hizo con la levadura. La malta-harina se agregó junto con la harina.

El tiempo de amasado, en amasadora, fue de 2 min. para la harina proveniente de semillas control, I<sub>a</sub>, III<sub>a</sub>, III<sub>b</sub> y III<sub>c</sub>; y de 1 min. 30 seg. para la harina proveniente de semillas I<sub>b</sub>, I<sub>c</sub>, II<sub>a</sub>, II<sub>b</sub> y II<sub>c</sub>. Después del amasado, se pasó la masa al fermentógrafo (30°C y 80 % de humedad). A partir de los 15 min desde el momento en que entró en la amasadora se hicieron dos amasados leves ("punch") con intervalos de 15 min, y a los 45 min. se dio forma al pancito. Se dejó en el fermentógrafo 30 min más, y se pasó al horno. Se cocinó durante 15 min a 210°C.

Una vez fríos se midió el volumen de los pancitos por desplazamiento de semillas de nabo.

## **7.2 Ensayo de sedimentación de Zeleny**

Para realizar este ensayo se usaron 3,2 gr de harina que se pasaron a la probeta de Zeleny. Se agregaron 50 ml de agua destilada y 5 min. después 25 ml de solución de ácido láctico, alcohol isopropílico y agua destilada, siempre agitando. Se dejó reposar 5 min. y se leyó el volumen de precipitado en la probeta de Zeleny (Zeleny 1947).

La solución de ácido láctico y alcohol isopropílico se prepara mezclando 180 ml de solución madre de ácido láctico (obtenida diluyendo 250 ml de ácido láctico 85 % USP a un litro con agua destilada y dejándola 6 hs a reflujo sin pérdida de volumen), con 200 ml de alcohol isopropílico y llevando a 1 litro con agua destilada (A.A.C.C. 1983c).

### **7.3 Ensayos con gluten**

**7.3.1 Determinación de gluten húmedo y gluten seco:** para la obtención de gluten se utilizó un aparato Glutomatic 2200. En el ensayo se usaron 10 g de harina y 4,5 ml de agua destilada. La temperatura del agua de lavado fue de 23°C, y el tiempo de lavado de 8 min. Los valores de gluten húmedo y seco se determinaron por pesada, este último después de secar el gluten húmedo en estufa a 100°C (I.C.C. 1982).

**7.3.2 Efecto del SDS y del ME en la estructura del gluten:** el gluten se obtuvo en forma manual a partir de 2,5 gr y de 5 gr de harina de semillas control, por lavado de la masa bajo canilla, siguiendo el método de la A.A.C.C.(A.A.C.C. 1983b). Una vez obtenido el gluten, se dividió en cuatro porciones, que se dejaron en recipientes con distintas soluciones: SDS 1 % - ME 5 %; SDS 1 %; ME 5 % y agua destilada. Al cabo de 6-8 horas se observaron las muestras a través de una lupa Zeiss y de un microscopio Leitz, y se fotografiaron.

## **8. ENSAYOS DE GERMINACION**

### **8.1 Efecto de las condiciones de secado sobre la viabilidad de las semillas**

Se hicieron ensayos de germinación con las semillas secadas en las condiciones de la Tabla I y con semillas control. Los ensayos se llevaron a cabo a 20°C en cajas de Petri estériles, conteniendo cada una 3 hojas de papel de filtro. Se pusieron a germinar 100 semillas de cada lote, 25 por caja, y se agregó a cada caja 6 ml de agua destilada estéril. Al cabo de 3 días se determinó el porcentaje de semillas germinadas.

## **8.2 Efecto del NaF sobre semillas calentadas y no calentadas**

Estos ensayos se hicieron con semillas Marcos Juarez-INTA cosecha 1983/84 control y calentadas. Las semillas llamadas "calentadas" fueron todas humectadas y secadas en las mismas condiciones, siguiendo un procedimiento equivalente al descrito en la pág. 19.

Grupos de 50 semillas se pusieron a germinar en cajas de Petri estériles (25 semillas por caja), que contenían 3 papeles de filtro cada una y 6 ml de diferentes medios. Las siembras se hicieron en condiciones de esterilidad, pasando previamente las semillas por lavandina diluida y lavándolas con agua destilada estéril.

### **8.2.1 Medios utilizados:**

- NaCl 0,15 M
- NaF 0,005 M - NaCl 0,145 M
- NaF 0,0075 M - NaCl 0,1425 M
- NaF 0,01 M - NaCl 0,14 M
- NaF 0,0125 M - NaCl 0,1375 M
- NaF 0,015 M - NaCl 0,135 M
- NaF 0,0175 M - NaCl 0,1325M
- NaF 0,02 M - NaCl 0,13 M
- NaF 0,025 M - NaCl 0,125 M
- NaF 0,03 M - NaCl 0,12 M
- NaF 0,04 M - NaCl 0,11 M
- NaF 0,055 M - NaCl 0,095 M

## **9. ENSAYOS DE RESPIRACION**

### **9.1 Aparato utilizado**

Para los ensayos de respiración de las semillas se util

zó un respirómetro diferencial Gilson de válvula simple.

## 9.2 Procedimiento y condiciones del ensayo

El intercambio gaseoso, producido durante la respiración de semillas de trigo Marcos Juárez-INTA, cosecha 1983/84, se midió en diferentes medios, utilizando para los ensayos se millas control y semillas calentadas. Las semillas calentadas fueron tratadas de la misma manera que en la pág. 40.

En cada recipiente del respirómetro se pusieron 30 se millas de aproximadamente el mismo peso total, y en los casos en que se quería medir el consumo de oxígeno solamente, se pu so en el compartimiento central del recipiente un papel de filtro plegado con 0,2 ml de KOH 10 %. Inmediatamente antes de conectarlos al respirómetro, se agregó a las semillas 3 ml de la solución correspondiente. Las muestras se sumergieron todas a la vez en el baño del aparato, que estaba a 30°C, y se dejaron 15 min. con el sistema abierto. A los 15 min. se cerraron las válvulas, y se midió el intercambio gaseoso en función del tiempo a través de los manómetros del equipo, du rante aproximadamente cuatro horas.

## 9.3 Cálculos

Para los cálculos se consideraron los datos tomados entre las 2 y 4 hs después de la imbibición de las semillas.

El equipo consta de micrómetros, calibrados en micro litros de gas, de manera que las lecturas dan directamente los microlitros de gas absorbidos o producidos en cada reci piente del respirómetro, en las condiciones del ensayo.

La velocidad de consumo de  $O_2$  se calculó a partir de la pendiente de la curva de cantidad de  $O_2$  consumido vs. tiempo, en los recipientes con KOH en el compartimiento central. La ve



locidad de producción de  $\text{CO}_2$  se calculó restando a la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  medida anteriormente, la diferencia entre el consumo de  $\text{O}_2$  y la producción de  $\text{CO}_2$ , medida en los recipientes sin KOH.

#### **9.4 Soluciones utilizadas**

- NaCl 0,15 M
- NaF 0,15 M

#### **10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis de varianza (ANAVAR) de dos factores para un límite de confianza del 1%.

Como fuentes de variación se tomaron la temperatura del aire de secado y la humedad inicial de las semillas, analizándose también la interacción de los dos factores.

Las medias calculadas para cada condición de secado, se compararon por medio de un test LSD (menor diferencia significativa) para un nivel de significación del 1%.

## RESULTADOS Y DISCUSION



EFECTO DEL SECADO SOBRE LAS  
PROTEINAS DE EMBRION DE TRIGO



Las proteínas del germen, entre las que se encuentran un gran número de enzimas, tienen un papel fundamental en el desarrollo de la futura planta. Si se utiliza el trigo como semilla, hay que tener en cuenta que una alteración en estas proteínas puede tener como consecuencia que la semilla no ger<sub>u</sub>mine o que la planta tenga un desarrollo anormal.

En el caso particular del secado, se pueden producir temperaturas lo suficientemente altas como para alterar la viabilidad de las semillas, y uno de los principales componentes que sufren deterioro durante este proceso son las proteínas del embrión. Por este motivo se estudiarón las alteraciones producidas en estas proteínas por efecto de la temperatura.

Cuando las proteínas se calientan por encima de una temperatura determinada, generalmente experimentan cambios característicos que son el resultado de modificaciones en su estructura tridimensional. Las proteínas que han sufrido tales cambios se conocen como proteínas desnaturalizadas, y el proceso se denomina desnaturalización (Laidler y Bunting 1973). Estos cambios pueden ponerse en evidencia de distintas maneras: por pérdida de actividad biológica, disminución en la solubilidad, etc. En este capítulo se estudiará, en primer lugar, el proceso de desnaturalización térmica de las proteínas de embrión de trigo, por medio de ensayos calorimétricos efectuados sobre embriones de semillas control. Posteriormente, se analizará la desnaturalización de las proteínas del embrión como consecuencia del secado de la semilla, a través de ensayos calorimétricos, pérdida de solubilidad, y modificaciones en los diagramas electroforéticos.

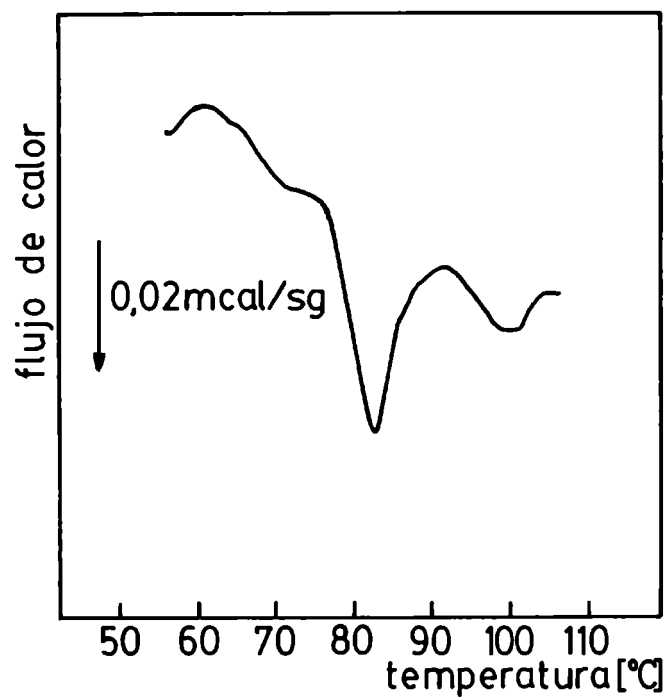
## 1. DESNATURALIZACION TERMICA DE LAS PROTEINAS DE EMBRION

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que permite estudiar los procesos en los que se produce una absorción o un desprendimiento de calor. Esto hace posible utilizar este método para observar la desnaturalización de proteínas por efecto de la temperatura; en este caso, el área de los picos obtenidos en los diagramas de flujo de calor vs temperatura es una medida del calor total requerido para desnaturalizar las proteínas presentes.

Al realizar corridas de DSC de embriones de trigo, se observó en los termogramas un solo pico endotérmico, a una temperatura de 83°C, para una velocidad de calentamiento de 10°C/min (Figura 2). Cuando se habla de temperatura del pico se hace referencia a la temperatura del máximo de la endoterma. Este pico desaparecía al volver a hacer la corrida con la misma muestra, lo que indica que la transición térmica observada es el resultado de un proceso irreversible.

El germen de trigo tiene un alto contenido no sólo de proteínas, sino también de lípidos (Barnes 1982), que podrían ser los responsables del pico observado. Sin embargo, la temperatura a la cual tiene lugar la transición térmica, y el hecho de que se trate de un proceso irreversible, harían que se descartase esta última posibilidad, ya que los lípidos experimentan transiciones reversibles y a temperaturas más bajas (McMurchie 1979, Bishop y col. 1979, Pringle y Chapman 1981, Appell y col. 1982).

Por el contrario, la desnaturalización térmica de las

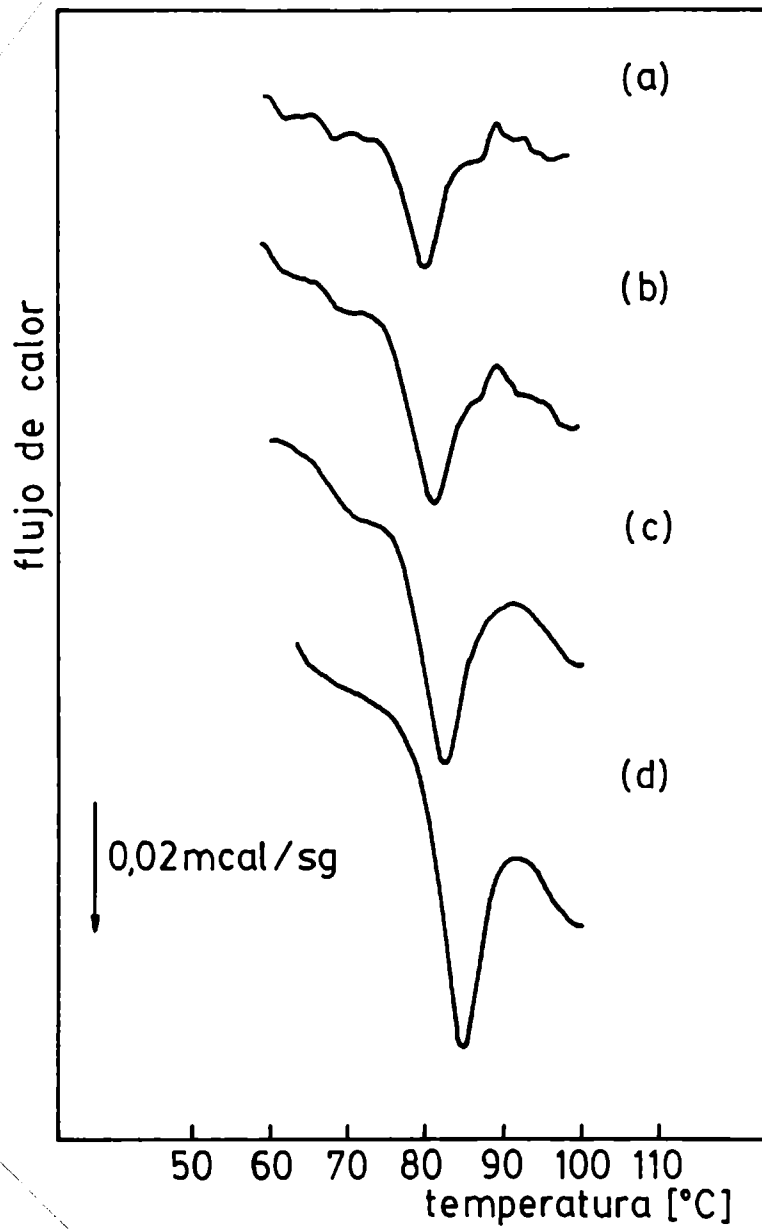


**Figura 2.** Termograma de embriones de trigo de semillas control, obtenido por calorimetría diferencial de barrido. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .



proteínas del embrión en las condiciones del ensayo, sería un proceso irreversible, que estaría de acuerdo con lo observado en el termograma. Con respecto a la temperatura, que fue de 83°C, es más alta que la temperatura a la cual se desnaturaliza la mayor parte de las proteínas. Sin embargo, este valor depende de muchos factores; uno de ellos es la velocidad de calentamiento, que altera la apariencia del termograma. Este efecto se puede entender, en este caso, en términos de una cinética de desnaturalización de proteínas: cuando la temperatura se incrementa lentamente la muestra permanece más tiempo a cada temperatura, y la desnaturalización es completa a una temperatura menor que la observada para una velocidad de calentamiento mayor (Donovan y col. 1975). Para tener una idea de la temperatura a la que comienza la desnaturalización, independientemente de la velocidad de calentamiento, se debe considerar la temperatura a la cual se inicia el pico. En la Figura 3, se pueden observar corridas de DSC de embriones de trigo extraídos de semillas control, a distintas velocidades de calentamiento. Se ve que la temperatura del pico se corre con la velocidad de calentamiento, pero el comienzo de la transición tiene lugar siempre a una misma temperatura, de alrededor de 75°C.

Otro factor que hay que tener en cuenta es la cantidad de agua del sistema, que juega un papel muy importante en la estabilidad térmica de las proteínas. Otros autores encontraron que cuando la relación agua/proteína es menor que un determinado valor, dependiendo de la proteína y del sistema, la desnaturalización térmica aumenta linealmente con el contenido de humedad, observando por calorimetría diferencial de barrido que disminuye la temperatura del pico y aumenta el área. Esto significa que a bajos contenidos de hu



**Figura 3.** Termogramas de embriones de trigo de semillas control obtenidos por calorimetría diferencial de barrido, a distintas velocidades de calentamiento  $\beta$ . **a)**  $\beta = 5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , **b)**  $\beta = 7^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , **c)**  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , **d)**  $\beta = 18^{\circ}\text{C}/\text{min.}$

medad, la temperatura de desnaturalización es más alta, lo que indica que la proteína tiene una mayor estabilidad térmica (Arntfield y col. 1985; Baardseth 1977). Los embriones de trigo utilizados para las corridas de DSC tenían un contenido de humedad muy bajo, de alrededor del 12 %, lo que explicaría también el alto valor observado para la temperatura.

Por último, hay que tener en cuenta en este caso que no se está observando el efecto del calentamiento sobre las proteínas aisladas, sino sobre las proteínas en su medio natural, en el que muy probablemente son más resistentes al calor.

La mayor parte de las proteínas del embrión son albúminas y globulinas (Shurpalekar y Haridas Rao 1977), que son proteínas que presentan una estructura globular y son solubles en soluciones salinas diluidas (Kasarda y col. 1978). Si se compara el valor obtenido para la temperatura del pico, que fue de 83°C, con valores encontrados en bibliografía para otras proteínas globulares, se puede ver que, para la misma velocidad de calentamiento (10°C/min), la ovoalbúmina da un pico de desnaturalización por DSC a 84°C (Donovan y col. 1975), que coincide con la temperatura de desnaturalización encontrada para las proteínas de embrión de trigo (83°C).

El valor de  $\Delta H$  para este proceso se calculó a partir del área del pico, obteniéndose, como promedio de 5 determinaciones, un  $\Delta H$  de 1,43 joules/gramo de embrión (en base seca), con una desviación standard de 0,27. El contenido de proteína total del embrión se determinó por el método de Kjeldahl, como  $N \times 6,25$  (Shurpalekar y Haridas Rao 1977), siendo del 42 % en base seca. Con este dato, se calculó el valor de  $\Delta H$  por gramo de proteína, que fue de 3,42 joules/gramo, que equivalen a 0,8 cal/gramo. El valor de  $\Delta H$  depende, como se vio anterioror

mente, del contenido de humedad del sistema. Así, Baardseth encontró, trabajando con mioglobina de esperma de ballena, que al aumentar el contenido de humedad de 3 a 30 %, se produce un incremento lineal de  $\Delta H$  de 0,5 a 4,8 cal/gr (Baardseth 1977). El resultado obtenido para embrión de trigo, de 0,8 cal/gramo de proteína, está dentro de estos valores, lo que corroboraría una vez más la hipótesis que el pico observado por calorimetría diferencial de barrido se debe a la desnaturalización térmica de las proteínas de embrión.

### **1.1 Determinación de la energía de activación y del factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius**

Antes de considerar el caso particular de la desnaturalización térmica de las proteínas de embrión de trigo, se discutirá el significado de la energía de activación ( $E_a$ ) y del factor preexponencial ( $Z$ ) de la ecuación de Arrhenius.

El método más satisfactorio para expresar la influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción, es el utilizado por Arrhenius a través de la ecuación:

$$k = Z e^{-E_a/RT} \quad (8)$$

donde  $k$  es la constante de velocidad de reacción,  $T$  es la temperatura absoluta y  $R$  es la constante de los gases. En la mayoría de los casos, la variación de la velocidad de desnaturalización de las proteínas con la temperatura obedece esta ley (Laidler y Bunting 1973).

Para explicar la ecuación empírica anterior, Arrhenius sugirió que en cada sistema existe un equilibrio entre moléculas normales y moléculas activadas, y estas últimas son las únicas que pueden tomar parte en la reacción química. Para

que una molécula normal pase a ser una molécula activada, de  
berá adquirir una energía adicional,  $E_a$ , y se acepta generalme  
nte que adquiere esta energía como resultado de intercambios  
que tienen lugar en los choques entre las moléculas. La probabi  
lidad de que una molécula posea energía en exceso en una canti  
dad  $E_a$  por mol, a la temperatura  $T$ , está relacionada con el  
conocido factor de Boltzmann  $e^{-E_a/RT}$ . Si  $Z$ , que se puede denomi  
nar el "factor de frecuencia", representa la frecuencia tota  
l de encuentros entre las moléculas reaccionantes, independe  
ntemente de si poseen o no energía suficiente, la velocidad  
de reacción dependerá del producto de  $Z$  y  $e^{-E_a/RT}$   
(Glasstone 1979).

Queda ahora el problema de interpretar, y si es posible  
calcular, el valor del factor de frecuencia  $Z$ . El tratami  
ento más satisfactorio ha sido dado por Eyring, basándo  
se en el postulado que la velocidad de una reacción química es  
proporcional a la concentración del complejo activado, y que  
este complejo está en equilibrio con los reactivos, siendo  
así gobernado por las leyes usuales de la termodinámica. La  
teoría de las velocidades absolutas de Eyring fue utilizada  
para estudiar la desnaturalización térmica de las proteínas  
bajo diversas condiciones experimentales: hidratación entre  
cero y 45 % de materia seca, temperaturas entre 45 y 175°C,  
proteínas purificadas o mantenidas en el medio celular, toma  
ndo además distintos criterios de desnaturalización  
(Multon 1970).

Hay dos formulaciones de esta teoría: una es la formu  
lación de la mecánica estadística, y otra es una formulaci  
ón termodinámica, que conduce a la expresión para la consta  
nte de velocidad:

$$k = \frac{\bar{k} T}{h} e^{\Delta S^*/R} e^{-\Delta H^*/RT} \quad (9)$$

donde  $k$  es la constante de velocidad,  $\bar{k}$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $h$  es la constante de Plank,  $R$  es la constante de los gases,  $\Delta S^*$  es la entropía de activación y  $\Delta H^*$  es la entalpía de activación.

Sabiendo que  $\Delta H^*$  y la  $E_a$  están relacionados por la expresión:

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (10)$$

queda 
$$k = e \frac{\bar{k} T}{h} e^{\Delta S^*/R} e^{-E_a/RT} \quad (11)$$

y el factor de frecuencia  $Z$  es entonces:

$$Z = e \frac{\bar{k} T}{h} e^{\Delta S^*/R} \quad (12)$$

(Mahler y Cordes 1966, Laidler y Bunting 1973).

$$\text{Sabiendo que } \Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad (13)$$

se puede transformar la ecuación (9) en:

$$k = \frac{\bar{k} T}{h} e^{-\Delta G^*/RT} \quad (14)$$

en la que  $\Delta G^*$  es la energía libre de activación.

En esta expresión se ve claramente que la velocidad específica de cualquier reacción depende de la energía libre de activación, lo que significa que hay que tener en cuenta no sólo el valor de la energía de activación, sino también el valor de  $\Delta S^*$  (Glasstone 1979).

Teniendo ahora presente el significado físico de la energía de activación y del factor preexponencial, se considerará el caso particular de la desnaturalización térmica de las

proteínas del embrión.

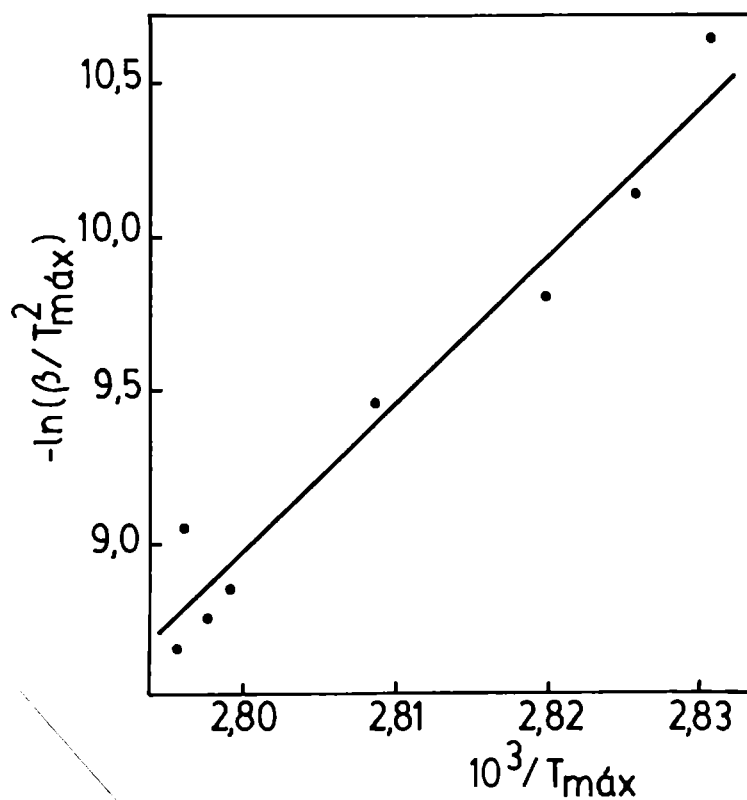
Para calcular la energía de activación de la transi  
ción térmica observada en los termogramas de DSC de embrio  
nes de trigo, que se había atribuido a la desnaturalización  
por calor de las proteínas del embrión, se siguió el método de  
Ozawa, en el que se mide el corrimiento de la temperatura del  
pico en el termograma, por efecto de la velocidad de calentam  
miento. (Materiales y Métodos, pág. 35 ; Figura 3, pág.  
47).

En la Figura 4 se puede ver la recta obtenida al re  
presentar  $-\ln (\beta/T_{\text{máx}}^2)$  vs  $1/T_{\text{máx}}$ , según el método de Ozawa  
(Materiales y Métodos, págs. 35 y 36). Cada punto de la Figur  
a 4 es el promedio de 5 corridas como mínimo, siendo la máxii  
ma desviación standard 0,0029 para  $\ln (\beta/T_{\text{máx}}^2)$  y 0,0040 para  
 $10^3/T_{\text{máx}}$ .

El valor de la energía de activación, obtenido por  
este método, fue de 98,3 Kcal/mol, con un coeficiente de co  
rrelación de 0,97, y el factor preexponencial Z de la ecuac  
ción de Arrhenius, fue de  $7,83 \times 10^{60} \text{ min}^{-1}$ .

En bibliografía se encontraron valores de energías  
de activación para la desnaturalización de proteínas en un  
rango bastante amplio: 40,8 Kcal/mol para tripsina (pH 6,5)  
y 129 Kcal/mol para albúmina de huevo (pH 6,86) (Laidler  
y Bunting 1973). El valor obtenido para embrión de trigo,  
98,3 Kcal/mol, está dentro de este rango, lo que apoyaría la  
suposición de que el pico observado se debe a la desnaturalii  
zación térmica de proteínas.

Estas energías de activación son considerablemente  
mayores que las obtenidas generalmente para reacciones químii  
cas ordinarias, que ocurren en el mismo rango de temperatura.



**Figura 4.** Cálculo de la energía de activación ( $E_a$ ) y del factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius ( $Z$ ) para la desnaturalización térmica de proteínas de germen de trigo, utilizando calorimetría diferencial de barrido.  $\beta$  = velocidad de calentamiento (K/min.),  $T_{máx.}$  = temperatura del pico (K).



Cuando una reacción se produce a una velocidad medible a temperaturas relativamente bajas, generalmente tiene una energía de activación también baja; un valor de 40 Kcal o más usualmente significa que la velocidad no llegará a ser apreciable hasta que se alcancen altas temperaturas. La desnaturalización de proteínas tiene entonces energías de activación anormalmente altas desde el punto de vista de sus velocidades, y esto significa que sus entropías de activación son también anormalmente altas, mucho mayores que las encontradas usualmente en reacciones químicas (Laidler y Bunting 1973), ya que, como se vio anteriormente, la velocidad de una reacción química depende no sólo del valor de su energía de activación, sino también del valor de  $\Delta S^*$ . En la sección siguiente se discutirá el valor calculado para la entropía de activación de esta reacción comparándolo con valores encontrados en bibliografía para otras proteínas globulares.

## **1.2 Cálculo de los parámetros termodinámicos del estado activado**

Los parámetros termodinámicos del estado activado, para la transición térmica observada en los termogramas de DSC de embriones de trigo,  $\Delta S^*$  (entropía de activación),  $\Delta H^*$  (entalpía de activación) y  $\Delta G^*$  (energía libre de activación), se calcularon a partir de la teoría de las velocidades absolutas de reacción de Eyring, con los valores de la constante de velocidad y de la energía de activación determinados experimentalmente. Los cálculos se hicieron para una temperatura de 83°C, correspondiente a la temperatura del pico en los termogramas de DSC. Para los cálculos se utilizaron las expresiones (8), (10), (13) y (14) de la sección anterior (págs. 49 y 51).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.

Tabla II : Parámetros termodinámicos del estado activado<sup>(1)</sup>

$\Delta H^*$ (cal/mol)	$\Delta S^*$ (u.e. <sup>(2)</sup> /mol)	$\Delta G^*$ (cal/mol)
97.500	210	22.800

(1) Los cálculos se hicieron para una temperatura de 83°C.

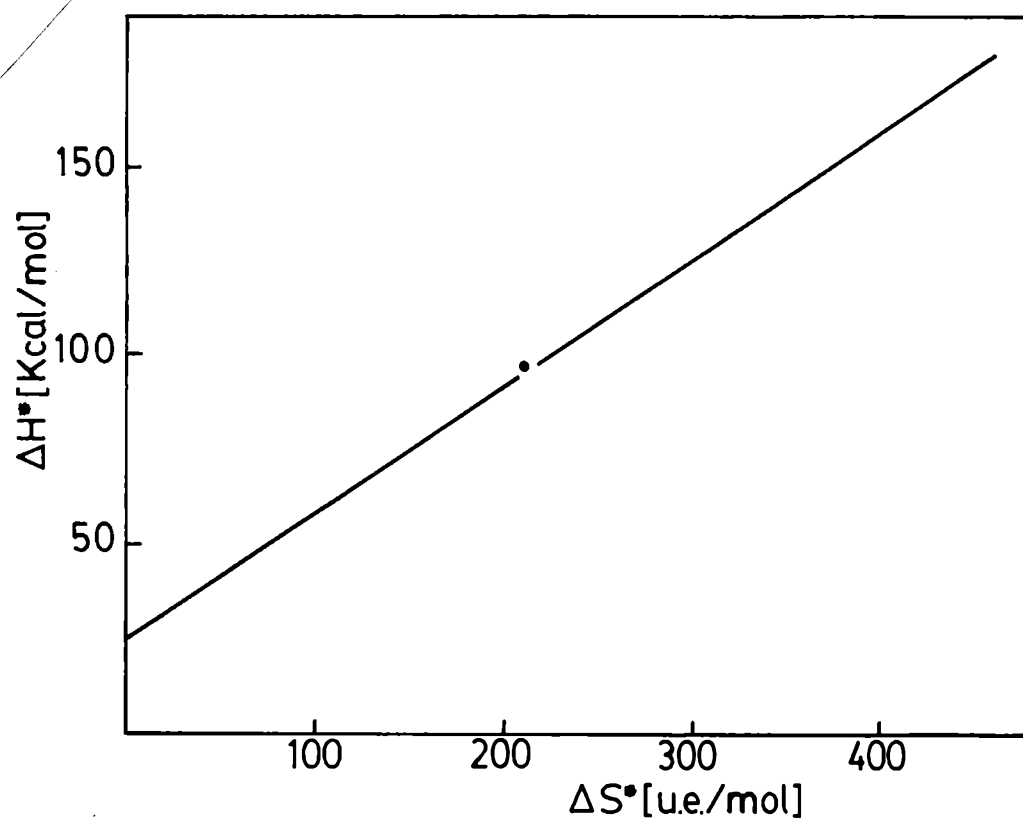
(2) u.e. = unidades entrópicas.

Los valores correspondientes a las entropías de activación encontrados en bibliografía, para las proteínas citadas en la sección anterior, son 44,7 ue/mol y 298,4 ue/mol para tripsina y albúmina de huevo respectivamente (Laidler y Bunting 1973). La entropía de activación calculada para la transición térmica observada en los termogramas de DSC de embriones de trigo, 210 ue/mol (Tabla II), está dentro de estos valores. Nuevamente, esto apoya la idea de que el pico obtenido por calorimetría diferencial de barrido corresponde a la desnaturalización térmica de proteínas del embrión.

Multon, al estudiar la desnaturalización térmica de las proteínas, encontró que existe una correlación lineal altamente significativa entre las variaciones de entalpía y de entropía de activación, obteniendo la siguiente relación (Multon 1970):

$$\Delta S^* = 0,0030 \Delta H^* - 0,075 \quad (15)$$

En la Figura 5 se muestra la recta que representa la ecuación (15) obtenida por Multon, y el punto correspondiente



**Figura 5.** Relación entre las variaciones de entalpía y de entropía de activación, obtenida por Multon para la desnaturalización térmica de proteínas. El punto representado en la recta corresponde al pico observado en las corridas de calorimetría diferencial de barrido de germen de trigo.

te al pico observado en las corridas de DSC de embrión de trigo, que cae dentro de la recta, cumpliendo la relación anterior.

### 1.3 Cinética del proceso estudiado

La velocidad instantánea de una reacción que involucra sólo una sustancia reactiva A, es proporcional a la concentración de esa sustancia elevada a la n. Para calcular el valor de n hay dos caminos: un método consiste en hacer una corrida simple, es decir, permitir que la reacción prosiga, y determinar la concentración de A a varios tiempos. El valor de n determinado de esta manera se conoce como "orden con respecto al tiempo", ya que se ha determinado en una corrida en la que el tiempo es la variable. En el segundo método, se hacen varias corridas para distintas concentraciones de A, y se determina la velocidad de reacción a tiempo cero. El orden determinado de esta manera se conoce como "orden con respecto a la concentración", ya que en este caso la variable es la concentración.

La intención de este trabajo es estudiar la desnaturalización térmica de las proteínas de trigo, por calentamiento de la semilla entera o del embrión; para ello se determinará la cinética del proceso midiendo la concentración de proteína nativa (A) por distintos métodos a tiempos diferentes, partiendo siempre de la misma concentración de proteína, dado que es imposible variar ésta por ser la concentración propia de la semilla entera o del embrión.

En esta sección se determinará, entonces, el orden de reacción con respecto al tiempo para la desnaturalización térmica de proteínas de embrión de trigo, a través de ensa

yos de calorimetría diferencial de barrido.

La desnaturalización de proteínas sigue frecuentemente una cinética de primer orden (Donovan y col. 1975, Laidler y Bunting 1973), por lo que se postuló en principio una cinética de este tipo para la transición térmica observada en los termogramas de DSC de embrión de trigo, atribuida a la desnaturalización de proteínas por efecto de la temperatura. Se empleó un método isotérmico (Materiales y Métodos, pág. 36 ) para verificar el orden de reacción propuesto y confirmar los valores de energía de activación y factor preexponencial determinados por el método dinámico (Materiales y Métodos, pág. 35 ; Resultados y Discusión, pág. 52 ), que era independiente del orden de reacción.

El método isotérmico consiste básicamente en predecir un tiempo de vida media conveniente para la reacción, a una temperatura determinada, utilizando los valores cinéticos obtenidos por el método dinámico. En este caso se utilizó una ecuación de primer orden para calcular el tiempo de vida media. La muestra se somete a un tratamiento isotérmico durante el tiempo predicho, y luego se corre en el calorímetro diferencial de barrido. Si el área del pico por gramo de muestra es la mitad del valor obtenido a partir de una muestra equivalente sin tratamiento isotérmico  $\pm 10\%$  (A.N.S.I./A.S.T.M. E 698 1979), la predicción fue correcta y la cinética de la reacción queda verificada (Duswalt 1974). Este ensayo se hizo para tres temperaturas diferentes, obteniendo un área promedio que fue el  $45,9\% \pm 3,9$  del área correspondiente a la muestra sin tratamiento isotérmico, lo que indicaría que la predicción del orden de reacción y los datos cinéticos calculados fueron correctos.

## 2. ALTERACIONES SUFRIDAS POR LAS PROTEINAS DE EMBRION DE TRIGO COMO CONSECUENCIA DEL SECADO

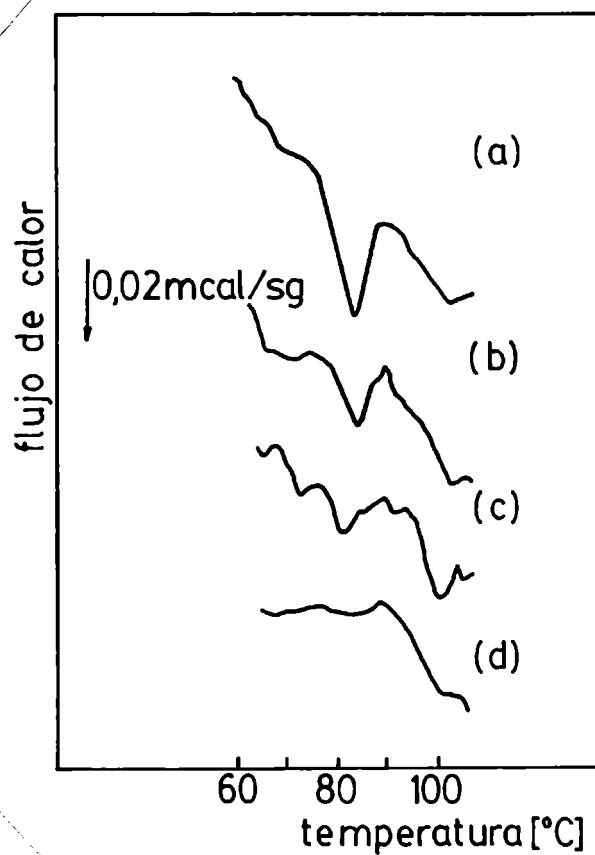
Después de haber estudiado la cinética de desnaturalización térmica de las proteínas de germen de trigo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se analizarán las alteraciones sufridas por estas proteínas como consecuencia del secado de las semillas.

### 2.1 Variación del $\Delta H$ de desnaturalización con las condiciones de secado

Los termogramas de DSC de embriones de trigo provenientes de semillas que habían sido secadas en las condiciones de la Tabla I, muestran una disminución en el área de los picos, de acuerdo con las condiciones de secado, con respecto a las semillas control. En la Figura 6 se muestran algunos termogramas característicos obtenidos. Este resultado era esperable, ya que los embriones provenientes de semillas secadas por calor podían tener sus proteínas desnaturalizadas en mayor o menor medida antes de efectuar la corrida de DSC.

En la Tabla III se muestran los valores de  $\Delta H$  promedio, obtenidos a partir de las áreas de los termogramas para cada condición de secado. Cada valor es el promedio de 4 a 7 corridas, con una desviación standard máxima de 0,073.

Con todos los datos se hizo un análisis de varianza, tomando como fuentes de variación la temperatura del aire durante el secado y la humedad inicial de las semillas. Como resultado se observó que había diferencias en las áreas correspondientes a distintos lotes de semillas a un nivel de significación del 1 %, tanto al variar la humedad inicial como la



**Figura 6.** Termogramas de calorimetría diferencial de barrido de embriones de trigo correspondientes a semillas secadas en distintas condiciones. **a)** Ia, **b)** IIIa, **c)** IIb, **d)** IIIc. La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

temperatura del aire. Asimismo, se encontró que existía una interacción entre los dos factores, al mismo nivel de significación.

Tabla III: Entalpías de desnaturalización de proteínas de germen de trigo, proveniente de semillas secadas en distintas condiciones (1) (2)

Condiciones de secado	Control	I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>
ΔH (cal/gr)	0,342	0,224	0,203	0,174	0,189

Condiciones de secado	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
ΔH (cal/gr)	0,078	0,026	0,127	0,020	0,025

(1) Las condiciones de secado son las especificadas en la Tabla I.

(2) Los resultados están expresados en cal. por gramo de embrión en base seca.

Las relaciones de varianzas obtenidas fueron 12,77 y 31,01, para la temperatura del aire y el contenido de humedad inicial como fuentes de variación respectivamente, ambas mayores a la razón de varianzas de tabla, que es de 5,18, para un nivel de significación del 1 % y los grados de libertad correspondientes. El análisis de la interacción entre estas dos fuentes de variación, dio una relación de varianzas de 5,08,



superior a la de tabla, que es de 3,83 para este nivel de significación.

Estos resultados se utilizaron para estimar la temperatura del embrión durante el secado.

**2.1.1 Determinación de la temperatura del embrión para cada condición de secado:** La temperatura de las semillas durante el secado se midió con termocuplas puestas entre los granos y en el interior de los mismos. En la Figura 1 (pág. 22) se muestra una historia térmica característica, correspondiente a una de las condiciones de secado. Se puede observar que la superficie de las semillas alcanzó temperaturas más altas durante el secado que el interior de las mismas, y aún en el interior de las semillas se obtuvieron historias térmicas algo diferentes entre sí, posiblemente por encontrarse las termocuplas en distintos puntos del interior. Por otra parte, dadas las características del sistema de secado, con aire casi estanco, la temperatura de las semillas fue en todo momento mucho menor que la del aire, y fue aumentando continuamente durante todo el secado, rápidamente al principio y muy lentamente al final. Todo esto hace que no se pueda obtener a partir de las historias térmicas un valor único para la temperatura de la semilla en cada condición de secado. Por otro lado, la temperatura del embrión no se midió durante este proceso, y debido a su posición en el grano se esperaba que su temperatura haya sido superior a la del interior de las semillas, de manera que los datos de temperatura del interior del grano no podrían usarse para el caso del embrión.

Todos estos motivos hicieron que se determinara la temperatura del embrión durante el secado en forma indirecta, a partir de ensayos de calorimetría diferencial de barrido,

de la siguiente manera: los valores de  $\Delta H$  de la Tabla III (pág. 61 ) son una medida del calor total requerido para desnaturalizar las proteínas. Considerando que el valor de  $\Delta H$  por gr. de proteína nativa es un valor constante, cuanto mayor sea la cantidad de proteína nativa en el embrión, mayor será el valor de  $\Delta H$  por gr. de embrión, de donde resulta que este valor es una medida de la cantidad de proteína nativa determinable por este método. Así, asumiendo una cinética de primer orden para la desnaturalización térmica de proteínas de embrión (Resultados y Discusión, pág. 57), se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad (k) para cada condición de secado a partir de la expresión:

$$k = \frac{2,303}{t} \log \frac{A_0}{A} \quad (16)$$

donde t es el tiempo en min., y  $A_0$  y A son los valores de  $\Delta H$  a tiempo cero y a tiempo t respectivamente. Así,  $A_0$  sería una medida de la totalidad de proteína nativa por gr. de embrión determinable por este método, y A sería una medida de la proteína que no se desnaturalizó durante el proceso de secado. Con los datos de k, y teniendo la energía de activación y el factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius por el método de Ozawa (Resultados y Discusión, pág. 52), se calculó la temperatura del embrión durante el secado mediante la ecuación de Arrhenius, para cada condición de secado.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. Estas temperaturas concuerdan con las temperaturas medidas en las termocuplas colocadas en el interior del grano, cerca de su superficie.

Tabla IV: Temperatura equivalente del embrión durante el secado<sup>(1)</sup>.

Condiciones de secado	I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
Temperatura (°C)	69,3	70,3	71,6	69,0	71,4	73,1	69,0	71,9	72,3

(1) Las condiciones de secado son las de la Tabla I.

Estas temperaturas no son valores reales sino equivalentes, el embrión se comporta como si hubiera estado sometido a cada una de estas temperaturas durante todo el tiempo que duró el tratamiento térmico. Los valores obtenidos son coherentes con las historias térmicas de las semillas: se observa que, tal como se esperaba, la temperatura del embrión es superior a la del interior del grano. Se puede ver también que hay una correlación entre la temperatura del aire y la temperatura final del interior de las semillas (Tabla I, pág. 21), con respecto a la temperatura calculada para el embrión: para semillas con igual contenido de humedad inicial, al aumentar la temperatura del aire y del interior del grano (de a a c) también aumenta la temperatura del embrión. Las temperaturas calculadas son también cercanas a la temperatura del comienzo de la transición térmica en los diagramas de DSC, que como se había visto (Resultados y Discusión, pág. 46) es independiente de la velocidad de calentamiento.

La temperatura del embrión calculada de esta manera se va a utilizar posteriormente para análisis cinéticos.

## **2.2 Modificaciones producidas por el secado de la semilla sobre la estructura de las proteínas del embrión**

Al estudiar las alteraciones producidas en las proteínas del embrión como consecuencia del secado de las semillas, hay que tener presente que el tratamiento térmico no se hizo sobre proteínas aisladas, sino sobre proteínas en su medio natural, con contenidos de humedad entre 25% y 10-14 %.

Una de las evidencias más obvias de los cambios conformacionales en la estructura proteica, es la alteración en la solubilidad de las proteínas (Laidler y Bunting 1973). Lo primero que se hizo, entonces, fue estudiar los cambios en la solubilidad experimentados por las proteínas del embrión de trigo como consecuencia del secado. Para ello, se eligió como medio de extracción una solución salina, ya que la mayor parte de las proteínas del embrión son albúminas y globulinas, ambas solubles en este medio en su estado nativo (Shurpalekar y Haridas Rao 1977).

**2.2.1 Alteraciones en la solubilidad de las proteínas:** Antes de analizar los cambios en la solubilidad de las proteínas como consecuencia del secado, se discutirán algunos aspectos del método de extracción utilizado, en relación al rendimiento obtenido. El contenido de proteína total del embrión se determinó por el método de Kjeldahl, como  $N \times 6,25$  (Shurpalekar y Haridas Rao 1977), obteniendo un valor de 36,8 % en base húmeda. La medida de proteínas solubles en solución salina se hizo por el método de Lowry, y dio como resultado en semillas control 16,9 mg de proteína soluble en este medio por cada 100 mg de embrión, también en base húmeda. Este valor es el 46 % del correspondiente a proteína total. Si se considera

que las albúminas y globulinas (que son las proteínas solubles en soluciones salinas diluidas) constituyen aproximadamente el 60% del N proteico del embrión (Shurpalekar y Haridas Rao 1977), el rendimiento obtenido fue de alrededor del 77 %.

En la Tabla V, se pueden ver los porcentajes de proteína soluble de embrión para cada condición de secado de las semillas. Los valores están expresados tomando el correspondiente a semillas control como 100%.

Tabla V: Contenido relativo de proteína soluble de embrión de trigo, proveniente de semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)</sup>.

Condiciones de secado	Control	I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
% proteína soluble respecto al control	100	92	86	85	91	75	72	83	76	68

(1) Las condiciones de secado son las especificadas en la Tabla I.

Con estos resultados se hizo un análisis de varianza, tomando como fuentes de variación la temperatura del aire de secado y la humedad inicial de las semillas. El análisis dio como resultado que existen diferencias significativas a un nivel de significación del 1% en la solubilidad de las proteínas como consecuencia de los distintos tratamientos térmicos de las semillas. No se observó en este caso una interac

ción significativa entre los dos factores considerados (temperatura y humedad inicial).

Las relaciones de varianzas obtenidas fueron 12,62 y 10,34, para la temperatura del aire y el contenido de humedad inicial como fuentes de variación respectivamente, ambas mayores a la razón de varianzas de tabla, que es de 6,70, para un nivel de significación del 1 % y los grados de libertad correspondientes.

Con el objeto de analizar en forma independiente cada condición de secado, se hizo un análisis LSD (mínima diferencia significativa) comparando las medias de cada población. En primer lugar se tomó como fuente de variación la temperatura del aire, tomando para cada población los lotes de semillas que fueron secados a la misma temperatura del aire, independientemente de su contenido de humedad inicial. El análisis dio como resultado que existen diferencias significativas al nivel de significación del 1% en la solubilidad de las proteínas, entre las semillas secadas a la temperatura del aire de 110°C y las secadas a las temperaturas de 125 y 140°C, no encontrándose diferencias entre estas dos últimas temperaturas. De la misma manera, tomando como fuente de variación la humedad inicial de las semillas, independientemente de la temperatura de secado, se encontró que existen diferencias significativas a un nivel de significación del 1% entre las semillas con un contenido de humedad inicial de 17%, y las semillas con contenidos de humedad de 21 % y 25 %, no encontrándose diferencias entre estas dos últimas poblaciones. Se obtuvieron resultados similares al comparar las nueve condiciones de secado individualmente. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla VI. Los valores de LSD para un nivel de significación del 1 %, fueron 8,43, si se toma como fuente

te de variación la temperatura del aire o el contenido de humedad inicial, y 14,60, si se comparan las nueve condiciones de secado individualmente.

Tabla VI: Diferencias entre las medias de poblaciones de semillas secadas en distintas condiciones, en relación a su contenido de proteína soluble de embrión (1) (2).

a) Tomando como fuente de variación la temperatura del aire de secado (a = 110°C, b = 125°C, c = 140°C):

$$|\bar{X}_a - \bar{X}_b| = \boxed{9,75} \quad |\bar{X}_b - \bar{X}_c| = 3,90$$

b) Tomando como fuente de variación el contenido de humedad inicial de las semillas (I = 17 %, II = 21 %, III = 25 %):

$$|\bar{X}_I - \bar{X}_{II}| = \boxed{8,93} \quad |\bar{X}_{II} - \bar{X}_{III}| = 3,38$$

c) Tomando cada condición de secado individualmente<sup>(3)</sup>:

I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>	Condiciones de secado
-	6,60	7,05	2,10	$\boxed{17,45}$	$\boxed{20,90}$	9,40	$\boxed{16,70}$	24,50	I <sub>a</sub>
-	-	0,45	4,50	10,85	14,30	2,80	10,10	17,90	I <sub>b</sub>
-	-	-	4,95	10,40	13,85	2,35	9,65	17,45	I <sub>c</sub>
-	-	-	-	$\boxed{15,35}$	$\boxed{18,80}$	7,30	14,60	$\boxed{22,40}$	II <sub>a</sub>
-	-	-	-	-	3,45	8,05	0,75	7,05	II <sub>b</sub>
-	-	-	-	-	-	11,50	4,20	3,60	II <sub>c</sub>
-	-	-	-	-	-	-	7,30	$\boxed{15,10}$	III <sub>a</sub>
-	-	-	-	-	-	-	-	7,80	III <sub>b</sub>
-	-	-	-	-	-	-	-	-	III <sub>c</sub>

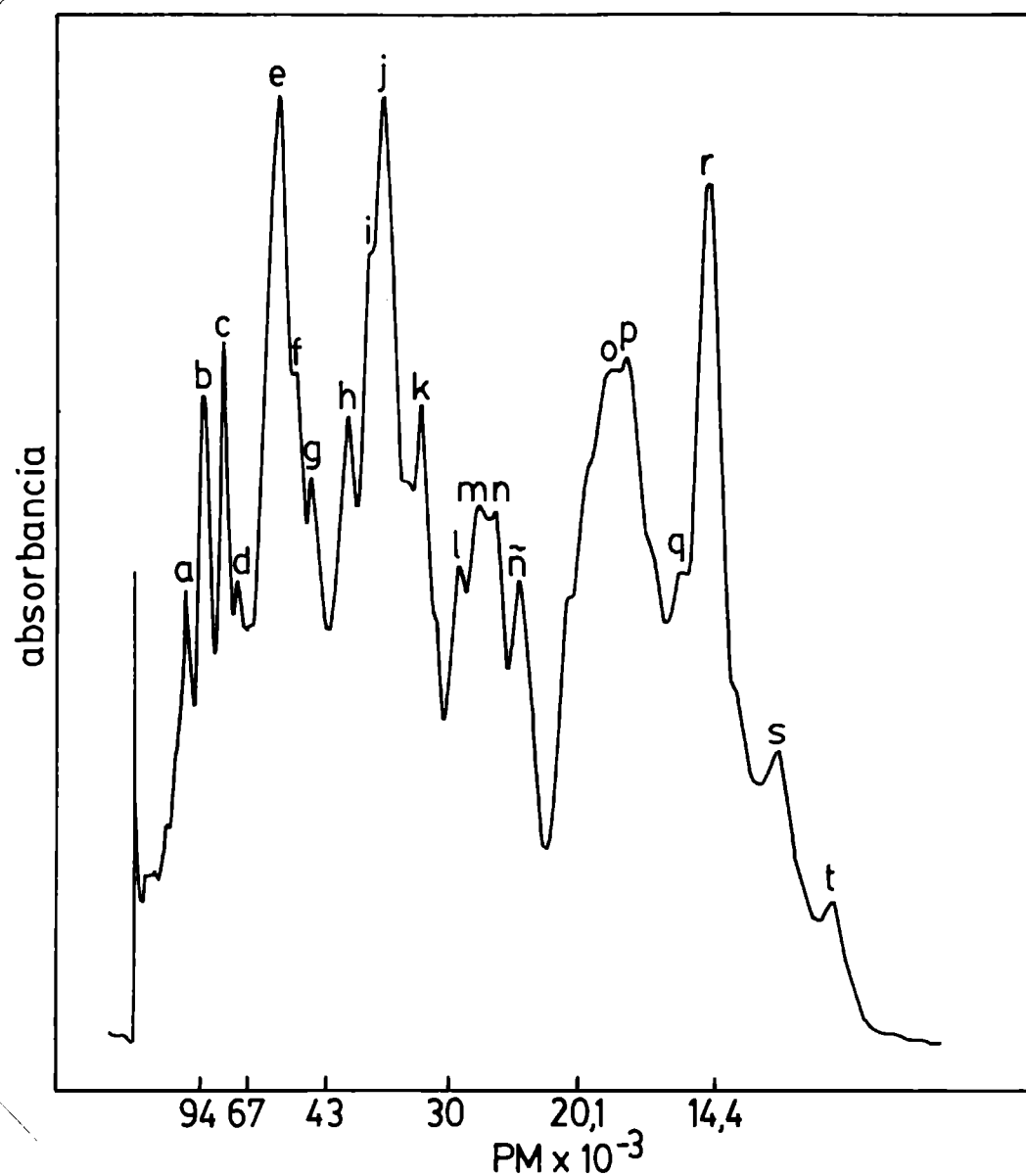
- (1) La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I.
- (2) Los valores recuadrados son diferentes al nivel de significación del 1 %.
- (3) Los valores de esta Tabla son las diferencias entre las medias de las semillas secadas en las condiciones de las columnas, con respecto a las secadas en las condiciones de las filas.

El tercer factor que tiene influencia en el deterioro producido en las semillas durante el secado, es el tiempo que dura el tratamiento térmico. El tiempo no es una variable independiente, ya que si se fija el contenido de humedad inicial y la temperatura, si se quiere llevar los granos a un contenido de humedad preestablecido, el tiempo queda determinado por las otras dos variables. No obstante, se puede analizar la influencia del tiempo y la temperatura de secado, comparando los resultados de solubilidad obtenidos con semillas que partieron del mismo contenido de humedad inicial y llegaron al mismo rango de humedad final, a través de diferentes tratamientos térmicos (temperatura y tiempo). Se observa que a medida que aumenta la temperatura, tanto del aire como del embrión (Tablas I y IV, (págs. 21 y 64 ) la solubilidad de las proteínas del embrión disminuye, a pesar de que el tiempo de exposición a cada temperatura es cada vez menor. Esto mismo se había observado en el caso de  $\Delta H \%$  (Tabla III, pág. 61 ), e indicaría que la temperatura es un factor más crítico en el deterioro de la semilla que el tiempo de secado. Se volverá a discutir este punto al analizar el deterioro de la semilla a través de otros métodos.

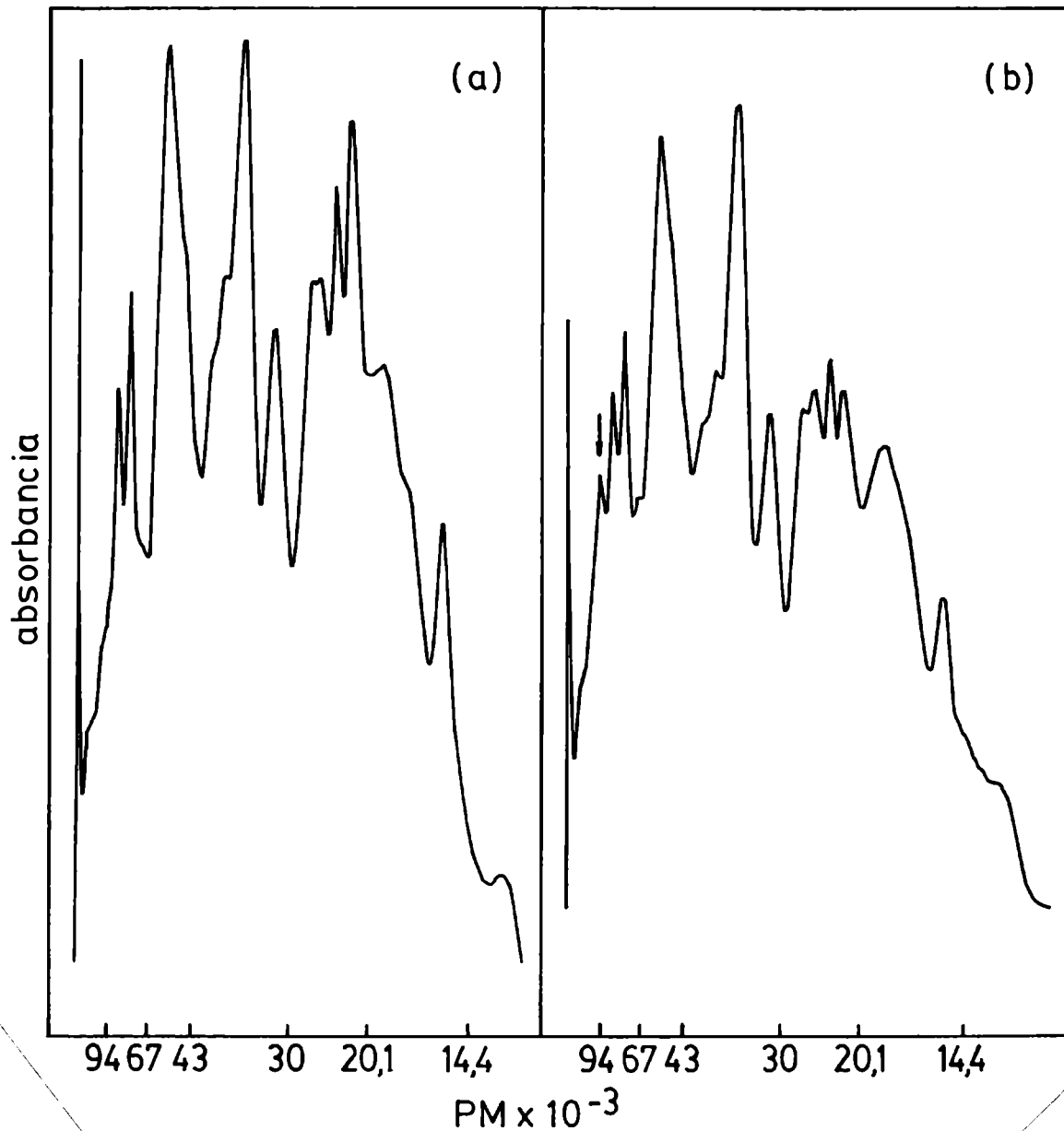


**2.2.2 Caracterización de algunas especies proteicas presentes en el medio de extracción:** con el fin de analizar las especies proteicas solubles en el medio de extracción, correspondientes a embriones de semillas que no fueron sometidas a ningún tratamiento térmico, y clasificarlas según su peso molecular, se hicieron electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS), de extractos proteicos tratados previamente con SDS y ME, o sólo con SDS. De esta manera, en el caso de las muestras tratadas con SDS y ME, las bandas observadas corresponderán a proteínas formadas por una sola cadena o a cadenas polipeptídicas separadas provenientes de una proteína oligomérica; mientras que en las muestras tratadas sólo con SDS se observarán bandas correspondientes a proteínas formadas por una sola cadena, a proteínas formadas por más de una cadena unidas por puentes disulfuro, o a especies proteicas que hayan estado unidas por enlaces no covalentes. Se eligió un tamaño de poro del medio de corrida tal que actuase como tamiz molecular, y la presencia de SDS hizo que las especies proteicas presentes se separaran sólo por tamaño.

En la Figura 7 se muestra una densitografía característica de un extracto de proteínas de embrión de semillas control, con los pesos moleculares de los picos. Se puede observar un gran número de bandas, que corresponden a albúminas y globulinas de embrión, ambas solubles en el medio salino de extracción. Dentro de estas fracciones proteicas se encuentran principalmente enzimas solubles y aminoácidos libres, y probablemente también nucleoproteínas y algunas proteínas relacionadas con membranas y paredes celulares (Kasarda y col. 1978; Bourdet y Feillet 1967; Doll 1977).



**Figura 7.** Diagrama electroforético de proteínas de embrión de trigo de semillas control. La corrida se hizo en gel de poliacrilamida con SDS. La muestra fue tratada con SDS y ME antes de sembrar. Pesos moleculares de los picos: a = 96.500, b = 86.400, c = 77.300, d = 70.700, e = 54.100, f = 49.500, g = 45.300, h = 39.500, i = 37.100, j = 35.500, k = 32.000, l = 28.800, m = 27.300, n = 25.900, ñ = 24.100, o = 18.500, p = 17.700, q = 15.300, r = 13.900, s = 11.600, t = 9.900.



**Figura 8.** Diagramas electroforéticos de proteínas de germen de trigo de semillas control. La corrida se hizo en gel de poliacrilamida con SDS. **a)** La muestra fue tratada con SDS antes de sembrar. **b)** La muestra fue tratada con SDS y ME antes de sembrar. La flecha señala un pico que aparece en la muestra tratada con ME.

Si se comparan los dos diagramas electroforéticos de la Fig. 8, que corresponden a extractos proteicos tratados y no tratados con ME, se observa que la diferencia más apreciable entre los dos tratamientos, es la aparición o el aumento de un pico de peso molecular 96.500 daltons, en el caso de la muestra tratada con ME. En este pico se encontrarían subunidades proteicas de PM 96.500, que estarían en el embrión unidas entre sí o a otras subunidades a través de puentes disulfuro, formando parte de una proteína de mayor peso molecular. Habría diferencias también en la zona de peso molecular 20.000, pero se observaron sólo en algunas corridas, por lo que hay que considerarlas con cautela. El resto del diagrama electroforético es muy similar para las muestras tratadas y sin tratar con mercaptoetanol lo que llevaría a pensar que gran parte de estas proteínas no tendrían puentes disulfuro intercatenarios. No se encontraron datos en bibliografía que corroboren este resultado en embrión, pero se puede hacer un paralelismo con endosperma, donde se encontraron proteínas correspondientes a la fracción de albúminas, que contenían puentes disulfuro intracatenarios, no apareciendo diferencias de peso molecular al tratarlas con mercaptoetanol (Kasarda y col. 1978).

**2.2.3 Efecto diferencial del tratamiento térmico sobre diferentes especies proteicas del embrión:** hasta ahora se ha observado el efecto del secado sobre un número más o menos grande de proteínas diferentes, que pueden contribuir de manera distinta a los valores obtenidos de  $\Delta H$  y solubilidad.

Después de haber analizado las especies proteicas presentes en el medio de extracción dentro de un rango de peso molecular, a través de electroforesis en geles de polia

crilamida con SDS de los extractos de proteína, tratados o no con ME, se estudiarán ahora las modificaciones del diagrama electroforético producidas como consecuencia del secado de las semillas.

Para ello se hicieron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida con SDS de extractos de proteínas de embrión, provenientes de semillas secadas en distintas condiciones. Las condiciones de secado fueron las especificadas en la Tabla I (Materiales y Métodos, pág. 21 ). Las proteínas de germen se extrajeron con solución salina, de manera que los extractos analizados fueron equivalentes a los extractos en los cuales se había determinado la concentración de proteína soluble (Resultados y Discusión, pág. 65 ), pudiendo relacionarse ambos resultados.

Las muestras se trataron, antes de sembrar, con SDS y ME, de manera que las proteínas se desnaturalizaron y se separaron las cadenas de las proteínas oligoméricas. Lo que se va a observar en los geles son todas las especies proteicas, tanto las que estaban en su forma nativa como las que estaban desnaturalizadas antes del agregado de SDS y ME, que sean solubles en el medio de extracción, y que posean un tamaño adecuado para entrar en el gel.

En la Figura 9 se puede ver un gel característico, en el que se observa la disminución de bandas, principalmente en la zona de peso molecular 75.000, según las condiciones de secado de las semillas. Las flechas señalan bandas que se van haciendo cada vez menos intensas, a medida que las condiciones de secado se hacen más drásticas. En la Figura 10 se muestran densitografías típicas, obtenidas a partir de estos geles,

en las que se puede observar claramente este resultado.

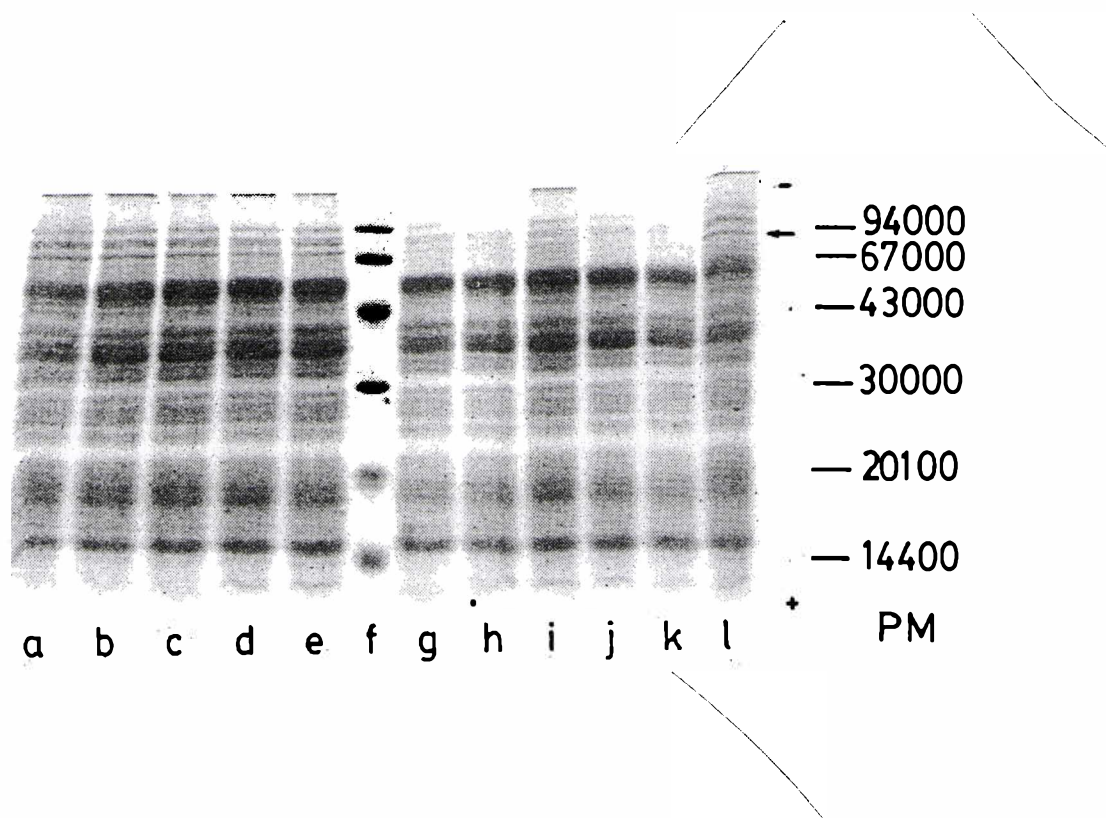
A partir de estos diagramas, se determinó la longitud relativa de dos de los picos que disminuían de acuerdo a las condiciones de secado (flechas verticales de la Figura 10), con referencia a otro pico que no presentaba este comportamiento (flecha horizontal de la Figura 10). En la Tabla VII se pueden ver los valores obtenidos, expresados como porcentajes del control.

Tabla VII: Altura relativa de picos, correspondientes a especies proteicas solubles de embrión del mismo peso molecular, para distintas condiciones de secado de las semillas<sup>(1)</sup>.

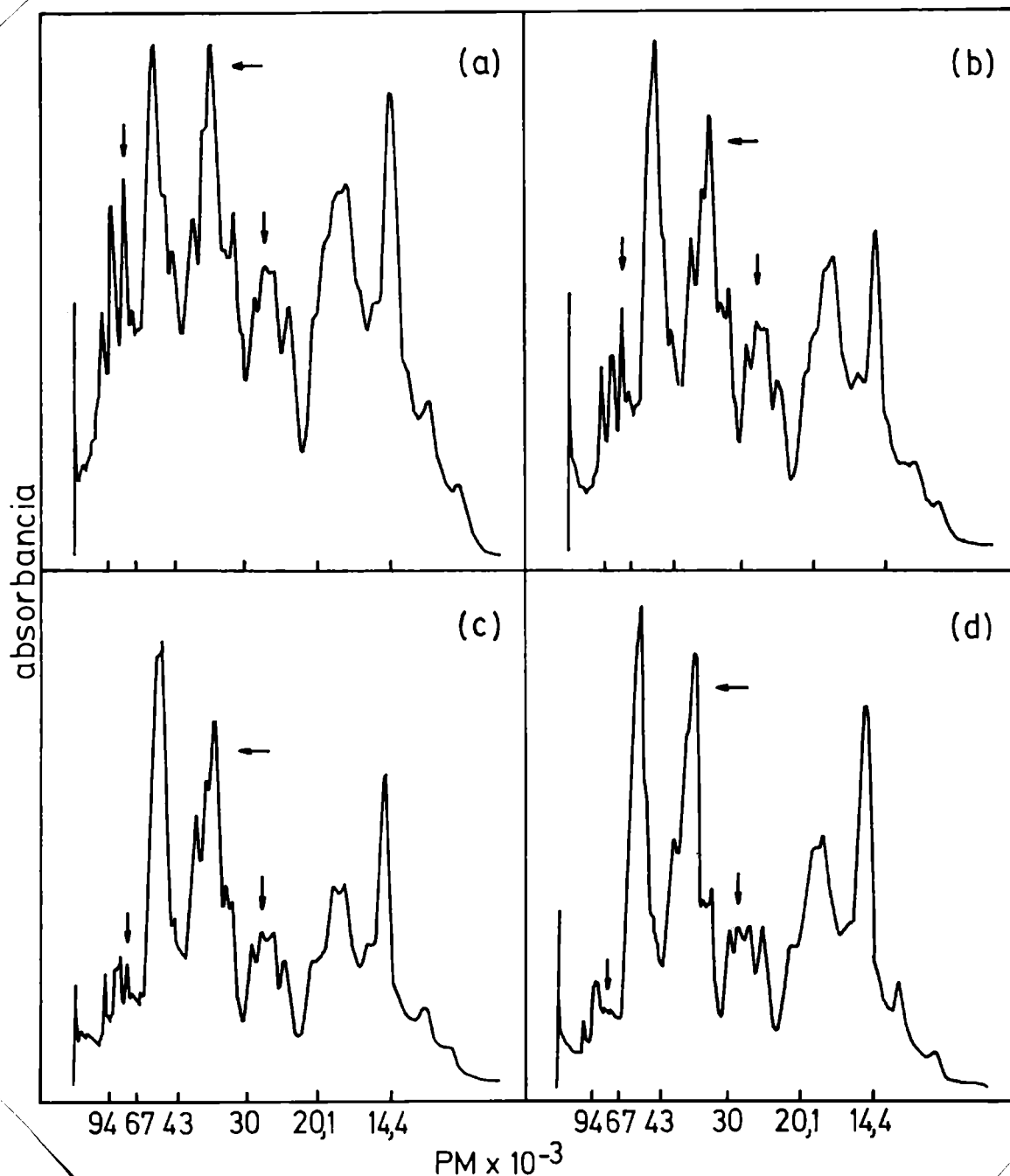
Condiciones de secado		I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
Altura relativa	Pico de bajo PM	91	93	83	87	74	63	83	67	63
	Pico de alto PM	66	63	51	67	32	19	47	22	15

(1) Las condiciones de secado son las especificadas en la Tabla I.

Al igual que en el caso de solubilidad, se puede observar que, para semillas que partieron del mismo contenido de humedad inicial, al aumentar la temperatura del embrión durante el secado, las bandas correspondientes a determinadas especies proteicas disminuyen, a pesar de que el tiempo de exposición a esa temperatura también disminuye. Esto indica una vez más que la temperatura tiene una mayor incidencia en las alteraciones sufridas por la semilla que el tiempo de secado.



**Figura 9.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de proteínas de germen de trigo de semillas control y de semillas secadas en distintas condiciones: a) control, b) Ia, c) Ib, d) Ic, e) IIa, f) patrones, g) IIb, h) IIc, i) IIIa, j) IIIb, k) IIIc, l) control. La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I. Las flechas señalan algunas bandas que se hacen menos intensas con el secado de las semillas.



**Figura 10.** Diagramas electroforéticos de proteínas de germen de trigo correspondientes a semillas secadas en distintas condiciones. a) control, b) Ib, c) IIb, d) IIIc. La nomenclatura es la utilizada en la Tabla I. Las flechas verticales señalan dos picos que disminuyen a medida que las condiciones de secado se hacen más drásticas. Las flechas horizontales señalan un pico que no presenta este comportamiento. Las corridas se hicieron en geles de poliacrilamida con SDS. Las muestras se trataron con SDS y ME antes de sembrar.



El hecho de que disminuya la intensidad de determinadas bandas puede deberse a varias razones: por un lado, las proteínas correspondientes se pueden haber desnaturalizado durante el secado, y posteriormente pueden haber formado agregados insolubles en el medio de extracción. De esta manera, no estarían presentes en los extractos ni en el gel. Esto tendría lugar en mayor o menor grado según las condiciones de secado, y daría como resultado una disminución del porcentaje de proteína soluble. Sin embargo, aunque la disminución de estas bandas puede contribuir en algo, no sería suficiente para explicar la pérdida de solubilidad que se observó en la sección anterior, ya que son una fracción muy pequeña de las proteínas solubles.

Otra posibilidad sería que las proteínas correspondientes a estas especies proteicas se hayan desnaturalizado durante el secado y hayan formado agregados, pero que estos agregados permanezcan solubles en el medio de extracción. De este modo, estas proteínas no modificarían el valor del porcentaje de proteína soluble, pero al haber formado agregados, pueden tener un tamaño tal que no logren entrar en el gel.

La tercera posibilidad sería que estas proteínas hayan sido degradadas como consecuencia del ataque de enzimas proteolíticas. La desnaturalización incrementa la susceptibilidad de las proteínas al ataque por enzimas proteolíticas (Laidler y Bunting 1973), siempre que estas enzimas no hayan sufrido a su vez desnaturalización. En este caso, se esperaría encontrar un aumento en las bandas correspondientes a la zona de bajo peso molecular.

Al analizar los diagramas electroforéticos, no se observó la presencia de picos en el punto de siembra o en el frente, que se correspondan con la disminución de las bandas

mencionadas anteriormente, hecho que permitiría descartar las dos últimas posibilidades.

Se podría pensar, entonces, que todas las especies proteicas que aparecen en el gel contribuirían a la pérdida de solubilidad observada, pero algunas se insolubilizarían en mayor proporción, disminuyendo así con más intensidad estas bandas con respecto a las demás.

### 3. CINETICA DE INSOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS DE EMBRION POR EFECTO DE LA TEMPERATURA

El objeto de esta sección es estudiar la cinética de insolubilización térmica de las proteínas de germen de trigo, y calcular la energía de activación ( $E_a$ ) y el factor preexponencial ( $Z$ ) de Arrhenius para este proceso.

Para ello se utilizarán la temperatura equivalente del embrión, que se había calculado para cada condición de secado (Tabla IV, pág.64), y los porcentajes de proteína soluble (Tabla V, pág.66). El orden de reacción propuesto para la disminución de  $\Delta H$  había sido confirmado por un método isotérmico (pág.57), por lo que se postuló también una cinética de primer orden para la insolubilización de las proteínas de embrión, ya que tanto la disminución de  $\Delta H$  como la pérdida de solubilidad son una consecuencia de la desnaturalización térmica de las proteínas. La constante de velocidad ( $k$ ) se calculó entonces con la expresión:

$$k = \frac{2,303}{t} \log \frac{A_0}{A} \quad (17)$$

donde  $t$  es el tiempo en minutos,  $A$  es la propiedad medida en las semillas calentadas (en este caso solubilidad de las proteínas de embrión, expresada como porcentaje del control), y

$A_0$  es la propiedad medida en las semillas control (tiempo cero de calentamiento), que se tomó como 100%.

La energía de activación se calculó con la pendiente de la recta obtenida al graficar  $-\ln k$  en función de  $1/T$ , siendo  $T$  la temperatura absoluta (ecuación de Arrhenius). Los valores obtenidos fueron 78,0 Kcal/mol para la energía de activación, y 108,8 para  $\ln Z$  (Figura 11), con un coeficiente de correlación de 0,86. Los resultados calculados a partir de una cinética de segundo orden fueron muy similares, por lo que, si bien no hay datos que confirmen el orden de reacción propuesto para la pérdida de solubilidad, igualmente se utilizarán estos datos al analizar el efecto del tiempo y de la temperatura de secado sobre el deterioro de la semilla (pág.147).

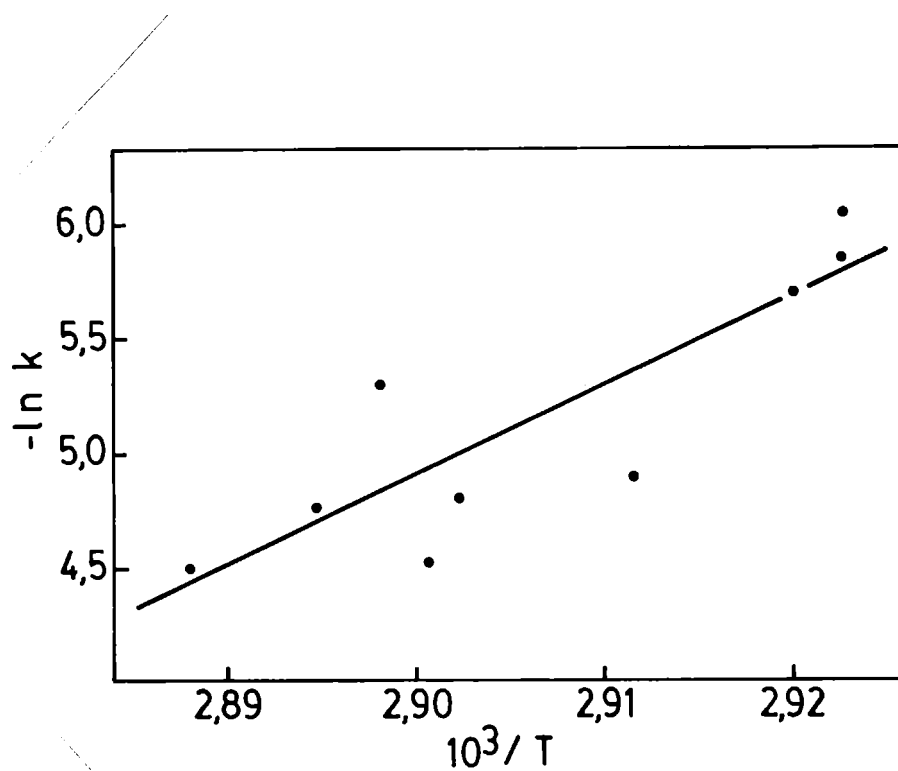


Figura 11. Cálculo de la energía de activación y del factor preexponencial de Arrhenius para la insolubilización de las proteínas de embrión de trigo.  $k$  = constante de velocidad.  $T$  = temperatura absoluta.



ALTERACIONES EN EL ENDOSPERMA DE  
TRIGO COMO CONSECUENCIA DEL SECADO



## 1. ENSAYOS DE CALIDAD PANADERA

Durante el proceso de secado por aire caliente, la se milla puede sufrir alteraciones que afecten tanto su calidad panadera como su capacidad germinativa. Como consecuencia, el trigo dañado por calor puede no ser apto como semilla o para hacer pan (Hook 1980). En esta sección se analizará la pérdida de calidad panadera que experimentaron las semillas debido al secado, para correlacionarla en la sección siguiente con los cambios observados en las proteínas de la harina.

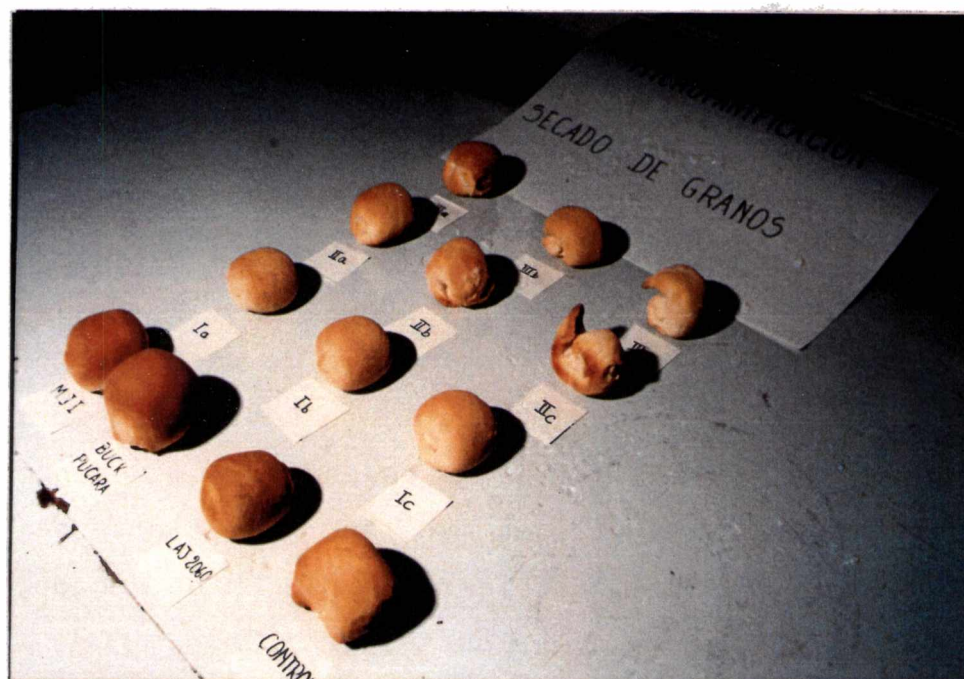
### 1.1 Prueba de micropanificación

Una de las pruebas más significativas para determinar la calidad industrial de una harina, es hacer un ensayo de panificación (Schofield y Booth 1983). Este ensayo se hizo en pequeña escala, con el objeto de comparar la calidad panadera de las semillas de trigo que habían sido sometidas a distintas condiciones de secado. En las Figuras 12 y 13 se pueden ver fotografías de los pancitos obtenidos, observándose que a medida que las condiciones de secado se hacen más drásticas, el tamaño se va haciendo cada vez menor, y su forma es más irregular debido al escaso levado de la masa.

En la Tabla VIII se muestran los valores de volumen de pan correspondientes a cada condición de secado, que coroboran lo observado en las fotografías.

Estos resultados se van a correlacionar posteriormente con otros ensayos, en particular, con el análisis de las proteínas de la harina.





Figuras 12 y 13. Ensayo de micropanificación realizado con harina de trigo obtenida de semillas secadas en distintas condiciones. La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I.

Tabla VIII: Volumen de pan obtenido con harina proveniente de semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)(2)</sup>

Condiciones de secado	Control	I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
Volumen (%)	100	92,6	92,6	88,9	88,9	92,6	85,2	92,6	85,2	74,1

(1) Las condiciones de secado fueron las especificadas en la Tabla I.

(2) Los resultados están expresados como porcentajes del control.

### 1.2 Ensayo de Zeleny

La prueba de sedimentación de Zeleny es un método muy conocido que refleja la calidad de la harina, y consiste en medir el volumen de sedimentación de una suspensión de harina en una solución de ácido láctico (Mazzoni y Robutti 1983). Cuanto mayor es el volumen de sedimentación, mejor será la calidad de la harina.

En la Tabla IX se muestran los valores obtenidos para harina proveniente de semillas secadas en las condiciones de la Tabla I. Se observa que el volumen de sedimentación disminuye a medida que las condiciones de secado se hacen más drásticas, tal como ocurría con el volumen de pan.

Tabla IX: Ensayo de Zeleny realizado con harina proveniente de semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)</sup>

Condiciones de secado	Control	I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
Volumen de sedimentación (ml)	24	22	21	21	19	20	18	19	18	18

(1) Las condiciones de secado fueron las especificadas en la Tabla I.

### 1.3 Determinación de gluten húmedo y gluten seco

La fracción proteica de la harina de trigo de mayor significación tecnológica es el gluten, que es el material viscoelástico producido cuando una masa de harina y agua es lavada con un exceso de esta última para separar el almidón y otros componentes menores. Usualmente sólo alrededor del 75-85% de su peso seco comprende de hecho proteínas, el resto es almidón residual, lípidos, hemicelulosas, etc. Existe una buena correlación entre la cantidad de gluten presente en la harina y su capacidad panadera, pero no sólo el contenido de gluten o de proteínas es importante, sino también la calidad de dichas proteínas. Entre los factores que influyen en la calidad de las proteínas de la harina, además de la variedad de trigo, están la acción de enzimas proteolíticas y del calor. El trigo dañado por calor produce un gluten más duro, y en casos extremos no es posible extraerlo de la masa que proviene de esas semillas (Schofield y Booth 1983). En consecuencia, el contenido de gluten húmedo es una medida que se utiliza para determinar el deterioro por calor de las semillas, junto con el volumen de pan y otros ensayos (Schreiber y col. 1981).

Por este motivo, se hicieron determinaciones de gluten húmedo y gluten seco, en harinas provenientes de semillas control y de semillas secadas por calor. Los valores obtenidos para el control fueron 23,0% y 9,1%, para gluten húmedo y gluten seco respectivamente. La harina de semillas calentadas no aglutinó, ni siquiera la correspondiente a semillas I<sub>a</sub>, que fueron secadas en condiciones más suaves. Esto indica

ca que incluso las semillas I<sub>a</sub> han sufrido un deterioro por efecto de la temperatura, hecho que ya se había observado en los ensayos de panificación y de Zeleny.

## **2. ALTERACIONES EN LAS PROTEINAS DEL ENDOSPERMA**

El objetivo de esta sección es interpretar el deterioro en la calidad industrial, producido como consecuencia del secado de la semilla, a través de los cambios experimentados por los componentes del endosperma durante este proceso.

El volumen de pan disminuye cuando baja el nivel de proteínas del gluten, y lo mismo ocurre cuando estas proteínas son de mala calidad o funcionalidad. El secado con aire caliente puede afectar la funcionalidad de las proteínas por desnaturación (Booth y col. 1980), por lo que se esperaría que las proteínas de las harinas que dieron pancitos de mala calidad estén desnaturadas en mayor o menor grado. Los resultados obtenidos en la determinación de gluten, como se observó anteriormente, también indicarían que se produjo una desnaturación durante el tratamiento térmico.

Todo esto hace que se haya enfocado el estudio de las alteraciones sufridas por el endosperma de trigo durante el secado, hacia el análisis de los cambios producidos en las proteínas de la harina.

### **2.1 Efecto del secado de la semilla sobre la solubilidad de las proteínas**

Las proteínas del endosperma de trigo tienen distintas funciones y localizaciones dentro de la célula, y van a desempeñar papeles diferentes en el proceso de panificación. Estas proteínas se pueden clasificar de acuerdo a sus característi

cas de solubilidad. Para este trabajo se buscó un medio que solubilizara la mayor parte de estas proteínas, y se eligió para ello un buffer con SDS, que según datos existentes en bibliografía, extrae aproximadamente el 95% de las proteínas, tanto de la harina como del gluten (Bottomley y col. 1982).

**2.1.1 En harina:** antes de observar el efecto del secado de las semillas sobre la solubilidad de las proteínas, se discutirá el rendimiento obtenido en la extracción de proteínas de harina de semillas control. El contenido de proteína total de harina se determinó por el método de Kjeldahl, como  $N \times 5,7$  (A.A.C.C. 1983a), obteniendo un valor de 9,65% de proteína en base húmeda. La cantidad de proteína soluble en el medio de extracción, se midió por el método de Lowry, dando como resultado en semillas control 8,95 mg de proteína por cada 100 mg de harina, también en base húmeda. Este valor es el 92,7% del contenido de proteína total, resultado que concuerda con los datos de bibliografía, ya que, como se mencionó anteriormente, Bottomley y colaboradores informaron un rendimiento del 95% para esta solución de extracción (Bottomley y col. 1982).

Se analizará ahora el efecto del tratamiento térmico sobre la solubilidad de las proteínas.

En la Tabla X se muestran los porcentajes de proteína soluble obtenidos, para algunas de las condiciones de secado de la Tabla I (lotes  $I_b$ ,  $I_c$ ,  $II_a$ ,  $III_b$  y  $III_c$ ). Se puede observar que, a medida que las condiciones de secado se hacen más drásticas, disminuye la solubilidad de las proteínas de la harina en el medio de extracción.

Tabla X: Contenido relativo de proteína soluble en harina proveniente de semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)</sup>.

Condiciones de secado	Control	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
% prot. soluble respecto al control <sup>(2)</sup>	100	95,4 ± 2,3	90,9 ± 4,0	96,9 ± 2,6	87,2 ± 0,2	79,4 ± 0,5

(1) La nomenclatura utilizada es la correspondiente a la Tabla I.

(2) Estos valores son los promedios de dos determinaciones.

Esta disminución en la solubilidad de las proteínas probablemente se deba a la formación de agregados durante el calentamiento de la semilla. Debido a que el medio de extracción utilizado contenía dodecil sulfato de sodio, que separa especies proteicas unidas por enlaces no covalentes, se esperaba que los agregados se hayan formado a través de uniones disulfuro. Esto mismo fue observado por Schofield y colaboradores, quienes en lugar de someter las semillas a distintos tratamientos térmicos, trabajaron directamente con gluten calentado en diferentes condiciones. Estos autores concluyeron, para el caso de gluten, que durante el calentamiento habría reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro, que presumiblemente eran facilitadas por el desplegamiento de las proteínas con la temperatura (Schofield y col. 1983).

**2.1.2 En masa:** se determinó la concentración de proteínas solubles en solución de SDS, de masa preparada con harina de semillas control y de semillas secadas en distintas condiciones (lotes I<sub>b</sub>, I<sub>c</sub>, II<sub>a</sub>, III<sub>b</sub> y III<sub>c</sub> de la Tabla I). Los resultados

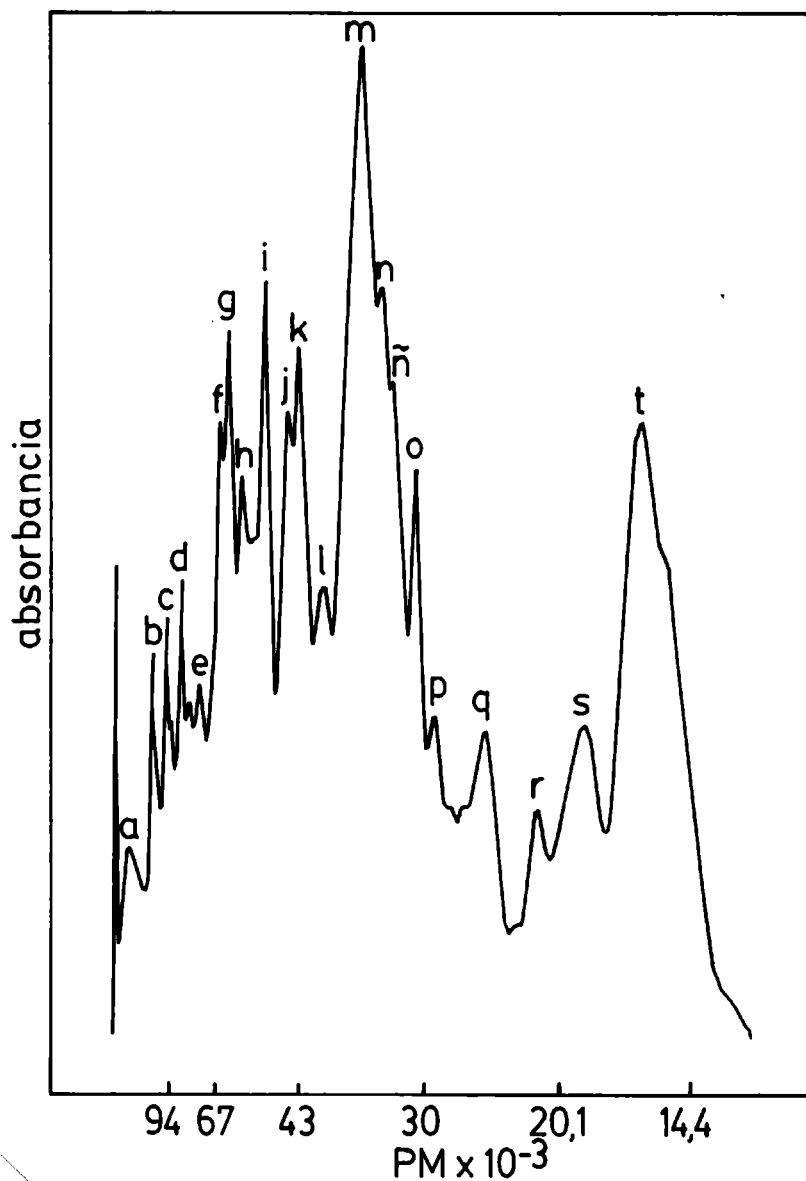
de estas medidas presentan una gran dispersión cuando se comparan los porcentajes de proteína extraída con respecto al valor del control en dos extracciones diferentes. Probablemente esto se deba a las condiciones de extracción, ya que si la agitación, por ejemplo, no fue exactamente igual para todas las muestras, pueden aparecer diferencias en la proteína extraída que enmascaren las debidas al secado de las semillas. Por este motivo, no se pudieron sacar conclusiones a partir de estos resultados.

El porcentaje de proteína extraída de masa preparada con harina de semillas control, fue de 6,9 mg de proteína por cada 100 mg de harina, siendo éste un rendimiento considerablemente menor al obtenido con harina. Esto es lógico, si se piensa que la masa es un material que no se disgrega fácilmente, lo que hace difícil que la totalidad de la proteína entre en contacto con la solución de extracción.

## **2.2 Caracterización de diferentes especies proteicas presentes en el medio de extracción**

Antes de estudiar el efecto del secado, se caracterizarán las especies proteicas presentes en el medio de extracción. Para ello, se analizarán los resultados obtenidos en corridas electroforéticas realizadas en geles de poliacrilamida con SDS, de extractos proteicos de endosperma de semillas control.

En la Figura 14 se puede ver una densitografía típica, obtenida a partir de una muestra tratada con mercaptoetanol, en la que se indican los pesos moleculares de los diferentes picos.



**Figura 14.** Diagrama electroforético de proteínas de endosperma de semillas de trigo control. La corrida se hizo en gel de poliacrilamida con SDS. La muestra se trató con SDS y ME antes de sembrar. Pesos moleculares de los picos: **a** = 120.800, **b** = 102.900, **c** = 96.100, **d** = 87.700, **e** = 78.200, **f** = 69.800, **g** = 66.700, **h** = 60.800, **i** = 53.000, **j** = 46.200, **k** = 44.200, **l** = 40.000, **m** = 36.700, **n** = 34.100, **ñ** = 33.400, **o** = 31.000, **p** = 29.400, **q** = 25.400, **r** = 21.900, **s** = 19.300, **t** = 16.400.

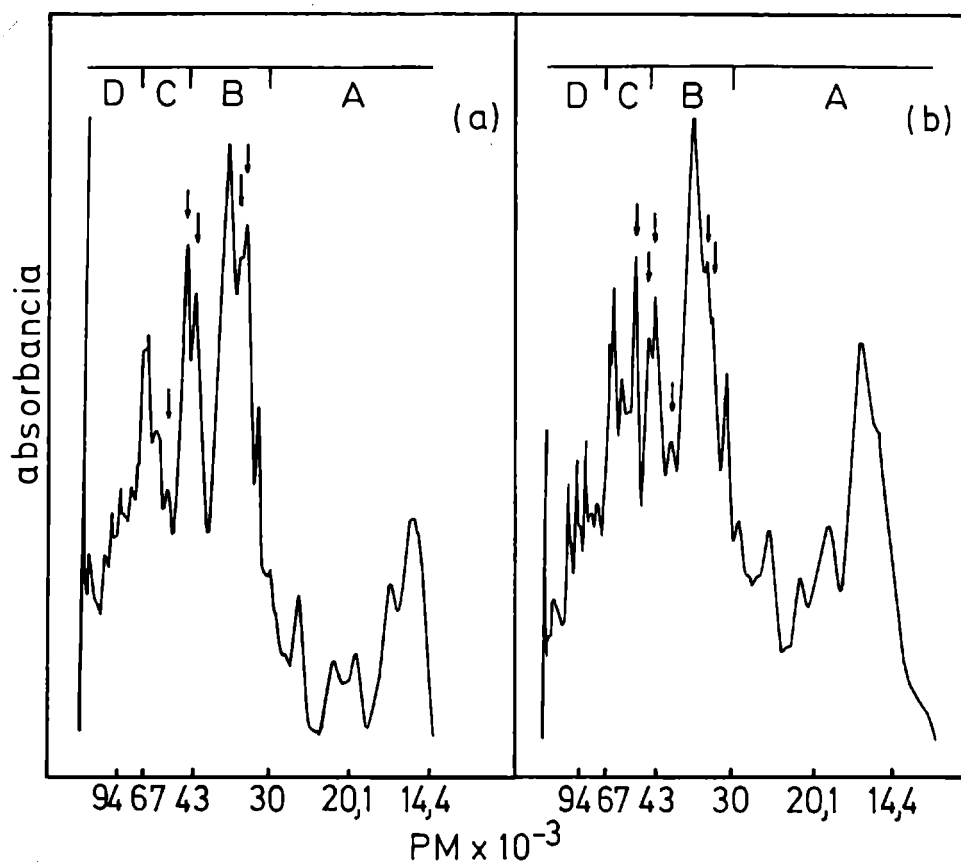


Se puede analizar este diagrama, teniendo en cuenta que la mayoría de las gliadinas poseen pesos moleculares en el rango de 30.000 a 45.000 daltons, aunque las  $\omega$ -gliadinas tienen pesos moleculares mayores, en la zona de 75.000-79.000 daltons. Las subunidades de las gluteninas, en cambio, tienen pesos moleculares entre 30.000 y 140.000 daltons a proximadamente (Schofield y Booth 1983). Así, se puede ubicar en los diagramas electroforéticos la zona que corresponde a las gliadinas y la que corresponde a las gluteninas, con los rangos de pesos moleculares mencionados. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que las albúminas y globulinas también pueden estar presentes en el diagrama electroforético, aun que constituyen sólo entre el 10 y el 20% de las proteínas del endosperma (Simmonds 1978), y se encontrarían, al menos en parte, en la zona de pesos moleculares menores a 30.000 daltons (Booth y col. 1980).

Se puede hacer un análisis más profundo, comparando los diagramas obtenidos en corridas de muestras tratadas y no tratadas con mercaptoetanol.

De esta manera, se puede observar la presencia de puentes disulfuro intercatenarios, ya que el mercaptoetanol rompe este tipo de enlaces. En la Figura 15 se señalan con una flecha vertical las diferencias más notorias entre estos diagramas.

Si se considera, en primer lugar, el rango de pesos moleculares entre 30.000 y 45.000 daltons, señalada con una B en la Figura 15, se tiene una zona en la que se superponen los diagramas correspondientes a gliadinas y a gluteninas. Sin embargo, las gliadinas tienen residuos de cisteína que participan solamente en la formación de puentes disulfuro in



**Figura 15.** Diagramas electroforéticos de proteínas de endosperma de semillas de trigo control. La corrida se hizo en gel de poliacrilamida con SDS. **a)** La muestra fue tratada con SDS antes de sembrar. **b)** La muestra fue tratada con SDS y ME antes de sembrar. Las flechas señalan los picos en los que se observan las mayores diferencias entre a) y b).

tramoleculares (Wall 1979, Schofield y Booth 1983), mientras que las gluteninas están constituidas por subunidades unidas por puentes disulfuro (Schofield y Booth 1983), lo que probablemente haría que una gran parte, si no todas las diferencias encontradas en esta zona entre los diagramas electroforéticos de muestras tratadas y no tratadas con mercaptoetanol, se deban a las gluteninas.

Esta zona es la de mayor concentración proteica, como se puede ver por la altura de los picos en las Figuras 14 y 15, hecho que coincide con lo observado por Kasarda y colaboradores, quienes relacionaron estas bandas con las propiedades de la masa (Kasarda y col. 1976).

La zona de pesos moleculares menores a 30.000 daltons (zona A de la Figura 15), donde probablemente haya albúminas y globulinas (Booth y col. 1980), también presenta algunas diferencias entre las muestras tratadas y no tratadas con ME, aunque no tan notorias. La diferencia más evidente es que en el caso de la muestra tratada con ME, las bandas son más intensas. Esto es razonable ya que probablemente se sumen a las especies proteicas ya presentes en el densitograma de las muestras sin ME, subunidades provenientes de especies proteicas de mayor peso molecular que hayan estado unidas por puentes disulfuro.

Si se considera la zona de pesos moleculares entre 45.000 y 70.000 daltons, (zona C de la Figura 15), donde habría subunidades de gluteninas (Schofield y Booth 1983), se puede ver que hay cambios bastante importantes en las muestras tratadas con ME en relación a las no tratadas, lo que era esperable ya que, como se mencionó anteriormente, las gluteninas se consideran, al menos en parte, formadas por

subunidades unidas por puentes disulfuro.

La zona que queda por analizar es la de pesos moleculares mayores a 70.000 daltons (zona D de la Figura 15). En esta zona, en la que hay gluteninas y  $\omega$ -gliadinas, no se observan cambios notorios entre las muestras tratadas y no tratadas con ME, lo que sugiere que estos picos no provendrían de cadenas unidas por puentes disulfuro.

Los casos en que se observaron diferencias en los diagramas electroforéticos de muestras tratadas y no tratadas con ME, es decir aumento o disminución, y en algunos casos aparición o desaparición de picos, se pueden interpretar considerando que habría especies proteicas solubles en el medio de extracción, que estarían formadas por más de una cadena unidas por puentes disulfuro. Al tratar las muestras con ME, se romperían estos enlaces desapareciendo la banda correspondiente a la especie proteica original y apareciendo las bandas correspondientes a las cadenas separadas. En algunos casos no se observa la desaparición total de una banda, y esto puede deberse, o a que el tratamiento con ME no fue completo, o más probablemente a la presencia de otras especies proteicas del mismo peso molecular, pero formadas por una sola cadena. Esto puede ocurrir sobre todo en la zona de pesos moleculares entre 30.000 y 45.000 daltons, en la que se superponen gliadinas y gluteninas, ya que habría polipéptidos del mismo peso molecular en ambas fracciones (Wall 1979), y, tal como se mencionó anteriormente, las subunidades de gliadinas no estarían unidas entre sí por puentes disulfuro, mientras que las de gluteninas sí.

### 2.3 Efecto del amasado sobre las proteínas de la harina

Es sabido que en la formación de la masa los componentes de la harina, particularmente las proteínas, deben hidratarse, y luego, durante el trabajo de amasado, reorientarse para producir una masa de características reológicas apropiadas. Sin embargo, nuestro conocimiento acerca de los cambios que experimentan las proteínas de la harina durante el amasado es bastante impreciso (Schofield y Booth 1983). Bottomley y colaboradores compararon extractos proteicos de harina y de gluten, obtenidos con el mismo medio de extracción (tris-SDS), que el utilizado en este trabajo (Bottomley y col. 1982). Observaron, a través de estudios cromatográficos, que en los extractos de gluten había una cantidad mayor de especies proteicas en la zona de alto peso molecular, lo que indicaría que durante la preparación del gluten hubo agregación con formación de puentes disulfuro; pero la similitud de los diagramas electroforéticos obtenidos de extractos proteicos provenientes de zonas del cromatograma de distinto peso molecular, llevaron a estos autores a concluir que el proceso de agregación sería no selectivo.

Dado que en este trabajo se estudian las alteraciones producidas como consecuencia del secado de las semillas, en las proteínas de la harina y de la masa, debió verificarse previamente si había diferencias en los diagramas electroforéticos correspondientes a ambos extractos proteicos en muestras de semillas control, aunque los resultados obtenidos por Bottomley y colaboradores (Bottomley y col. 1982), indicarían que muy probablemente no se observen diferencias importantes.

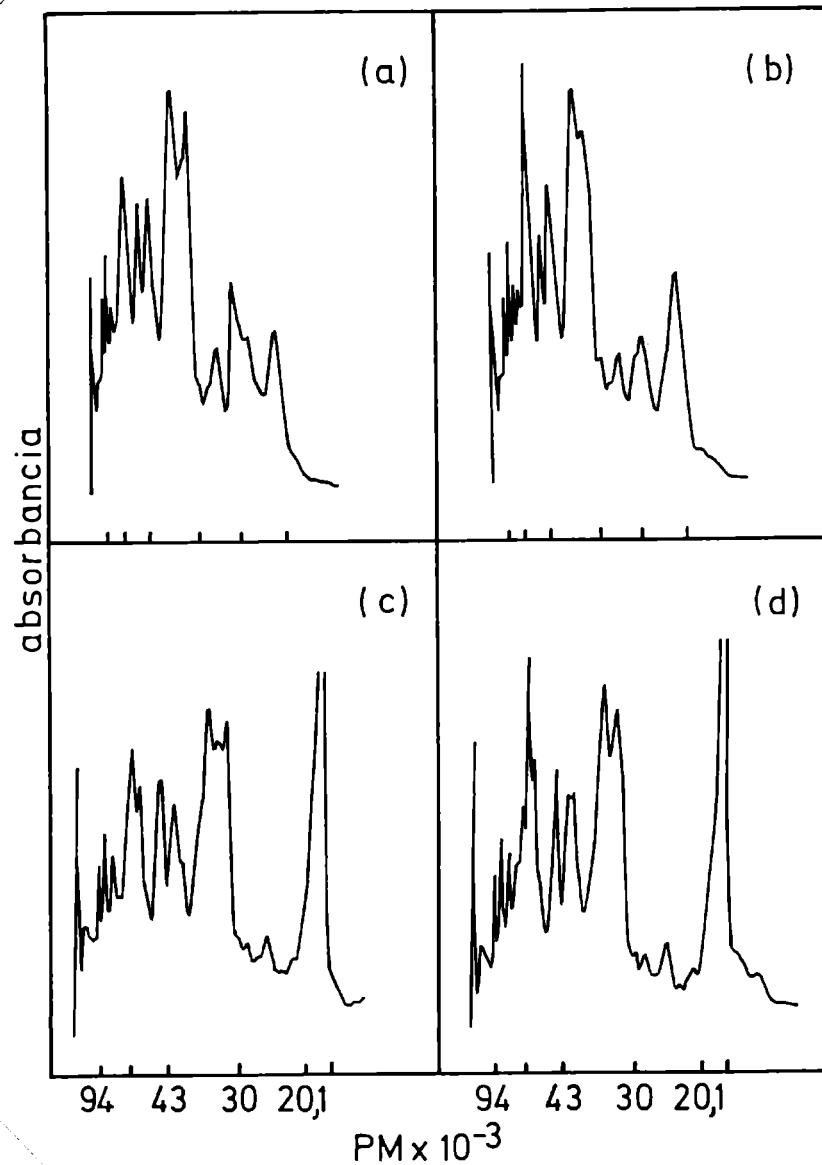
Si se comparan los diagramas electroforéticos de extractos proteicos de harina y de masa provenientes de semillas control (Figura 16), se observa que no hay diferencias muy marcadas, tanto en las muestras tratadas con mercaptoetanol como en las no tratadas. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Bottomley y colaboradores; y el hecho que los diagramas electroforéticos sean similares, indicaría que no hubo una agregación selectiva durante el amasado.

#### **2.4 Modificaciones producidas en las proteínas como consecuencia del tratamiento térmico de las semillas**

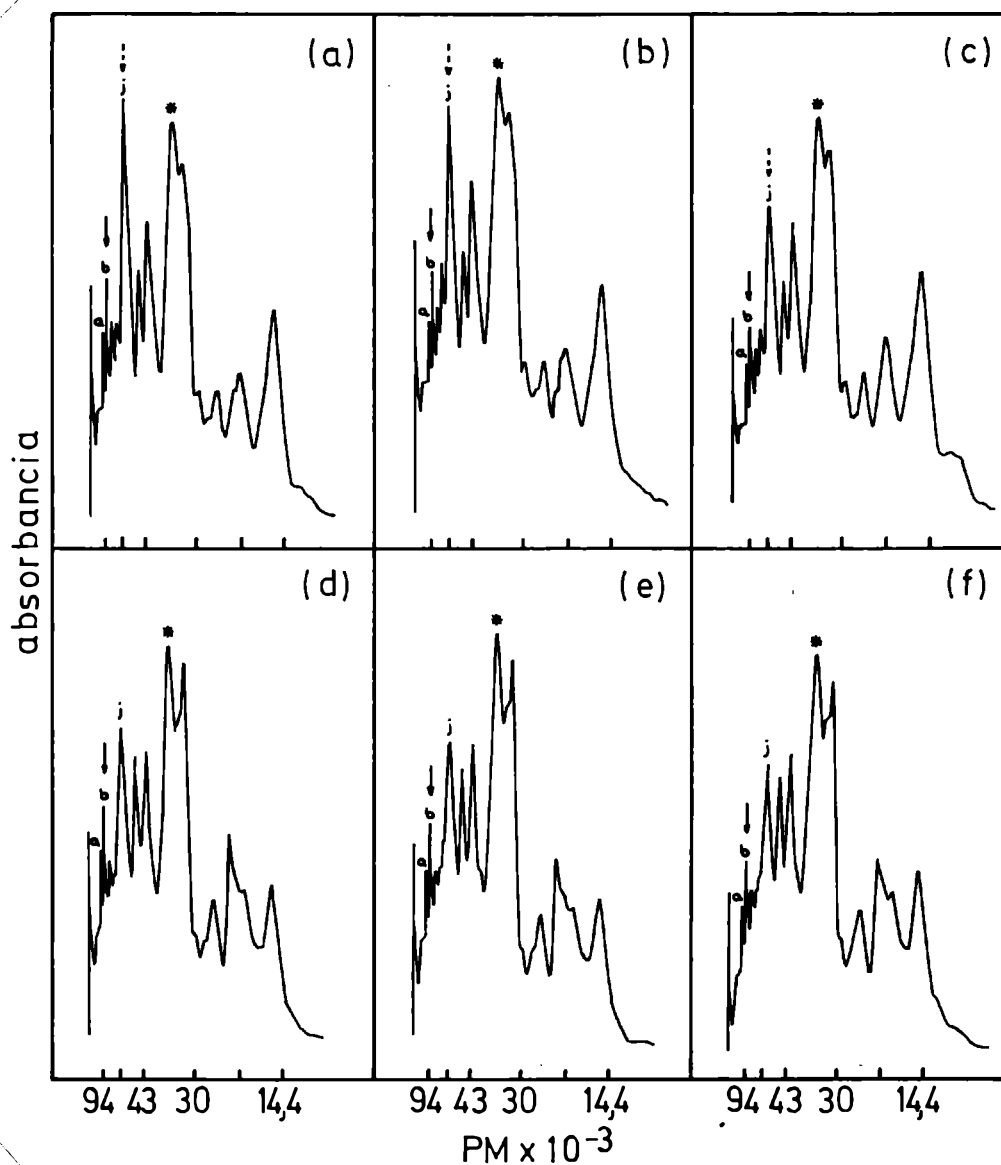
Después de haber observado en los ensayos de solubilidad el comportamiento conjunto, en relación al secado, de muchas proteínas diferentes, que pueden incidir de distinta manera en la pérdida de solubilidad total, se analizarán ahora las alteraciones experimentadas durante este proceso por diferentes especies proteicas, consideradas en forma independiente. Para ello, se hicieron electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos de proteínas de harina y de masa, provenientes de semillas secadas en distintas condiciones, y se compararon los diagramas electroforéticos obtenidos con los correspondientes a semillas control.

**2.4.1 En harina:** los diagramas electroforéticos obtenidos a partir de extractos de proteínas de harina son, como era de esperar, muy similares a los obtenidos a partir de extractos proteicos de endosperma.

En la Figura 17 se pueden ver densitografías características, correspondientes a harina de semillas control y de semillas secadas en algunas de las condiciones de la Tabla I (lotos I<sub>b</sub> y III<sub>b</sub>). Los densitogramas de la parte superior corres



**Figura 16.** Diagramas electroforéticos de extractos proteicos de harina y de masa provenientes de semillas de trigo control. La corrida se hizo en geles de poliacrilamida con SDS. **a)** Harina. La muestra se trató con SDS antes de sembrar. **b)** Harina. La muestra se trató con SDS y ME antes de sembrar. **c)** Masa. La muestra se trató con SDS antes de sembrar. **d)** Masa. La muestra se trató con SDS y ME antes de sembrar.



**Figura 17.** Diagramas electroforéticos de proteínas de harina de trigo de semillas secadas en distintas condiciones. La corrida se hizo en geles de poliacrilamida con SDS. Los densitogramas de la parte superior corresponden a muestras tratadas con SDS y ME y los de la parte inferior a muestras tratadas sólo con SDS. a) y d) control, b) y e) Ib, c) y f) IIIb.



ponden a muestras tratadas con SDS y mercaptoetanol, y los de la parte inferior, a las mismas muestras, pero tratadas sólo con SDS. En ambos casos se observa una disminución de picos en la zona de pesos moleculares mayores a 70.000 (flechas verticales de la Figura 17), donde se encuentran, según lo discutido previamente, gluteninas y  $\omega$ -gliadinas.

En la zona de pesos moleculares entre 45.000 y 70.000 daltons (zona C de la Figura 15), donde hay también gluteninas, se puede ver al menos un pico que disminuye con el calentamiento de la semilla en las muestras tratadas con SDS y mercaptoetanol (flecha vertical punteada en la Figura 17). Este efecto no se observa, al menos en la misma medida, en los densitogramas de las muestras tratadas sólo con SDS, en los que este pico es mucho menor. El hecho que esta banda sea mucho más intensa en las muestras tratadas con mercaptoetanol, se puede ver bien en los diagramas correspondientes a harina de semillas control, en los que no se superpone el efecto del secado, y se había observado ya al analizar los extractos de endosperma (pág. 91 ); se trataría de subunidades unidas por puentes disulfuro, formando especies proteicas de mayor peso molecular solubles en el medio de extracción, que al tratar la muestra con mercaptoetanol, se separan y aparecen en el gel, sumándose a una banda ya existente. Después de este análisis se puede explicar la disminución de este pico, en los extractos correspondientes a semillas calentadas tratados con mercaptoetanol, considerando que, como consecuencia del tratamiento térmico, se produjeron reacciones en las cuales las especies proteicas que originaban el aumento de esta banda en presencia de ME, pasaron a formar compuestos insolubles en el medio de extracción.

Schofield y colaboradores trabajaron con gluten, al que sometieron a diferentes tratamientos térmicos (Schofield y col. 1983). Aunque es muy distinto calentar la semilla entera que calentar gluten, ya que el medio en el cual se encuentran las proteínas es totalmente diferente, y la estructura de las proteínas también es muy distinta, se puede tratar de relacionar los resultados obtenidos por estos autores con los del presente trabajo. Schofield y colaboradores encontraron que a la temperatura a la que se afecta la funcionalidad del gluten (entre 55 y 70°C) habría una polimerización de las gluteninas, aunque no de las gliadinas (Schofield y col. 1983). Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos en este trabajo, ya que las modificaciones que se observaron en los diagramas electroforéticos de los extractos proteicos provenientes de semillas calentadas, corresponden a la zona de pesos moleculares más altos, donde se encuentran parte de la gluteninas.

Además, Schofield y colaboradores concluyeron que los cambios observados involucrarían reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro (Schofield y col. 1983), de manera que las especies proteicas que se modifican durante este tratamiento, deberían poseer tales grupos. En el presente trabajo se observaron alteraciones fundamentalmente en dos zonas: una es la de pesos moleculares entre 45.000 y 70.000 daltons, encontrándose un pico que disminuía con el calentamiento en las muestras tratadas con mercaptoetanol. Este pico se había atribuido a subunidades proteicas anteriormente unidas por enlaces disulfuro, que podían, por lo tanto, haber intervenido en reacciones de intercambio sulfhidrilo - disulfuro como consecuencia del tratamiento térmico. La otra zona en la que se observó una disminución de picos en los diagramas electroforéticos como consecuencia del calentamiento, es la de pesos molecula

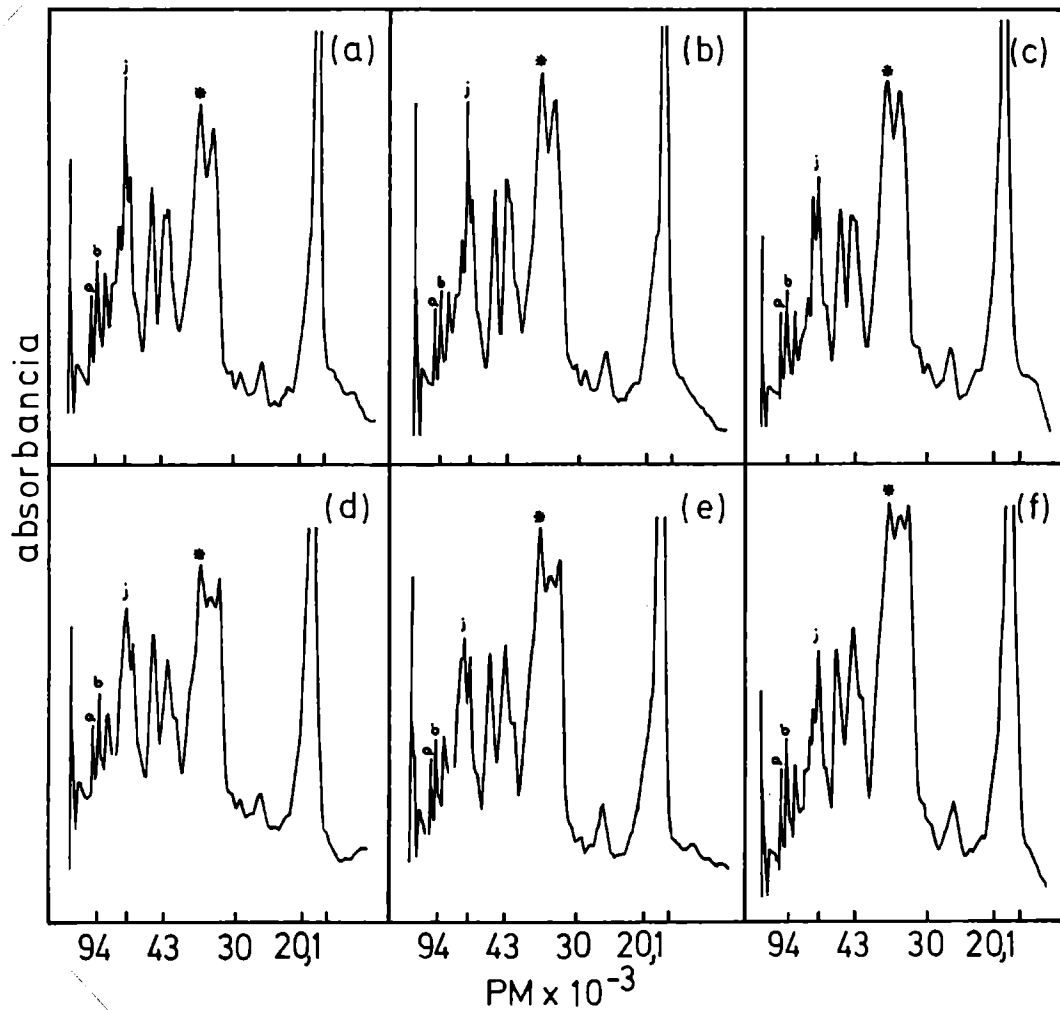
res mayores a 70.000 daltons, en la que no habría especies proteicas que hayan estado unidas por puentes disulfuro (pág. 94 ), pero podrían haber tenido grupos sulfhidrilo libres o puentes disulfuro intracatenarios. Estos picos serían de gluteninas y no de  $\omega$ -gliadinas (que también están presentes en esta zona de peso molecular) ya que, como se mencionó anteriormente, estas últimas son deficientes en aminoácidos sulfurados.

**2.4.2 En masa:** los mismos estudios que se realizaron en harina, se hicieron también con extractos proteicos de masa, obteniendo resultados similares.

En la Figura 18 se pueden ver densitografías, correspondientes a muestras tratadas y no tratadas con mercaptoetanol, provenientes de semillas control y de semillas calentadas en distintas condiciones (lotes  $I_b$  y  $III_b$  de la Tabla I). Los diagramas son muy similares a los de harina (Figura 17, pág. 98 ), observándose las mismas alteraciones en las muestras calentadas.

Con el objeto de visualizar mejor estas diferencias, se midieron las longitudes relativas de algunos picos (picos a, b y j de las Figuras 17 y 18 págs. 98 y 102 ), con relación a otro que no presentó variaciones (pico marcado con un asterisko en las Figuras 17 y 18).

En las Tablas XI y XII se pueden ver los valores obtenidos para muestras tratadas y no tratadas con mercaptoetanol. Estos ensayos se hicieron para algunas de las condiciones de secado de la Tabla I (lotes  $I_b$ ,  $I_c$ ,  $II_a$ ,  $III_b$  y  $III_c$ ).



**Figura 18.** Diagramas electroforéticos de proteínas de masa de harina de trigo correspondiente a semillas control y a semillas secadas en distintas condiciones. La corrida se hizo en geles de poliacrilamida con SDS. Los densitogramas de la parte superior corresponden a muestras tratadas con SDS y ME, y los de la parte inferior a muestras tratadas sólo con SDS. **a)** y **d)** control, **b)** y **e)** Ib, **c)** y **f)** IIIb.

Tabla XI: Longitudes relativas de algunos picos en diagramas electroforéticos de proteínas de harina y masa, provenientes de semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)</sup>. Las muestras se trataron con SDS antes de sembrar.

Condiciones de secado		Control	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
Pico							
a <sup>(2)</sup>	harina	0,51	0,48	0,46	0,54	0,41	0,39
	masa	0,54	0,47	0,43	0,57	0,44	0,39
b <sup>(2)</sup>	harina	0,62	0,59	0,55	0,65	0,52	0,46
	masa	0,62	0,51	0,49	0,63	0,50	0,43
j <sup>(2)</sup>	harina	0,81	0,76	0,78	0,81	0,74	0,75
	masa	0,87	0,74	0,76	0,85	0,68	0,74

(1) Las condiciones de secado fueron las especificadas en la Tabla I.

(2) Las medidas se hicieron en relación al pico señalado con un asterisco en las Figuras 17 y 18

Se puede observar en estas tablas en primer lugar que, tal como se discutió anteriormente (págs. 95 y 96), los diagramas electroforéticos de harina y de masa son prácticamente coincidentes, tanto para semillas control como para semillas calentadas, y tratando o no la muestra previamente con mercaptoetanol.

Tabla XII: Longitudes relativas de algunos picos en diagramas electroforéticos de proteínas de harina y de masa, provenientes de semillas secadas en distintas condiciones <sup>(1)</sup>. Las muestras se trataron con SDS y ME antes de sembrar.

Condiciones de secado		Control	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
Pico							
a <sup>(2)</sup>	harina	0,52	0,47	0,48	0,52	0,43	0,35
	masa	0,51	0,47	0,45	0,47	0,46	0,34
b <sup>(2)</sup>	harina	0,64	0,57	0,57	0,62	0,52	0,43
	masa	0,60	0,51	0,53	0,54	0,52	0,40
j <sup>(2)</sup>	harina	1,05	0,93	0,92	0,98	0,79	0,74
	masa	1,06	0,94	0,93	0,92	0,78	0,74

(1) Las condiciones de secado fueron las especificadas en la Tabla I.

(2) Las medidas se hicieron en relación al pico señalado con un asterisco en las Figuras 17 y 18.

Se puede ver claramente, además, que el pico j va disminuyendo a medida que las condiciones de secado se hacen más drásticas, sobre todo en las muestras tratadas con mercaptoetanol (Tabla XII), hasta alcanzar valores similares a los obtenidos para las muestras no tratadas (Tabla XI). Por el contrario, los picos a y b tienen longitudes relativas si

milares en las muestras tratadas con mercaptoetanol, con respecto a las no tratadas.

Finalmente, se observa una disminución de los tres picos (excepto, tal vez, el pico j en la Tabla XI), según las condiciones de secado de las semillas.

En la Figura 19 se muestra la fotografía de un gel de poliacrilamida en el que se pueden ver las diferencias señaladas.

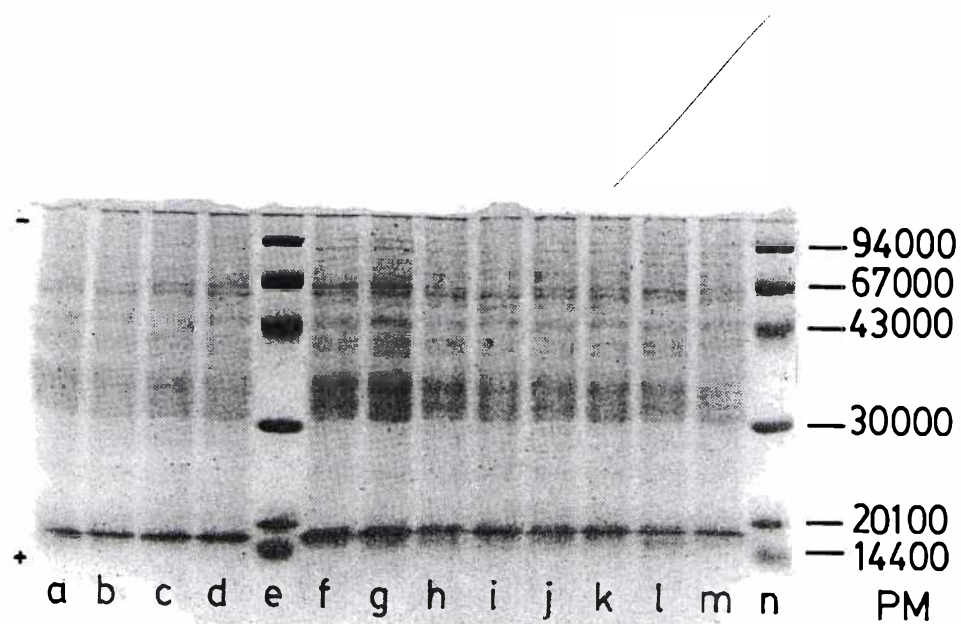
### **3. COMPORTAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE LA HARINA EN ENSAYOS CALORIMETRICOS**

Después de haber analizado las modificaciones sufridas por las proteínas del endosperma como consecuencia del tratamiento térmico, a través de medidas de solubilidad, e incluso visualizando directamente estas alteraciones por medio de corridas electroforéticas, se discutirán ahora los resultados obtenidos en ensayos calorimétricos realizados con harina, gluten y masa.

Ya que el calentamiento modifica la estructura de las proteínas de la harina, como se vio en la sección anterior, era lógico pensar que estos cambios puedan observarse a través de ensayos de calorimetría diferencial de barrido. Estos ensayos se hicieron también con gluten y masa.

#### **3.1 Ensayos con harina**

En la Figura 20 se muestra un termograma típico de harina, observándose que no aparecen picos definidos en el rango de temperatura considerado. El componente mayoritario de la harina es el almidón, que, cuando se calienta en presencia de un exceso de agua, experimenta una serie de cambios físi-



**Figura 19.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de proteínas de masa y de harina de trigo, provenientes de semillas control y de semillas secadas en distintas condiciones: a,b) Harina, IIIc, c,d) Harina, Ic, f,g) Harina, control, h,i) Masa, IIIc, j,k) Masa, Ic, l,m) Masa, control, e,n) patrones. Los carriles a,c,f,h,j,l corresponden a muestras tratadas con SDS y ME. Los carriles b,d,g,i,k,m corresponden a muestras tratadas con SDS.



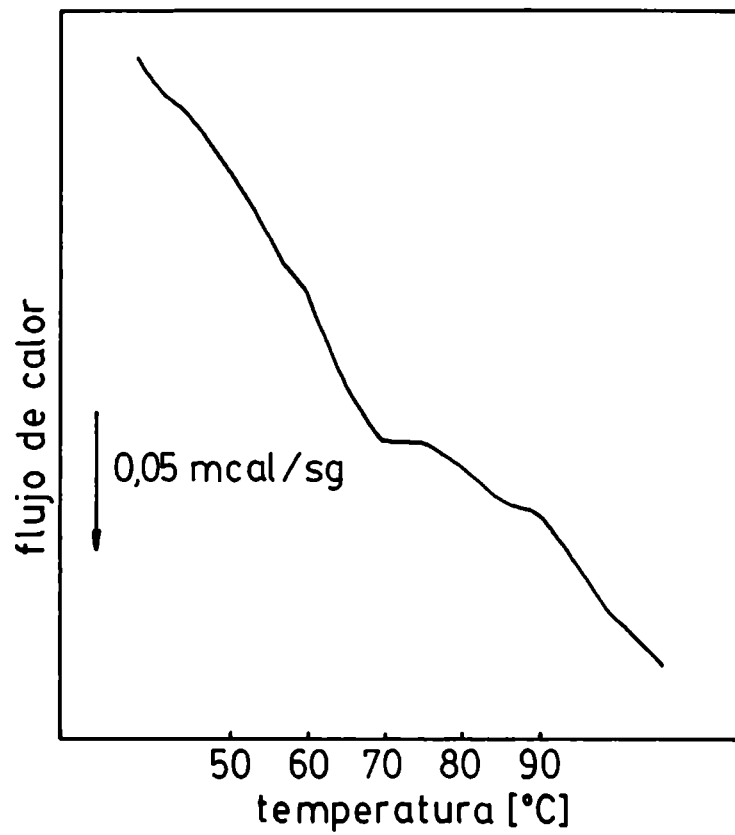


Figura 20. Termograma de harina de trigo obtenido por calorimetría diferencial de barrido. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

cos conocidos como gelatinización, durante los cuales hay un intercambio de calor que se puede visualizar por calorimetría diferencial de barrido. En sistemas agua-almidón en los que el agua es el componente limitante, se encontró que, para que tenga lugar la gelatinización, el contenido de agua no debe ser inferior al 30% (Burt y Russell 1983). En el caso de la harina el contenido de humedad es de alrededor del 10%, lo que explica que no se observen picos de gelatinización por DSC. Con respecto a las proteínas de la harina, hay que tener en cuenta que la entalpía de desnaturalización de las proteínas, que es proporcional al área del pico en los termogramas de DSC, disminuye al bajar el contenido de agua del sistema, para bajos contenidos de humedad (Baardseth 1977). A esto se suma que el porcentaje de proteína de la harina es muy bajo (alrededor del 10% en base húmeda), de manera que difícilmente pueda observarse una transición térmica por DSC debida a las proteínas de la harina.

### **3.2 Ensayos con gluten**

El gluten está compuesto, en base seca, por un 75-80% de proteínas, 5-15% de almidón residual, 5-10% de lípidos, y pequeñas cantidades de sales minerales (Eliasson y Hegg 1980). Así, al trabajar con gluten se evita el problema de la baja concentración de proteínas que se presentaba con la harina . Además , tiene un contenido de humedad de 60-70%, por lo que la desnaturalización de las proteínas no va a estar limitada por la disponibilidad de agua (Baardseth 1977).

En la Figura 21 se muestra un termograma característico de gluten, en el que se puede ver que, a pesar de lo esperado, no se observan picos definidos. Eliasson y Hegg, traba

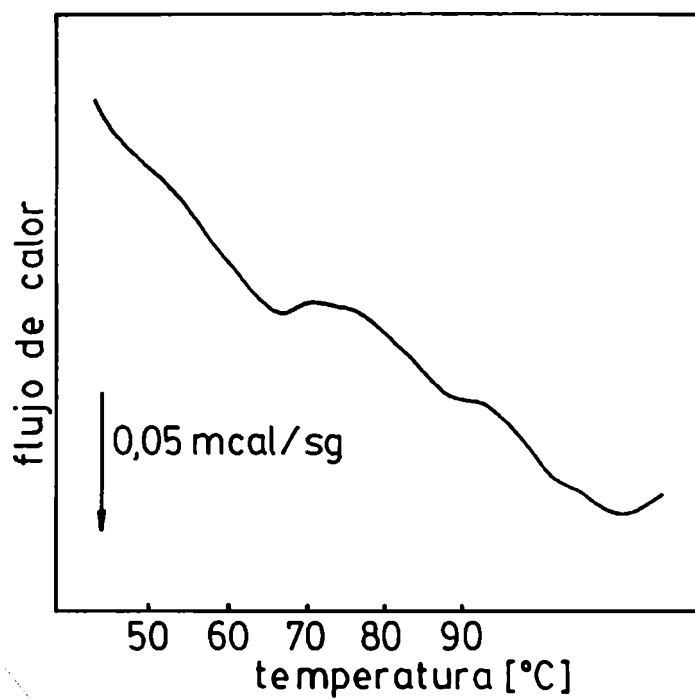


Figura 21. Termograma de gluten de trigo obtenido por calorimetría diferencial de barrido. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

jando con gluten, habían obtenido un diagrama equivalente, y concluyeron que la principal transición térmica, que tenía lugar entre 55 y 70°C, se debía al almidón residual, mientras que transiciones apenas perceptibles, que ocurrían a temperaturas mayores, las asignaron a las proteínas del gluten (Eliasson y Hegg 1980). Sin embargo, Arntfield y Murray señalaron que la falta de una endoterma reconocible debida a proteínas, no puede de hecho indicar que no ocurran transiciones térmicas en esas proteínas. En una corrida de DSC de proteínas, se observa una diferencia de entalpía asociada a un cambio molecular, debido al desplegamiento de la molécula de proteína. Este cambio es una combinación de reacciones endotérmicas, tales como la ruptura de uniones hidrógeno, y de reacciones exotérmicas, tales como la agregación proteica y la ruptura de interacciones hidrofóbicas. La desnaturalización térmica del gluten puede involucrar la ruptura de un número suficientemente grande de uniones hidrofóbicas como para cancelar la ruptura de uniones polares endotérmicas (Arntfield y Murray 1981).

### **3.3 Ensayos con masa**

Como no pudo observarse en forma directa por calorimetría diferencial de barrido la desnaturalización térmica de las proteínas de la harina, se recurrió a la observación indirecta de las modificaciones experimentadas por estas proteínas, a través de su comportamiento en un sistema como la masa, en el que las proteínas y el almidón compiten por el agua disponible. La masa utilizada para estos ensayos se preparó con una relación agua:harina de 0,6:1.

En sistemas con un exceso de agua, el almidón gelatini

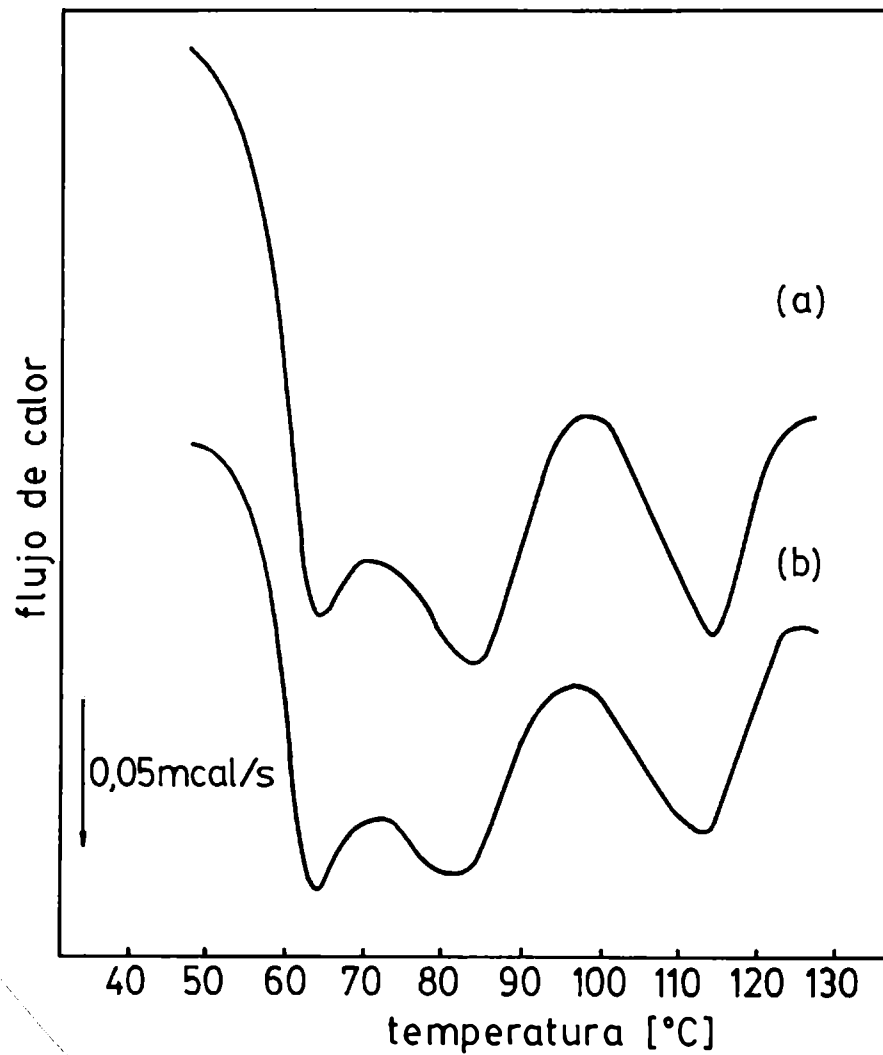
za dando un único pico, a una temperatura ligeramente superior a los 60°C. Al disminuir el contenido de agua, se reduce el área de este primer pico, apareciendo un segundo pico a una temperatura mayor. Esto se debe a que en sistemas con alto contenido de agua cada gránulo de almidón dispone de ésta fácilmente, mientras que en un sistema en el que el agua es limitante, dado que en una población de gránulos de almidón la gelatinización ocurre en un rango de temperatura, los gránulos que empiezan a gelatinizar primero se llevan el agua disponible, disminuyendo así el área del primer pico (Ghiasi y col. 1983).

Eliasson, trabajando con mezclas de gluten-almidón-agua, encontró que la variación de entalpía del primer pico, ( $\Delta H_I$ ), disminuía al aumentar la relación gluten/almidón, mientras que la variación de entalpía del segundo pico, ( $\Delta H_{II}$ ), era casi independiente de esta relación. Esto se interpretó teniendo en cuenta que en un sistema almidón-agua, el  $\Delta H_I$  disminuye al bajar el contenido de agua, y el gluten, al competir por ésta, haría disminuir el contenido de agua disponible para el almidón (Eliasson 1983). Por otro lado, este autor encontró que la temperatura del máximo de ambos picos aumentaba con la relación gluten/almidón.

En base a estos resultados, surgió la pregunta de si el hecho que las proteínas del gluten se encuentren desnaturalizadas podía afectar visiblemente su capacidad de competir con el almidón por el agua disponible, alterando el valor de la entalpía de gelatinización del almidón correspondiente al primer pico, o produciendo un corrimiento en la temperatura en ambos picos.

Para responder esta pregunta se hicieron corridas de DSC de masa hecha con harina de semillas control y de semillas

calentadas (lotes I<sub>a</sub>, I<sub>b</sub>, II<sub>c</sub> y III<sub>b</sub> de la Tabla I). En la Figura 22 se muestran dos termogramas: uno correspondiente a masa de semillas control y el otro a masa de semillas III<sub>b</sub>; en ambos casos se detectó la presencia de tres picos, correspondiendo los dos primeros al proceso de gelatinización de almidón y el tercero a la interacción lípido-amilosa (Ghiasi y col. 1983). Como se puede ver en esta figura, no se observó un corrimiento apreciable en la temperatura de los picos en los termogramas correspondientes a semillas calentadas con respecto a los termogramas de semillas control, y la diferencia más marcada fue una disminución en el área del segundo pico en relación al primero, al comparar los termogramas de semillas calentadas con los de semillas control. Esto podría deberse a un cambio en la capacidad de retención de agua de las proteínas del gluten; sin embargo, al calcular las áreas específicas de los dos picos en los termogramas de masa de semillas control y de semillas calentadas, se obtuvieron para el primer pico valores de 35,56 mm<sup>2</sup>/gr masa y 36,00 mm<sup>2</sup>/gr masa para muestras control y calentadas respectivamente, y para el segundo pico 62,50 mm<sup>2</sup>/gr masa y 52,88 mm<sup>2</sup>/gr masa. Los resultados anteriores son los promedios de nueve corridas para las muestras control, y de doce corridas para las muestras correspondientes a semillas secadas en distintas condiciones. Con estos datos se hizo un tratamiento estadístico (test t), encontrando que no había diferencias significativas entre las muestras control y las calentadas, en relación al área del primer pico para un nivel de significación del 5%, mientras que había diferencias, al mismo nivel de significación, en el área del segundo pico, entre los dos tipos de muestras. Estos resultados indican que las diferencias observadas en los ter



**Figura 22.** Termogramas de masa de harina de trigo, obtenidos por calorimetría diferencial de barrido. **a)** La muestra proviene de semillas control. **b)** La muestra proviene de semillas III<sub>b</sub>. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

mogramas se deben a una disminución en el área del segundo pico en las muestras calentadas, por lo que, si bien no puede descartarse la hipótesis de una alteración en la capacidad de retención de agua de las proteínas del gluten, los resultados obtenidos no se pueden explicar con los datos encontrados en bibliografía mencionados anteriormente. Otra posibilidad que hay que tener en cuenta, es que parte del almidón podría haber gelatinizado durante el secado de la semilla, lo que explicaría la disminución en el área del segundo pico en las muestras calentadas. Probablemente la realidad sea una combinación de estas dos hipótesis.

#### 4. UNIONES QUE INTERVIENEN EN LA ESTRUCTURA DEL GLUTEN

Hay distintos tipos de uniones responsables de las asociaciones moleculares que intervienen en los fenómenos de adhesión y cohesión de proteínas. Entre estas uniones están las de tipo electrostático, puentes hidrógeno, uniones hidrofóbicas y uniones covalentes. Las proteínas del gluten tienen pocos grupos cargados, de modo que las uniones de tipo electrostático no intervendrían en su estructura. En cambio, contienen más del 33% de restos de glutamina y asparagina, y estos aminoácidos son capaces de formar puentes hidrógeno. Además, se ha demostrado la participación de grupos hidrofóbicos en las asociaciones intermoleculares de proteínas de gluten de trigo, y también la presencia de puentes disulfuro, que tendrían mucha importancia en las propiedades del gluten (Wall y Huebner 1981).

Con el objeto de visualizar el rol que cumplen en la estructura, por un lado las uniones de tipo no covalente (hidrofóbicas, puentes hidrógeno, etc.), y por otro lado las de ti

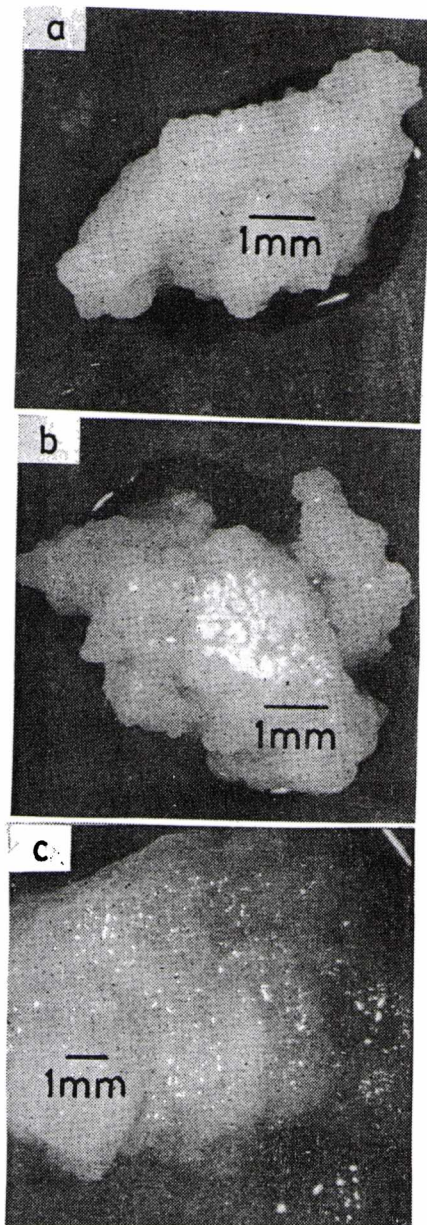


po covalente (puentes disulfuro), se trataron muestras de gluten con agentes que rompen selectivamente cada tipo de unión. Para romper las uniones de tipo no covalente se utilizó SDS, y para las covalentes, ME. El gluten así tratado se observó posteriormente bajo la lupa y al microscopio.

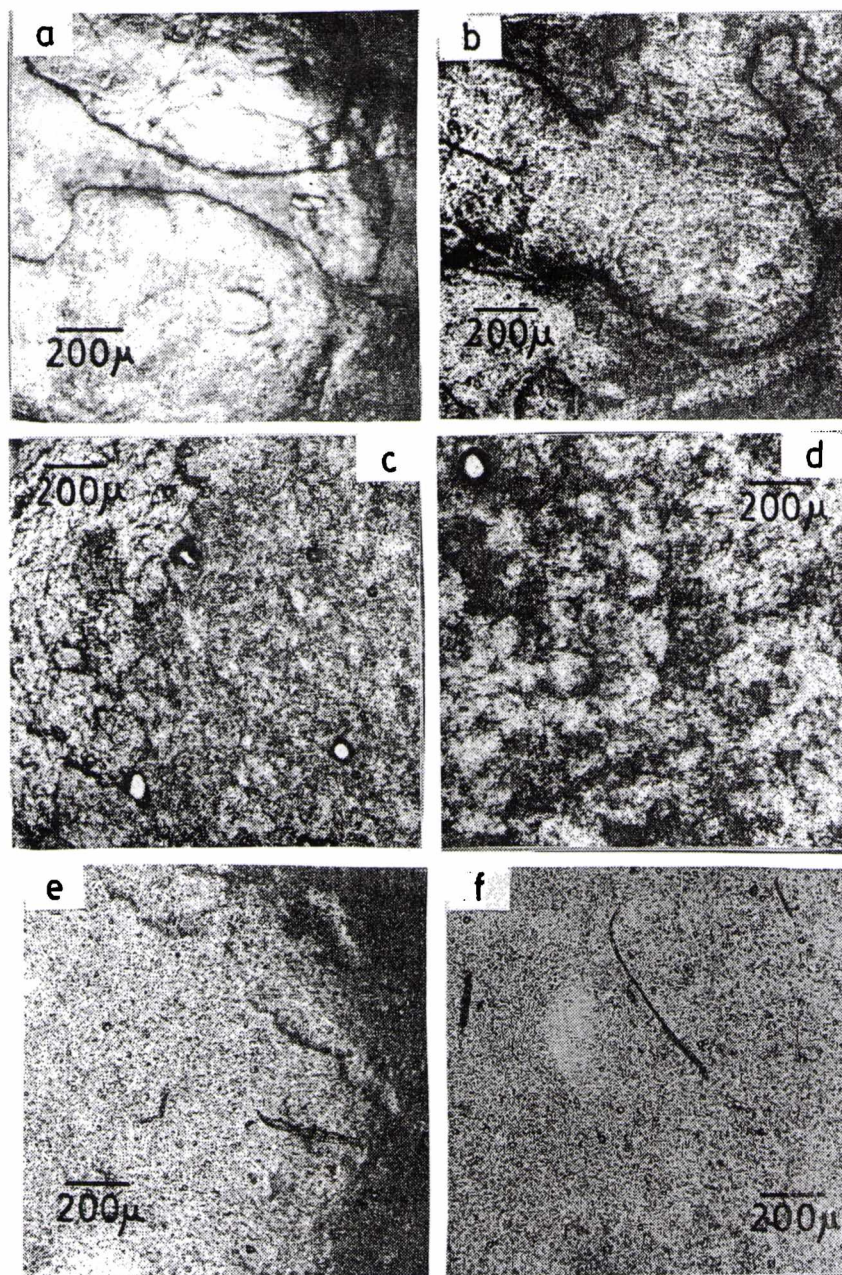
La observación directa permitió apreciar diferencias muy notorias en las muestras sometidas a distintos tratamientos. Así, el gluten normal, en agua destilada, tenía las propiedades viscoelásticas características, y era muy difícil de cortar. El gluten tratado con mercaptoetanol, en cambio, presentaba un aspecto similar al anterior a simple vista, pero había perdido la elasticidad y era muy fácil de cortar. El gluten tratado con SDS tenía un aspecto semejante al algodón, apareciendo hinchado e hidratado, y perdiendo su forma caracteristica. Por último, el gluten tratado con SDS y ME simultáneamente se disolvió en este medio.

En la Figura 23 se pueden ver fotografías obtenidas bajo la lupa, de gluten normal, tratado con SDS, y tratado con ME, en las que se aprecian las diferencias señaladas anteriormente.

En la Figura 24 se muestran micrografías de gluten normal y de gluten sometido a los tratamientos anteriores, obtenidas con y sin condensador. El condensador permite apreciar el relieve. Se puede ver que el gluten normal presenta una estructura compacta y firme, mientras que el gluten tratado con ME tiene un aspecto plano muy diferente al anterior, sin estructura compacta, observándose en la fotografía un punteado más fino, con zonas oscuras no tan delimitadas como en el gluten normal. En el caso del gluten tratado con SDS, se puede ver que la superficie es más suave y el punteado es homogéneo,



**Figura 23.** Gluten de trigo de semillas control, observado bajo la lupa.  
a) Tratado con agua destilada. b) Tratado con mercaptoetanol.  
c) Tratado con SDS.



**Figura 24.** Micrografías de gluten de trigo control. **a,b)** Tratado con a gua destilada. **c,d)** Tratado con mercaptoetanol. **e,f)** Tratado con SDS. Las micrografías a,c,e se tomaron con condensador.

sin zonas oscuras.

Para interpretar estos resultados, hay que considerar la contribución de los distintos tipos de proteínas del gluten en las propiedades de la masa. Las moléculas de gluteninas, grandes y asimétricas, tienen superficies extensas con numerosos grupos funcionales expuestos, que permiten una fuerte asociación por enlaces no covalentes. Fragmentos de proteínas del residuo, altamente entrecruzadas, contribuyen a la cohesión lateral y a la resistencia al flujo laminar. Las moléculas de gliadinas, más pequeñas, no están unidas tan estrechamente, y facilitan la fluidez y la expansión de la masa. Así, el agregado de agentes reductores, que rompen los puentes disulfuro, hace que la masa se vuelva más débil (Wall y Huebnener 1981), lo que explica el efecto del mercaptoetanol. El agregado de SDS, por otro lado, destruiría la fuerte asociación por enlaces no covalentes, haciendo que el gluten pierda su estructura y sus propiedades características.

En esta sección, se discutirán los resultados de los ensayos de viabilidad en relación a las condiciones de secado de las semillas, y se calculará la energía de activación del proceso de deterioro medido a través de estos ensayos, utilizando la temperatura del germen obtenida anteriormente para cada condición de secado (Tabla IV, pág. 64 ).

### 1.1 Ensayos de germinación

En la Tabla XIII se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de germinación, realizados con semillas secadas en las condiciones de la Tabla I.

Tabla XIII: Ensayo de germinación realizado con semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)</sup>.

Condiciones de secado	Control	I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>
% sem. germinadas a los 3 días	100	87	75	61	77	20	2	44	4	0

(1) Las condiciones de secado son las especificadas en la Tabla I.

Con estos resultados se hizo un análisis de varianza, considerando para los cálculos el número de semillas germinadas en cada caja de Petri, y tomando como fuentes de variación la temperatura del aire de secado y la humedad inicial de las semillas. El análisis dio como resultado, que existen diferencias a un nivel de significación del 1 % en los porcentajes de semillas germinadas, como consecuencia de los distin

MODIFICACIONES METABOLICAS DE  
LAS SEMILLAS DEBIDAS AL SECADO



Después de haber estudiado los cambios experimentados por las proteínas, tanto del embrión como del endosperma, durante el proceso de secado de la semilla, se analizarán algunas de las consecuencias del tratamiento térmico en relación al metabolismo. Es muy probable que las alteraciones que se discutirán en este capítulo se deban, en mayor o menor medida, a las modificaciones en las proteínas, sobre todo de embrión, estudiadas anteriormente. En años recientes, sin embargo, se ha desviado la atención hacia la destrucción por calor de la integridad de las membranas, como un paso primario en la injuria por alta temperatura (Steponkus 1981). No es el objetivo de este trabajo estudiar a nivel molecular todas las alteraciones producidas por la temperatura, y su efecto sobre el metabolismo de la semilla, sino analizar algunos cambios globales observados en el comportamiento metabólico de las semillas calentadas, que pueden estar relacionados con las modificaciones en la estructura de las proteínas discutidas anteriormente.

En primer lugar, se analizará la pérdida de viabilidad de las semillas en relación a las condiciones de secado, y posteriormente se observará el efecto del calentamiento sobre algunas vías del catabolismo, y sobre la sensibilidad de la semilla al NaF como inhibidor de la germinación.

## **1. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE SECADO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS**

Si el secado no se realiza en condiciones adecuadas, las semillas pueden dejar de servir como tales, perdiendo su capacidad de germinar. El ensayo de germinación es una de las pruebas más sensibles para medir el deterioro de la semilla.



tos tratamientos térmicos. Asimismo, se encontró que existe una interacción al mismo nivel de significación, entre los dos factores considerados (temperatura del aire y humedad inicial).

Las relaciones de varianzas obtenidas fueron 156,41 y 222,26 para la temperatura del aire y el contenido de humedad inicial como fuentes de variación respectivamente, ambas mayores a la razón de varianzas de la tabla, que es de 5,49 para un nivel de significación del 1 % y los grados de libertad correspondientes. El análisis de la interacción entre estas dos fuentes de variación, dio una relación de varianzas de 16,23. Este valor es superior al de la tabla, que es de 4,11 para este nivel de significación.

Con el objeto de analizar en forma independiente cada condición de secado, se hizo un análisis LSD (mínima diferencia significativa), comparando las medias de cada población. En primer lugar se tomó como fuente de variación la temperatura del aire, considerando en cada población las semillas que fueron secadas en iguales condiciones de temperatura, independientemente de su contenido de humedad inicial. El análisis dio como resultado que existen diferencias significativas al nivel de significación del 1 % en la viabilidad, entre las semillas secadas con una temperatura del aire de 110°C y las secadas a las temperaturas de 125°C y 140°C, y también entre las semillas secadas a estas dos últimas temperaturas. Al tomar como fuente de variación la humedad inicial de las semillas, independientemente de la temperatura de secado, se obtuvieron resultados equivalentes, encontrando diferencias significativas al nivel de significación del 1 % entre las semillas que partían con distintos contenidos de humedad. Los resultados anteriores, y los obtenidos al comparar las medias de la nueve condiciones de secado individualmente, se muestran en la Tabla

XIV. El valor de LSD para un nivel de significación del 1% fue de 1,97 si se toma como fuente de variación la temperatura del aire o el contenido de humedad inicial, y 3,41 si se comparan las nueve condiciones de secado individualmente; los valores mayores que éstos en la Tabla indican que existen diferencias entre las medias, para ese nivel de significación.

Tabla XIV: Diferencias entre las medias de poblaciones de semillas secadas en distintas condiciones, en relación a su capacidad germinativa<sup>(1)</sup> (2).

a) Tomando como fuente de variación la temperatura del aire de secado (a = 110°C, b = 125°C, c = 140°C):

$$|\bar{X}_a - \bar{X}_b| = \boxed{9,08} \quad |\bar{X}_b - \bar{X}_c| = \boxed{3,00}$$

b) Tomando como fuente de variación el contenido de humedad inicial de las semillas (I = 17 %, II = 21 %, III = 25 %):

$$|\bar{X}_I - \bar{X}_{II}| = \boxed{10,33} \quad |\bar{X}_{II} - \bar{X}_{III}| = \boxed{4,25}$$

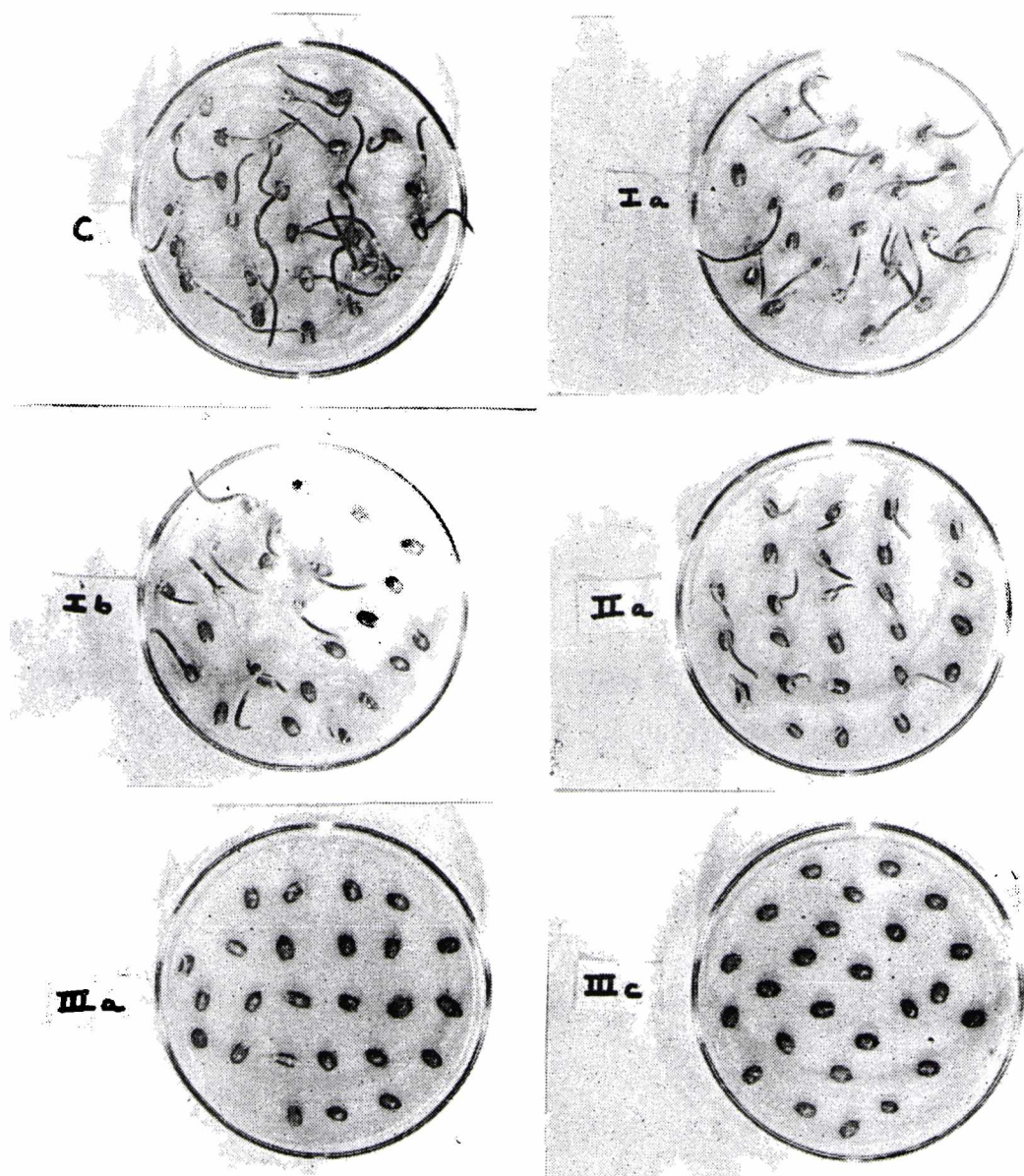
c) Tomando cada condición de secado individualmente<sup>(3)</sup>:

I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>	Condiciones de secado
-	3,00	$\boxed{6,50}$	2,50	$\boxed{16,75}$	21,25	10,75	20,75	21,75	I <sub>a</sub>
	-	$\boxed{3,50}$	0,50	$\boxed{13,75}$	18,25	7,75	17,75	18,75	I <sub>b</sub>
		-	$\boxed{4,00}$	10,25	14,75	4,25	14,25	15,25	I <sub>c</sub>
			-	$\boxed{14,25}$	18,75	8,25	18,25	19,25	II <sub>a</sub>
				-	$\boxed{4,50}$	6,00	4,00	5,00	II <sub>b</sub>
					-	$\boxed{10,50}$	0,50	0,50	II <sub>c</sub>
						-	$\boxed{10,00}$	11,00	III <sub>a</sub>
							-	1,00	III <sub>b</sub>
								-	III <sub>c</sub>

- (1) La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I.
- (2) Los valores recuadrados son diferentes al nivel de significación del 1%.
- (3) Los valores de esta Tabla son las diferencias entre las medias de las semillas secadas en las condiciones de las columnas, con respecto a las secadas en las condiciones de las filas.

Si se comparan los resultados de las Tablas XIII Y XIV, con los correspondientes a solubilidad de proteínas de embrión y endosperma (Tablas V, VI y X, págs. 66, 68 y 88 ) se puede observar que la viabilidad de las semillas se ve afectada en forma más drástica por la temperatura que la solubilidad de las proteínas, siendo por lo tanto un parámetro más sensible para medir el deterioro. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que para que la solubilidad de las proteínas disminuya hasta cero, como es el caso de la viabilidad, todas las proteínas extraíbles con el medio de extracción utilizado deben hacerse insolubles en ese medio, mientras que en el caso de la viabilidad, basta que un paso clave en el metabolismo de la semilla en germinación quede interrumpido para que la semilla no sea viable, si no puede suplantar esa vía por otra alternativa.

**1.1.1 Determinación de la energía de activación:** el objetivo de esta sección es estudiar la cinética de deterioro de la se milla como consecuencia del tratamiento térmico, a través de ensayos de viabilidad. Las pruebas se hicieron contando la can tidad de semillas germinadas a los tres días de la imbibición, clasificándolas en germinadas y no germinadas, inde pendiente mente del grado de desarrollo alcanzado por las semillas ger minadas. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 25 , no



**Figura 25.** Ensayo de germinación realizado con semillas secadas en distintas condiciones. Las fotografías se tomaron a los seis días de la imbibición de las semillas. La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I.

hay una diferencia muy grande en el grado de desarrollo entre las semillas germinadas de un mismo lote.

Si la semilla germina a los tres días, significa que no están totalmente dañados los componentes que son absolutamente imprescindibles para que germine. Probablemente haya uno que sea el limitante de este proceso, determinando por lo tanto que la semilla sea viable o no. Será viable si dicho componente no está dañado más de un determinado valor límite. Si las semillas fueran idénticas y hubieran estado sometidas todas exactamente a las mismas condiciones durante el tratamiento térmico, los resultados de los ensayos de viabilidad habrían dado porcentajes de germinación de 0 % o de 100 %, según las condiciones de secado. Como hay una cierta variabilidad biológica entre las semillas, y las condiciones de secado no fueron exactamente las mismas para todas, se obtuvieron distintos porcentajes de semillas germinadas de acuerdo a las condiciones de secado. La proporción de semillas germinadas estaría relacionada con la cantidad promedio del componente limitante que no está dañado en cada semilla.

Sin embargo, aparentemente no hay mucha variación entre las semillas, ya que las que germinaron en cada lote no presentan una variación muy grande en el grado de desarrollo alcanzado, mientras que hay diferencias marcadas al comparar distintos lotes entre sí. Esto indicaría que la semilla puede pasar de viable a no viable con pequeñas diferencias en el tratamiento térmico.

Además, en un mismo lote de semillas, como se observa en la Figura 25, hay semillas no germinadas, semillas que apenas germinaron y semillas germinadas. Entre estas últimas no hay diferencias marcadas en el grado de desarrollo alcanzado.

Si el factor determinante de la viabilidad fuera el mismo que el o los factores determinantes del grado de desarrollo, se esperaría encontrar en un mismo lote entre las semillas que germinaron, una variación más o menos continua del tamaño de la plántula. Como esto no se observa, se podría pensar que se trata de factores diferentes, es decir, un factor o componente limitante que determine si la semilla germina o no germina, y otro u otros que determinen el grado o la velocidad de desarrollo que tendrá la plántula en las semillas germinadas.

Para estudiar la cinética de deterioro de la semilla como consecuencia del tratamiento térmico, a través de los resultados de los ensayos de viabilidad, se utilizará la temperatura del germen durante el secado que se había determinado anteriormente (Resultados y Discusión, pág. 64). La temperatura del germen, por su posición en la semilla, es también la temperatura de las células de la capa de aleurona, que rodea al endosperma, y que son junto con el embrión las partes vivas de la semilla.

La energía de activación calculada a través de los porcentajes de germinación, sería la energía de activación para la inactivación del componente limitante de la pérdida de viabilidad. Para determinar esta energía de activación se calcularon las constantes de velocidad de reacción,  $k$ , para cada condición de secado, postulando una cinética de primer orden con respecto al tiempo. Los cálculos se realizaron de la misma manera que en Resultados y Discusión, pág. 79.

La energía de activación se calculó con la pendiente de la recta obtenida al graficar  $-\ln k$  en función de  $1/T$ , siendo  $T$  la temperatura absoluta (ecuación de Arrhenius). El

valor obtenido para la energía de activación fue de 163,5 Kcal/mol, con un coeficiente de correlación de 0,96 (Figura 26). Estos cálculos se realizaron también postulando cinéticas de orden cero y de orden dos con respecto al tiempo, obteniendo coeficientes de correlación menores.

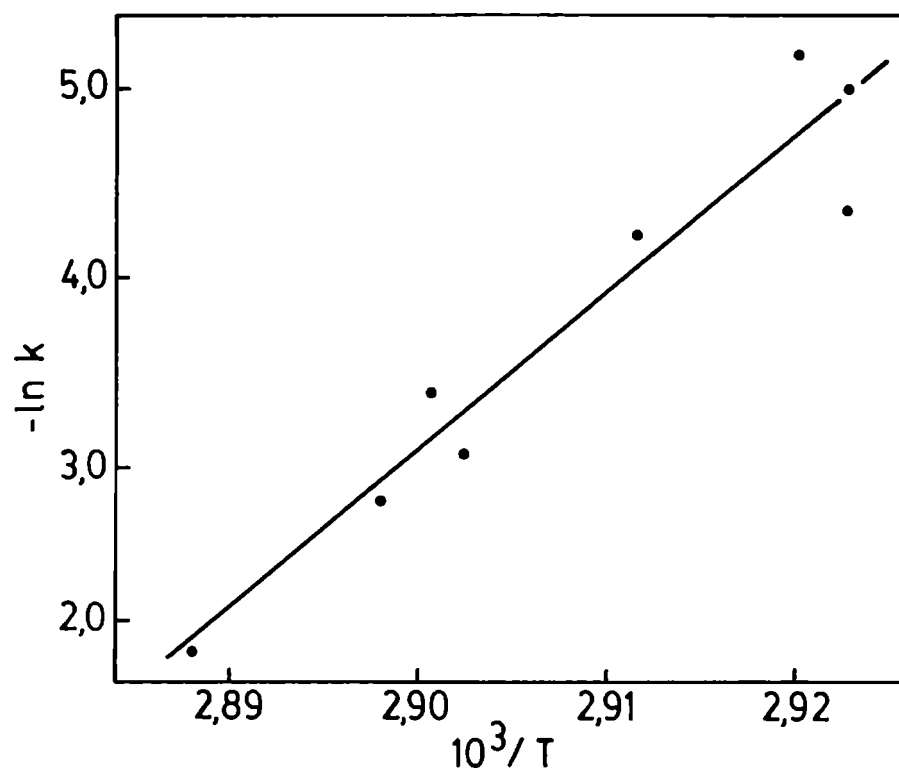
## **2. DIFERENCIAS EN EL COMPORTAMIENTO METABOLICO ENTRE SEMILLAS CALENTADAS Y NO CALENTADAS**

En esta sección se discutirán en primer lugar las consecuencias del calentamiento de la semilla sobre las vías de producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$  en las primeras horas después de la imbibición, y posteriormente se analizará el efecto del calentamiento sobre la susceptibilidad de la semilla al NaF como inhibidor de la germinación.

### **2.1 Efecto del calentamiento de la semilla sobre distintas vías metabólicas**

Se discutirán aquí los resultados de las determinaciones de la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$ , realizadas en las primeras horas después de la imbibición de las semillas, en presencia y en ausencia de un inhibidor metabólico, el NaF.

**2.1.1 Condiciones para la utilización de uno u otro sustrato respiratorio:** Con el objeto de estudiar el efecto del calentamiento sobre distintas vías del catabolismo en la semilla al comienzo de la germinación, se midió la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$  en semillas normales y calentadas, viendo a través de la determinación del cociente respiratorio el sustrato utilizado para la producción de energía y, por con



**Figura 26.** Cálculo de la energía de activación a partir de la ecuación de Arrhenius para la pérdida de viabilidad de las semillas de trigo sometidas a un tratamiento térmico.  $k$  = constante de velocidad.  $T$  = temperatura absoluta.



siguiente, las posibles vías metabólicas involucradas. El co ci en te r e s p i r a t o r i o (QR) se define como la relación molar en tre el  $\text{CO}_2$  producido y el  $\text{O}_2$  consumido. Este índice se usó inicialmente como criterio estequiométrico para tratar de dis cr im i n a r e entre varios tipos de oxidación. Así, en el caso de la oxidación completa de los hidratos de carbono, el cociente respiratorio es 1, mientras que en la oxidación de los lípidos, el cociente respiratorio es de 0,7 (Labouriau 1983) o 0,8 (Umbreit y col. 1959). En el caso de las proteínas, el co ci en te r e s p i r a t o r i o puede ser mayor o menor que uno según su con te n i d o de aminoácidos: para el caso del ácido glutámico, por ejemplo, que es el resto aminoácido que se encuentra en mayor proporción en trigo, tanto en las proteínas del endosperma y la aleurona como en el embrión (Simmonds 1978, Barnes 1982) generalmente bajo la forma de glutamina, el QR es 1,25. Umbreit y col. (1959) dan el valor de 0,9 para la mayoría de las proteínas, mientras que estudios en vegetales mostraron que en general los aminoácidos cuyos esqueletos carbonados es t án estrechamente relacionados con intermediarios respiratorios, como alanina, glutámico y aspártico, son más fácilmente utilizados como sustratos respiratorios (Rees 1980). Estos aminoácidos dan cocientes respiratorios mayores que uno.

Aunque las plantas pueden utilizar, y de hecho uti li zan lípidos y proteínas como sustratos respiratorios, la evidencia disponible indica que la mayoría de las células vegetales usan en la mayor parte de su vida los carbohidratos como principal fuente de energía (Rees 1980). Se esperaría entonces que las semillas normales utilicen carbohidratos, aunque según el tipo de semilla y el momento y las condiciones de me d i d a, utilizarán hidratos de carbono, lípidos o proteínas (Labouriau 1983).

En la Tabla XV, se pueden ver los cocientes respiratorios calculados para semillas normales y calentadas, entre las dos y las cuatro horas después de la imbibición con una solución de NaCl. Las medidas se hicieron a partir de las dos horas de imbibición, ya que la semilla tiene un período de una o dos horas al comienzo de ésta, durante el cual el intercambio gaseoso que se observa es mínimo (Figura 27, pág. 134). Los valores obtenidos, tanto para las semillas normales como para las calentadas, son cercanos a uno, lo que indicaría que, en las condiciones del ensayo, ambas utilizan principalmente a los carbohidratos como fuente de energía.

Tabla XV: Cociente respiratorio en semillas normales y calentadas, en un medio de imbibición con NaCl

Semillas	Control	Calentadas
Cociente respiratorio	1,08	1,06

Más adelante se analizarán los resultados obtenidos en las medidas de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> y de consumo de O<sub>2</sub>, en semillas normales y calentadas que utilizan este sustrato para la respiración.

Con el objeto de estudiar también el efecto del calentamiento sobre otras vías del catabolismo, se recurrió a un inhibidor de la glicólisis, el NaF, para forzar a las semillas a utilizar otro sustrato y otra vía para obtener energía. El NaF es un veneno metabólico, que actúa sobre diferentes compo

nentes celulares, provocando distintos efectos de acuerdo al sistema y a las condiciones del estudio. Se encontró que el fluoruro, ligado al  $Mg^{++}$  o a metales pesados divalentes, causa la inhibición in vitro de varias enzimas, como la enolasa y la fosfoglucomutasa (Lendzian y Unsworth 1983). Se esperaría entonces, si el fluoruro inhibe la enolasa, que siendo ésta una enzima que actúa al final de la vía glicolítica, se interrumpa esta vía y la semilla recurra a otros sustratos para obtener energía.

En la Tabla XVI, se pueden ver los resultados obtenidos al calcular el cociente respiratorio de semillas normales y calentadas, medidos entre las dos y las cuatro horas después de la imbibición con una solución de NaF.

Tabla XVI: Cociente respiratorio en semillas normales y calentadas en un medio de imbibición con NaF.

Semillas	Control	Calentadas
Cociente respiratorio	0,73	0,79

Se puede observar que el cociente respiratorio es menor que uno, lo que indica que la semilla estaría utilizando lípidos o proteínas, o quizás ambos, como sustrato. Por los valores obtenidos, de acuerdo a lo discutido anteriormente, muy probablemente la fuente de energía utilizada sean los lípidos. El embrión de trigo posee un alto contenido en lípidos (Barnes 1982) que posiblemente utilice como sustrato res

piratorio si no puede utilizar los glúcidos.

En consecuencia, se podrá observar el efecto del calentamiento de las semillas en las vías de degradación de los azúcares, midiendo la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$  en una solución de NaCl, y en otras vías catabólicas, posiblemente las que intervienen en la oxidación de los lípidos, midiendo la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  y de consumo de  $\text{O}_2$  en una solución de NaF.

**2.1.2 Efecto del calentamiento de la semilla sobre la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$  partiendo de distintos sustratos:** se analizarán ahora los resultados obtenidos al medir la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  y de consumo de  $\text{O}_2$  en semillas calentadas y no calentadas, después de la imbibición con una solución de NaCl y con una solución de NaF. En el primer caso, se estaría midiendo la velocidad de utilización de las vías de degradación de los azúcares, y en el segundo, la velocidad de utilización de otras vías degradativas, posiblemente la oxidación de lípidos.

En la Tabla XVII se muestran los valores de velocidad de consumo  $\text{O}_2$ , obtenidos calculando la pendiente de los gráficos de volumen de  $\text{O}_2$  consumido vs tiempo (Figura 27), entre las dos y las cuatro horas después de la imbibición de las semillas.

Se puede observar que, tanto para el caso de las semillas puestas en solución de NaCl, que utilizarían vías de degradación de azúcares, como para las semillas puestas en solución de NaF, que utilizarían otras vías, posiblemente de degradación de lípidos, la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  es menor en las semillas calentadas que en las no calentadas. En el caso de las semillas puestas en solución de NaCl, la velocidad

de utilización de  $O_2$  en las semillas calentadas fue un 84,5% de la velocidad en las semillas control. Por otra parte, en el caso de las semillas puestas en solución de NaF, la velocidad de utilización de  $O_2$  en las semillas calentadas fue un 75,8% de la velocidad en las semillas control, medida en las mismas condiciones.

Tabla XVII: Velocidad de consumo de oxígeno de semillas normales y calentadas en un medio de NaCl y de NaF

Medio de imbibición	Semillas	Velocidad de consumo de $O_2$ ( $\mu$ l/hora) 30 sem.
NaCl	Normales	71,0
	Calentadas	60,0
NaF	Normales	61,2
	Calentadas	46,4

Estos resultados indicarían que el calentamiento de las semillas afectó tanto la utilización de la vía de degradación de azúcares como la utilización de otra vía degradativa, posiblemente de degradación de lípidos. Aparentemente, la utilización de esta última disminuyó más que la utilización de la primera como consecuencia del calentamiento.

Se puede observar también, por los resultados de la Tabla XVII, que aunque la velocidad de consumo de  $O_2$  es ligeramente menor en las semillas que no pueden utilizar la vía glicolítica para obtener energía, habría de todas maneras un con

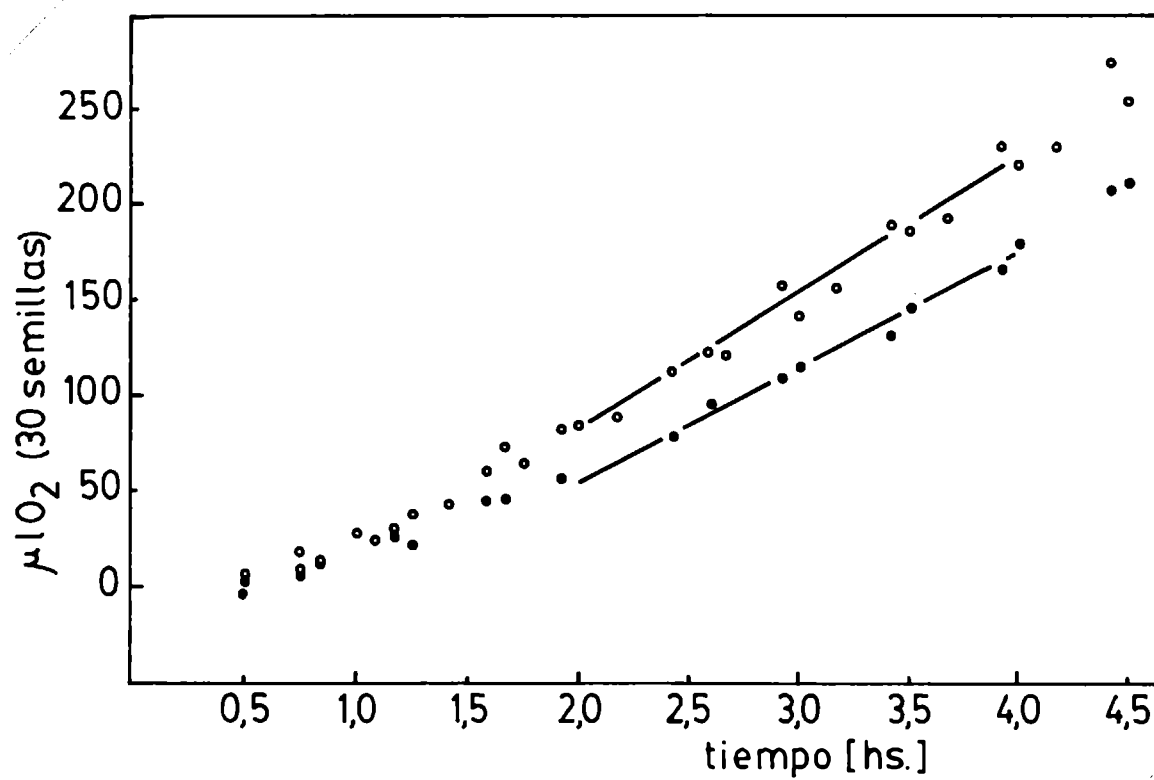
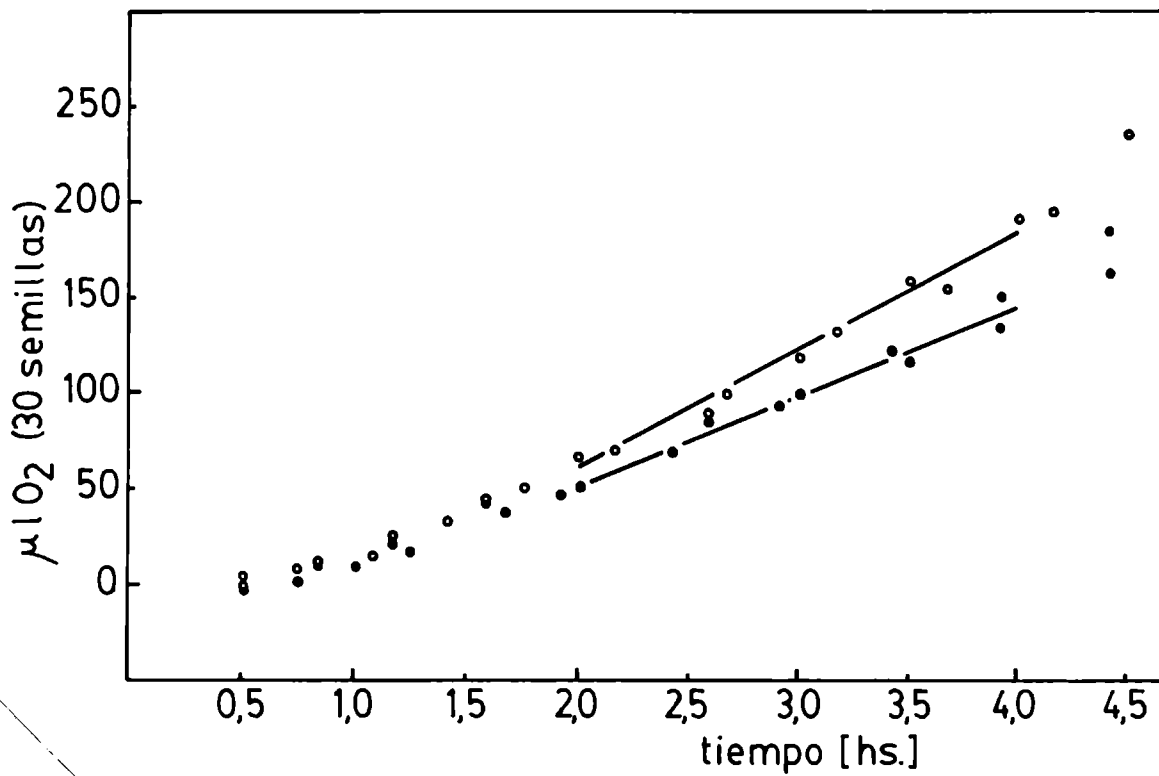


Figura 27. Consumo de oxígeno en las primeras horas después de la imbibición en semillas normales y calentadas. a) Utilizando como medio de imbibición una solución de NaCl 0,15M.



b) Utilizando como medio de imbibición una solución de NaF 0,15M. Cada punto representa el promedio de una a tres determinaciones simultáneas.  
• Semillas normales. • Semillas calentadas.

sumo de  $O_2$  importante, lo que indicaría que las semillas pueden utilizar otros sustratos respiratorios, y el efecto del fluoruro sobre la vía glicolítica no determinaría la pérdida de viabilidad de estas semillas.

Más adelante se analizarán las causas de esta pérdida de viabilidad, que fue total, tanto en semillas calentadas como en semillas no calentadas, al ponerlas a germinar en una solución de NaF 0,15M.

Si se compara la velocidad de consumo de  $O_2$  de las semillas con sus respectivos porcentajes de germinación, cuando se utiliza como medio de imbibición una solución de NaCl (Tabla XVIII), se observa que, mientras la velocidad de consumo de  $O_2$  disminuye en las semillas calentadas hasta llegar al 84,5% del valor de las semillas control, el porcentaje de germinación en las mismas semillas disminuye mucho más, hasta llegar a un 46,9% del control.

Tabla XVIII: Velocidad de consumo de oxígeno y porcentaje de germinación de semillas normales y calentadas en solución de NaCl.

Semillas	Normales	Calentadas
Veloc. consumo $O_2$ ( $\mu$ l/hora) 30 sem.	71,0	60,0
% germ. a los 7 días	98	46

Esto indica que la viabilidad de las semillas se afecta mucho más por el tratamiento térmico que la respiración, y hace que se descarten los pasos metabólicos de la respira



ción como factor limitante de la pérdida de viabilidad.

## 2.2 Efecto del calentamiento de la semilla sobre su susceptibilidad al NaF como inhibidor de la germinación

El fluoruro actúa sobre diferentes componentes celulares, provocando distintas alteraciones. Así, como se mencionó en la pág. 131, se encontró que el fluoruro ligado al  $Mg^{++}$  o a metales pesados divalentes, causa la inhibición in vitro de varias enzimas, como la enolasa y la fosfoglucomutasa (Lendzian y Unsworth 1983). Además, el fluoruro actúa como inhibidor no competitivo de tres isoenzimas de fosfatasa ácida de germen de trigo, causando una disminución del 37 al 48% en la actividad, según la isoenzima, para una concentración del inhibidor de 0,5 mM (Verjee 1969).

En maíz, se observó que el efecto del fluoruro como retardador del crecimiento, ocasionado por la disminución de la multiplicación y la elongación celular, parece estar asociado con su acción sobre la síntesis de proteínas (Lendzian y Unsworth 1983). El fluoruro de sodio inhibe la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas en las células eucarióticas (Hoerz y McCarty 1969), y este efecto hay que tenerlo presente al analizar las causas de la pérdida de viabilidad. Como se vio anteriormente (pág. 133), en las semillas que no pueden utilizar la vía glicolítica igual se observa un consumo de  $O_2$  apreciable, por lo que habría producción de energía. Esto lleva a pensar que la pérdida de viabilidad observada en las semillas puestas a germinar en presencia de NaF (Tabla XIX, pág. 138), estaría asociada a la acción del fluoruro sobre la síntesis de proteínas.

Con el objeto de analizar si el efecto del fluoruro como inhibidor de la germinación era diferente en las semi

llas calentadas en relación a las normales, se hicieron ensayos de germinación en soluciones de NaF de concentración creciente, con semillas calentadas y no calentadas.

Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla XIX, expresados como porcentajes de semillas germinadas en cada medio, y también como porcentajes de semillas germinadas tomando como 100% el valor correspondiente a las mismas semillas puestas en solución de NaCl. Todas las soluciones tenían igual fuerza iónica y la misma concentración de sodio.

Tabla XIX: Porcentajes de germinación de semillas calentadas y no calentadas, en medios con distinta concentración de NaF.

Composición del medio		Porcentajes de germinación (%)			
NaF (mM)	NaCl (mM)	Semillas			
		Control	Calentadas	Control <sup>(1)</sup>	Calentadas <sup>(1)</sup>
0	150,0	98	46	100	100
5,0	145,0	72	39	73	85
7,5	142,5	--	22	--	48
10,0	140,0	52	30	53	65
12,5	137,5	--	18	--	39
15,0	135,0	42	4	43	9
17,5	132,5	--	6	--	13
20,0	130,0	32	2	33	4
25,0	125,0	--	0	--	0
30,0	120,0	10	0	10	0
40,0	110,0	2	0	2	0
55,0	95,0	0	0	0	0

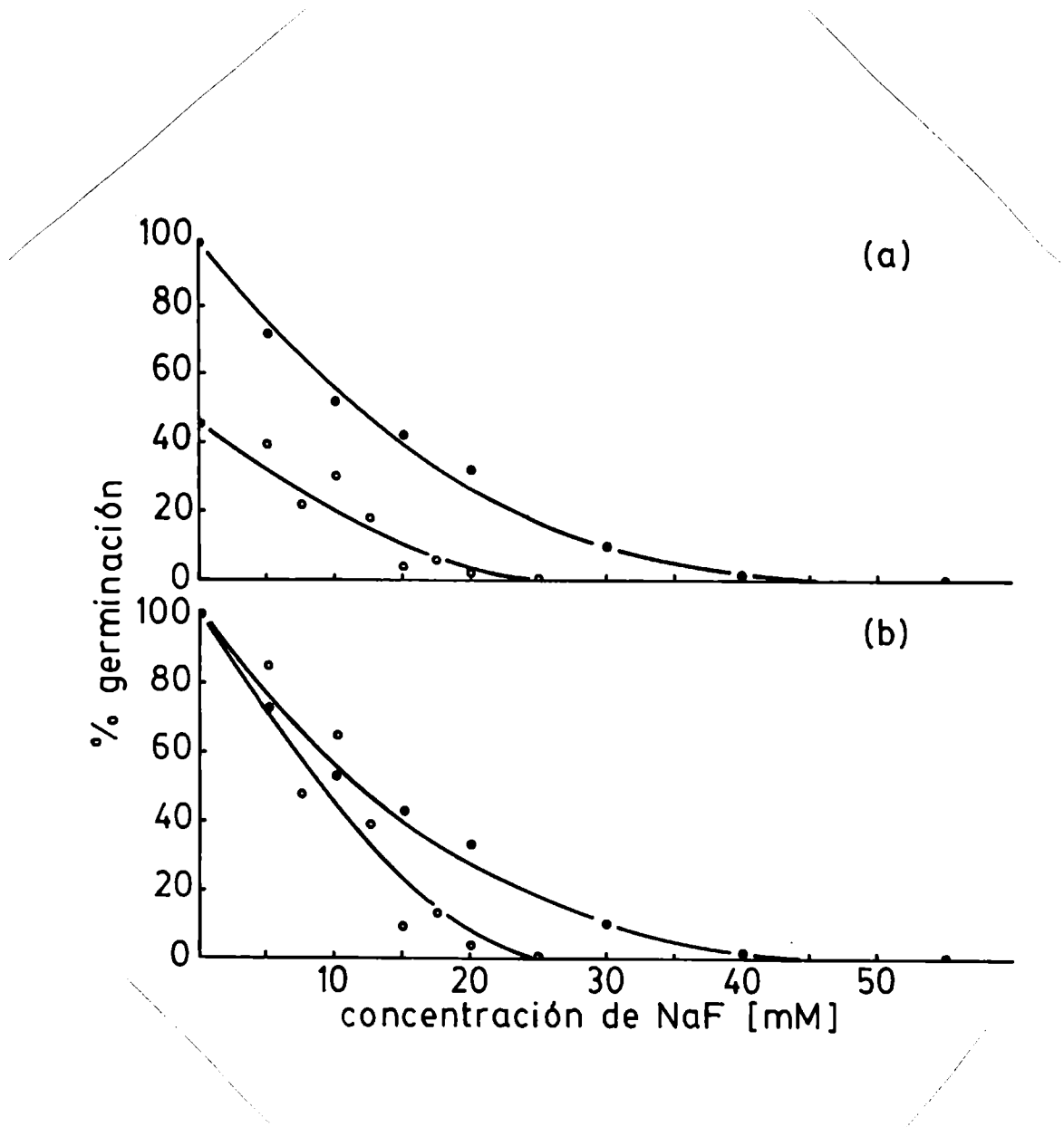
(1) Porcentajes calculados tomando como 100% el valor correspondiente a NaCl 150 mM.

Estos puntos están graficados en la Figura 28a y b.

En la Figura 28a están representadas la curva correspondiente a semillas control y la curva correspondiente a semillas calentadas, en esta última influyen en la pérdida de viabilidad tanto el efecto del calentamiento como el efecto del NaF. En la Figura 28b, al tomar como 100% el valor correspondiente a las semillas puestas en solución de NaCl, se logra independizar de la historia previa de las semillas (en el caso de las semillas calentadas, del efecto de la temperatura), considerando sólo el efecto del NaF. Así, se puede observar que la sensibilidad al NaF sería diferente en las semillas normales con respecto a las calentadas, siendo estas últimas más sensibles, ya que la curva que indica pérdida de viabilidad por efecto del NaF tiene una mayor pendiente en este último caso.

Para explicar este resultado, se puede pensar que las semillas calentadas pueden tener alterada la permeabilidad de sus membranas, de manera tal que estas semillas puedan absorber fluoruro más fácilmente que las normales y alcanzar una concentración intracelular de fluoruro mayor. De hecho, se ha encontrado que las exposiciones agudas a altas temperaturas, producen una pérdida de la semipermeabilidad de las membranas, e incluso algunos autores consideran que la destrucción de la integridad de las membranas es un paso primario en la injuria por alta temperatura (Steponkus 1981).

Otra posible explicación sería que algunos de los sitios a los cuales se une el fluoruro provocando la pérdida



**Figura 28.** Ensayos de germinación realizados con semillas calentadas y no calentadas, utilizando como medios de imbibición soluciones de NaCl + NaF 150 mM en distintas proporciones. **a)** Porcentajes de germinación reales. **b)** Porcentajes de germinación tomando como 100 % el valor correspondiente a NaCl 150 mM.

de viabilidad, se hayan alterado durante el tratamiento térmico, de manera que hayan perdido, tanto su actividad como su capacidad de unir al fluoruro, quedando de esta manera más fluoruro disponible para los sitios equivalentes que no se hayan alterado durante el calentamiento. Así, el efecto sería un aumento en la concentración de fluoruro que puede unirse a los sitios activos.

TRATAMIENTO TERMICO  
INTERRELACION PROTEINA-CALIDAD



El objetivo de este trabajo fue estudiar el deterioro que puede sufrir la semilla de trigo debido al secado por aire caliente, que trae como consecuencia una pérdida de viabilidad y de capacidad panadera.

Para ello, se secaron semillas de trigo en distintas condiciones de temperatura, tiempo y humedad inicial, observando en las determinaciones realizadas, que la temperatura es un factor mucho más crítico para la calidad de la semilla que el tiempo de secado (págs. 69, 75, 84, 88 y 120).

Las determinaciones de viabilidad mostraron que ésta había disminuido, hasta llegar a un 0% de germinación en el lote de semillas secadas en condiciones más drásticas (pág. 120), siendo en consecuencia este ensayo una de las pruebas más sensibles para detectar el deterioro producido. Por otro lado, en la prueba de panificación (pág. 82), se obtuvieron diferencias muy marcadas en la forma de los pancitos y en su volumen, que disminuyó hasta llegar al 74% del volumen correspondiente al control. Se observaron también diferencias en el metabolismo de la semilla calentada, con respecto a la no calentada: la velocidad de consumo de oxígeno en las semillas calentadas puestas en solución de NaCl fue 0,845 de la correspondiente a semillas control (pág.133), y su sensibilidad al NaF fue también mayor (pág.139).

Este deterioro debe ser el resultado de alteraciones en los componentes de la semilla. Entre estos componentes, las proteínas son imprescindibles, tanto para la viabilidad como para la calidad industrial, y son, además, muy sensibles al calor. Esto hizo que se analizara el efecto del tratamiento térmico de las semillas a través del estudio de las alteraciones sufridas por sus proteínas, tanto de embrión como de endosperma, correlacionando posteriormente estos resultados con la



pérdida de viabilidad y de capacidad panadera.

La desnaturalización de las proteínas se puede visualizar a través de su pérdida de solubilidad. Para estos ensayos, se utilizó una solución salina para extraer las proteínas de embrión, que están directamente relacionadas con la germinación de la semilla, y un medio con SDS para extraer las proteínas del endosperma, responsables de la formación del gluten e insolubles en agua.

En ambos casos, se observó una pérdida de solubilidad debida al calentamiento de la semilla, hasta alcanzar valores con respecto al control que fueron del 68% y 79% para embrión y endosperma respectivamente (págs. 66 y 88 ), en las semillas más calentadas. La insolubilización fue mayor en las proteínas del embrión; sin embargo, el hecho que haya disminuido la solubilidad de las proteínas del endosperma en un medio con SDS, indicaría que se formaron, como consecuencia del secado, uniones nuevas en estas proteínas, probablemente de tipo covalente, ya que este detergente rompe las uniones no covalentes.

En las corridas electroforéticas de estos extractos proteicos, que fueron calentados previamente con SDS o con SDS y ME durante 5 min. a 100°C, se observaron diferencias, sobre todo en los extractos de endosperma, entre las muestras tratadas y no tratadas con ME. Este agente rompe puentes disulfuro, lo que lleva a pensar que estos enlaces no se rompen por calentamiento a 100°C durante 5 min. En base a estas consideraciones, se puede interpretar la pérdida de solubilidad de las proteínas del endosperma en un medio con SDS, suponiendo que, durante el secado de la semilla, se produjeron cambios estructurales en estas proteínas, rompiéndose uniones no covalentes, y quedando expuestos determinados grupos que dieron origen a nuevas uniones, posiblemente de tipo covalente. Las mayores

diferencias, como se señaló anteriormente, entre las muestras tratadas y las no tratadas con ME, se observaron en los extractos de endosperma, lo que indica que estas proteínas tienen una mayor cantidad de puentes disulfuro intermoleculares.

Estas diferencias aparecían principalmente en zonas de peso molecular entre 30.000 y 70.000 daltons, donde se encuentran gluteninas (pág. 91), que se consideran, al menos en parte, formadas por subunidades unidas por puentes disulfuro.

Al comparar los diagramas electroforéticos de extractos proteicos de semillas calentadas y no calentadas, se observó que en las muestras calentadas disminuían algunos picos, tanto en los extractos de embrión como en los de endosperma. Estas diferencias aparecían en la zona de alto peso molecular: en los diagramas de embrión se observaron principalmente en la zona de peso molecular 75.000 (pág.74), y en los de endosperma, fundamentalmente en la zona de peso molecular mayor que 70.000, aunque también en un rango de pesos moleculares entre 50.000 y 70.000 daltons (pág. 99). La disminución de estos picos puede deberse a la formación de agregados insolubles (pág. 78) proceso que sería más fácil en las especies proteicas de mayor peso molecular.

El gluten, que es el principal determinante de las propiedades reológicas de la masa, se forma durante el amasado, en el cual las moléculas de proteína forman una red con entrecruzamientos ocasionales (Bloksma 1978). Así, las proteínas de almacenamiento cambian su conformación durante el amasado, y adquieren propiedades diferentes a las que tenían en el endosperma de la semilla. Esto hace que la temperatura pueda tener, o no, un efecto diferente al calentar la semilla que al calentar gluten. Sin embargo, Schofield y colaboradores estudiaron

gluten al que sometieron a distintos tratamientos térmicos, y obtuvieron resultados equivalentes a los discutidos anteriormente : al calentar gluten en un rango de temperatura entre 55 y 75°C, disminuía la solubilidad de las proteínas en SDS, observando una disminución selectiva en los picos correspondientes a gluteninas, que fue atribuida a la polimerización de estas proteínas (Schofield y col. 1983). Se puede concluir, entonces, que esta insolubilización de las gluteninas producida por calentamiento, tendría lugar tanto si estas proteínas están en la semilla como si están formando parte del gluten.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados ya analizados (pág.143), los puentes disulfuro no se romperían en el rango de temperatura utilizado en los ensayos de calorimetría diferencial de barrido, de manera que las transiciones térmicas observadas en los termogramas de DSC de proteínas se deberían a la ruptura de enlaces no covalentes y, eventualmente, a la formación de nuevos enlaces.

En las corridas que se hicieron en trigo, se observó, en el caso de embrión, un pico endotérmico, que fue atribuido a la desnaturalización térmica de proteínas (pág. 44). En el caso del endosperma, por el contrario, no se observaron picos definidos de desnaturalización de proteínas (pág.108), aunque las proteínas del endosperma también sufren alteraciones como consecuencia del calentamiento, como demostraron los ensayos de solubilidad y de electroforesis. Estas observaciones se pueden explicar teniendo en cuenta que en la desnaturalización de una proteína puede haber una combinación de reacciones endotérmicas, tales como la ruptura de puentes hidrógeno, y de reacciones exotérmicas, como la agregación proteica. La natu

raleza endotérmica de un termograma indica una gran contribución de la ruptura de puentes hidrógeno (Arntfield y Murray, 1981); éste sería el caso de la desnaturalización térmica de las proteínas de embrión. En cambio, en las corridas de gluten, en las que no se obtuvieron picos definidos, podría haber una compensación de reacciones endotérmicas y exotérmicas debidas al calentamiento (Arntfield y Murray 1981).

Los cambios sufridos por el endosperma durante el secado, se pusieron de manifiesto en los termogramas de masa, en los que se observó la disminución de uno de los picos. Esto podría deberse a diferencias en la capacidad de retención de agua de las proteínas del gluten, o a una pregelatinización del almidón.

El hecho de haber obtenido un pico definido de desnaturalización térmica de proteínas en las corridas de calorimetría diferencial de barrido de embrión de trigo, permitió estudiar la cinética de este proceso por DSC. Utilizando un método dinámico, se determinó la energía de activación y el factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius, obteniendo valores de 98,3 Kcal/mol y  $7,83 \times 10^{60} \text{ min}^{-1}$  para la energía de activación y el factor preexponencial respectivamente (pág. 52 ). Estos resultados fueron confirmados con un método isotérmico, con el cual se verificó también el orden de reacción propuesto, que era orden 1 (pág. 57).

Con los resultados de las determinaciones del contenido de proteína soluble de embrión para cada condición de secado (pág. 65), y la temperatura equivalente del embrión durante este proceso, que fue calculada por calorimetría diferencial de barrido (pág. 62), se obtuvieron los valores de la energía de activación y del factor preexponencial para la insolubilización de proteínas de embrión durante el secado.

Los resultados obtenidos fueron 78,0 Kcal/mol para la energía de activación, y 108,8 para el logaritmo natural del factor preexponencial de Arrhenius.

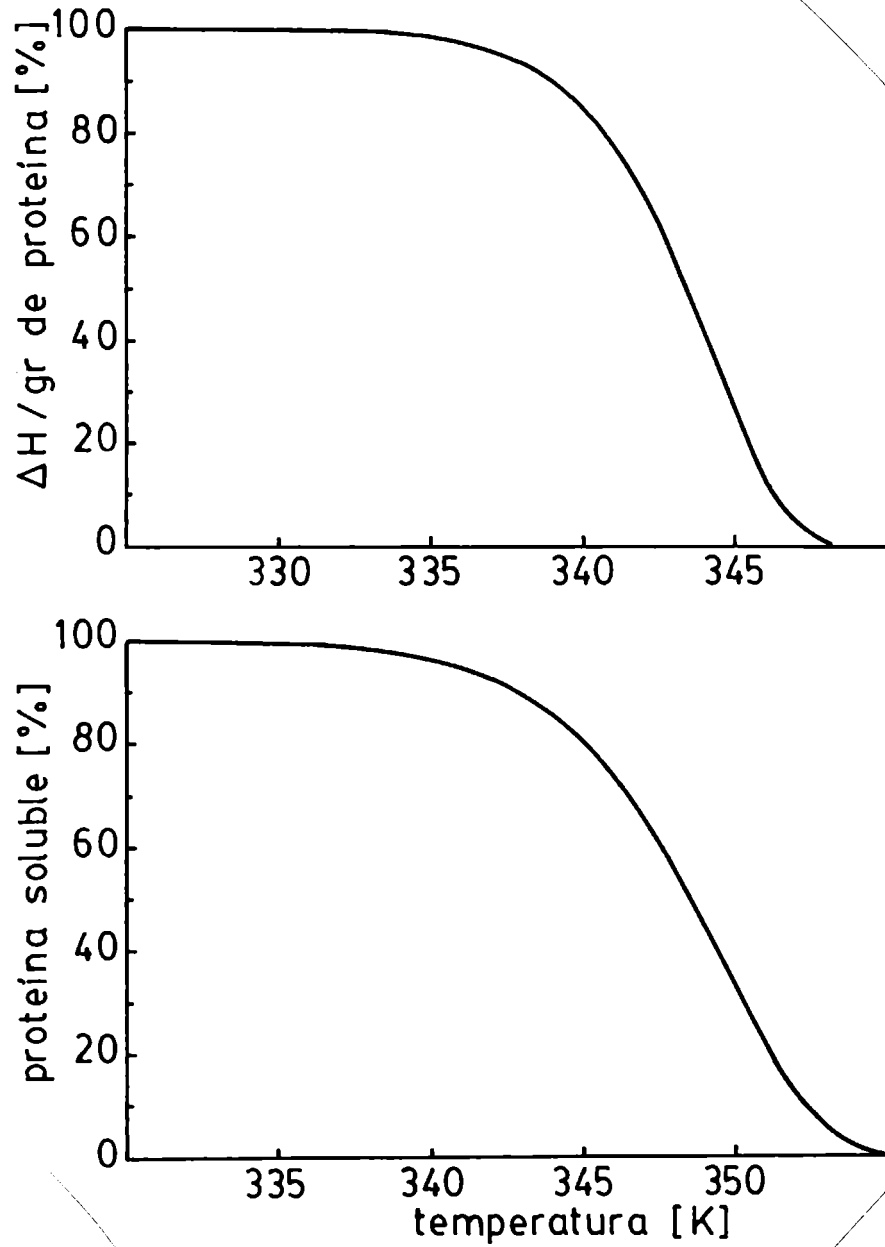
Estos valores de energía de activación y factor preexponencial, permiten trazar curvas como las de la Figura 29, en la que se ve la disminución de una determinada propiedad A (en este caso %  $\Delta H$ /gr de proteína y % de proteína soluble, siempre con respecto al control), a medida que aumenta la temperatura de secado de la semilla, para un tiempo fijo de calentamiento. Para obtener los valores de A, se calcularon las constantes de velocidad de reacción (k), utilizando la ecuación de Arrhenius, en un rango de temperatura de 50 a 100°C, teniendo como datos la energía de activación (Ea) y el factor preexponencial (Z) determinados experimentalmente. Con las constantes de velocidad se calcularon los valores de A para este rango de temperaturas, utilizando la ecuación de una cinética de primer orden. La función resultante fue la siguiente:

$$A = 10 \left( 2 - \frac{t Z e^{-Ea/RT}}{2,303} \right) \quad (20)$$

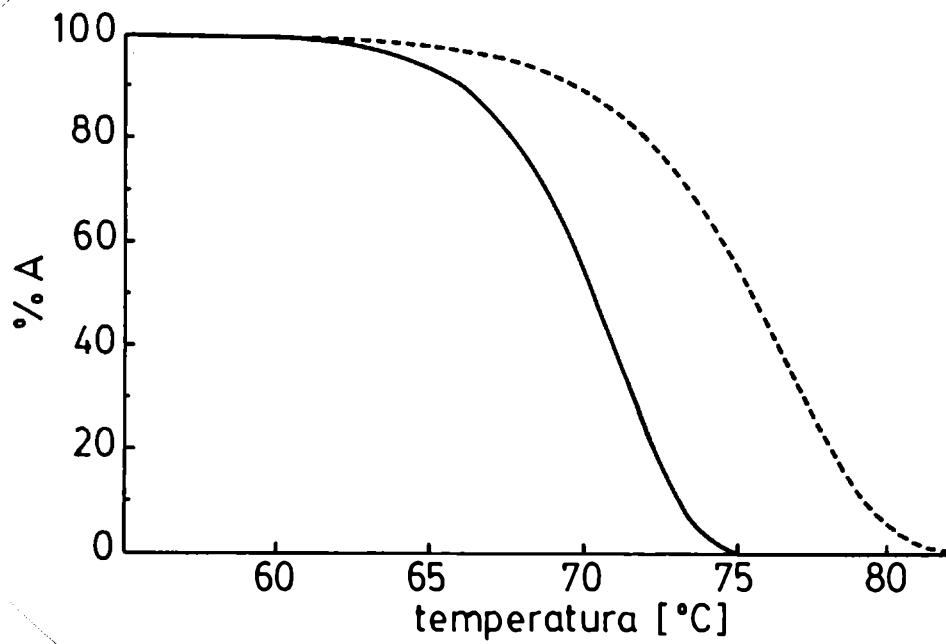
donde A es el porcentaje de la propiedad medida con respecto a las semillas control, y t es el tiempo en minutos.

En la Figura 30 se puede observar, en primer lugar, que la pendiente de la curva de desnaturalización observada por DSC, es mayor que la pendiente de la curva de insolubilización de proteínas. Es decir que la desnaturalización medida por este método, es completa en un rango menor de temperatura que la insolubilización de proteínas.

Si se elige una temperatura, como 70°C, se puede ver en la Figura 30, que para un tiempo de secado de 30 min., la



**Figura 29.** Porcentajes de proteína nativa y de proteína soluble de embrión de trigo en función de la temperatura del tratamiento térmico, para un tiempo de calentamiento de 30 min.

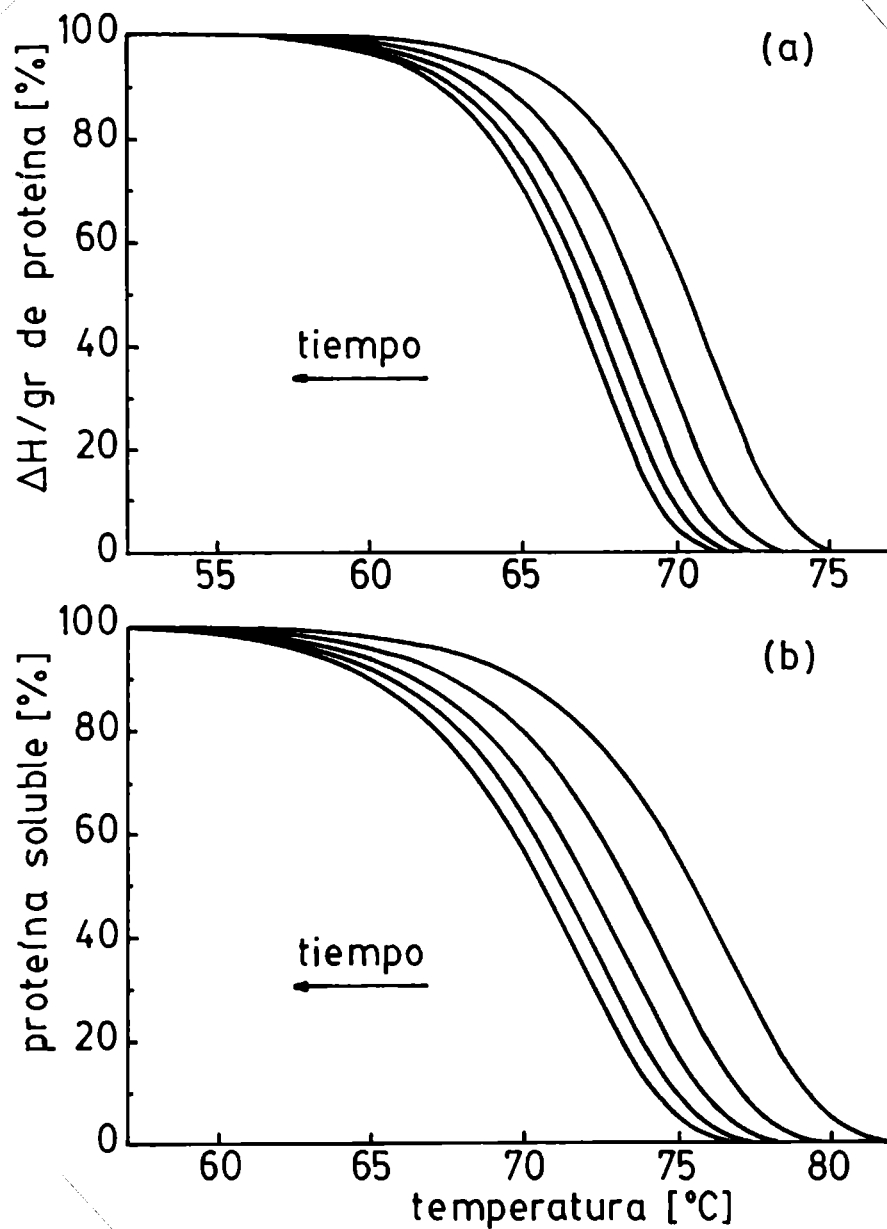


**Figura 30.** Porcentajes de proteína nativa y de proteína soluble de embrión de trigo en función de la temperatura del tratamiento térmico, para un tiempo de calentamiento de 30 min. — Proteína nativa. --- Proteína soluble.

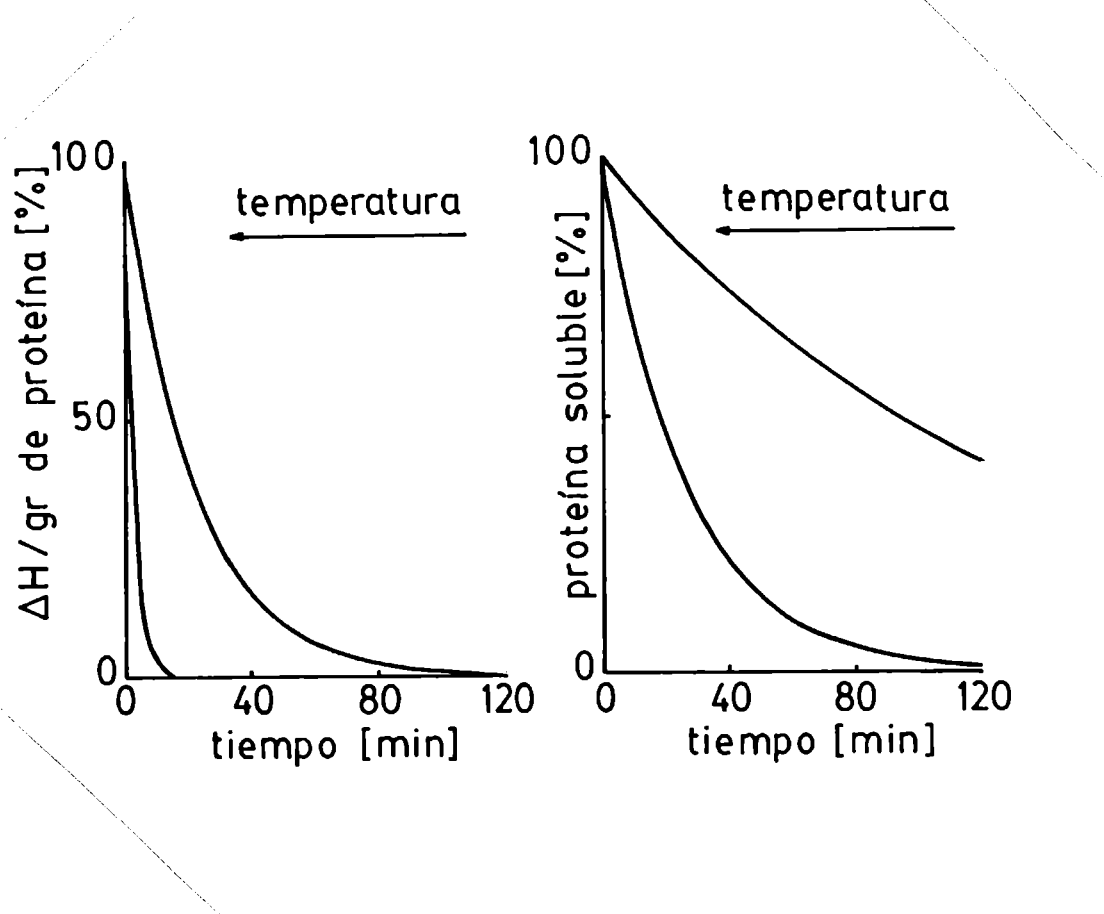
desnaturalización de proteínas llega al 50%, mientras que se insolubiliza sólo el 12%. A 74°C, la desnaturalización de proteínas detectada por DSC alcanza el 97%, y la insolubilización el 38%. Esto se puede interpretar, considerando que la desnaturalización de las proteínas es un paso previo para la pérdida de solubilidad, y se necesitaría una cierta cantidad de proteína desnaturalizada para que se produzca la insolubilización. En bibliografía se encontraron estudios realizados en sistemas de alimentos que apoyarían los resultados anteriores, ya que se observó que, aunque puede haber aparentemente alguna agregación al comienzo de la desnaturalización proteica, el desarrollo de estructuras reológicamente significativas en una mezcla de proteínas no comienza hasta que la mayor parte de la proteína, o quizás alguna especie proteica específica, se haya desnaturalizado (Beveridge y col. 1985).

Si se grafican ahora las curvas de desnaturalización de proteínas para distintos tiempos de secado (Figura 31a), se puede ver que a medida que el tiempo de secado de la semilla aumenta, el incremento de este tiempo tiene una influencia cada vez menor, es decir, incrementar el tiempo de secado de 30 min a 60 min tiene un efecto más marcado en la desnaturalización de proteínas, que incrementar el tiempo de secado de 60 min a 90 min. Lo mismo ocurre para la insolubilización. (Figura 31b). La influencia del tiempo de secado se puede ver mejor en la Figura 32, en la que se grafican los valores de A en función del tiempo de secado para una temperatura dada, observando el efecto discutido anteriormente. Se ve claramente, además, que al aumentar la temperatura la semilla se deteriora muy rápidamente, sobre todo cuando se mide desnaturalización de proteínas. En el caso de la pérdida de solubili





**Figura 31.** Porcentajes de proteína nativa y de proteína soluble de embrión de trigo en función de la temperatura del tratamiento térmico. Las curvas corresponden a distintos tiempos de calentamiento: 30 min., 60 min., 90 min., 120 min., 150 min.



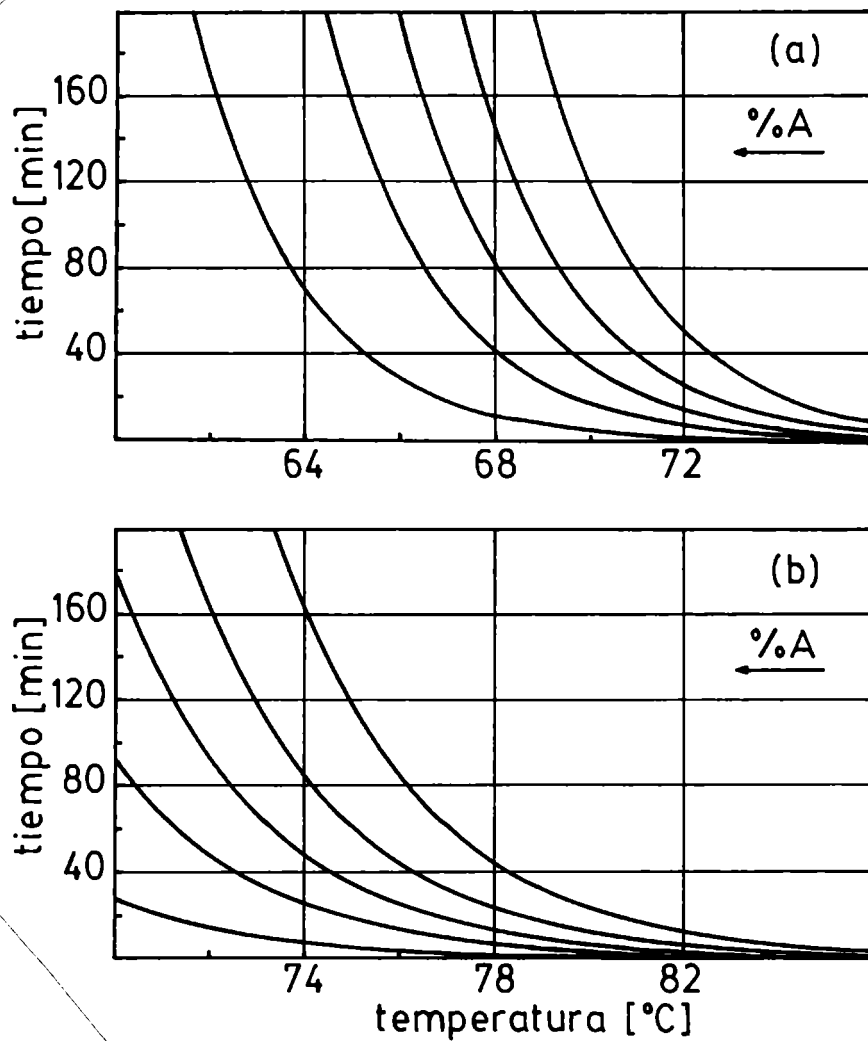
**Figura 32.** Porcentajes de proteína nativa y de proteína soluble de embrión de trigo en función del tiempo de calentamiento. Las curvas corresponden a distintas temperaturas de tratamiento térmico: 72°C y 77°C.

dad, se observa que no se alcanza el valor cero de solubilidad para los rangos de temperatura y de tiempo considerados, mientras que en la desnaturalización de proteínas, las curvas caen mucho más rápidamente, y la proteína llega a desnaturalizarse por completo en ese rango de tiempo, a las temperaturas utilizadas.

Por último, se graficó el tiempo de secado en función de la temperatura, para determinados valores de A, tanto para la desnaturalización de proteínas como para la pérdida de solubilidad (Figura 33 a y b). Cada una de estas curvas da distintas combinaciones de tiempo y temperatura, con las cuales se obtendría el mismo deterioro, medido a través de desnaturalización proteica o de pérdida de solubilidad.

Con el objeto de ver si existía alguna relación entre la desnaturalización y la insolubilización de las proteínas del embrión, y la pérdida de viabilidad, se graficaron los porcentajes de germinación obtenidos, en función de los porcentajes de proteína soluble y de proteína nativa en embrión.

En la Figura 34 se muestran los gráficos obtenidos, observándose en los dos casos una correlación lineal, con un coeficiente de correlación de 0,971 para la desnaturalización de proteínas, y de 0,966 para la pérdida de solubilidad. Los coeficientes de correlación son muy similares, sin embargo, si no se considera el punto correspondiente al control (100%), el coeficiente de correlación para la desnaturalización de proteínas da 0,995, considerablemente mayor que para insolubilización. Este resultado es lógico, si se tiene en cuenta que para que una proteína pierda su actividad biológica no es necesario que haya perdido su solubilidad, sino que se haya desnaturalizado la parte activa de la molécula.



**Figura 33.** Curvas de tiempo de calentamiento vs temperatura, para porcentajes fijos de proteína nativa y de proteína soluble de embrión (% A). **a)** Proteína nativa. **b)** Proteína soluble. Las curvas corresponden a distintos porcentajes de A: 10%, 30%, 50%, 70%, 90%.

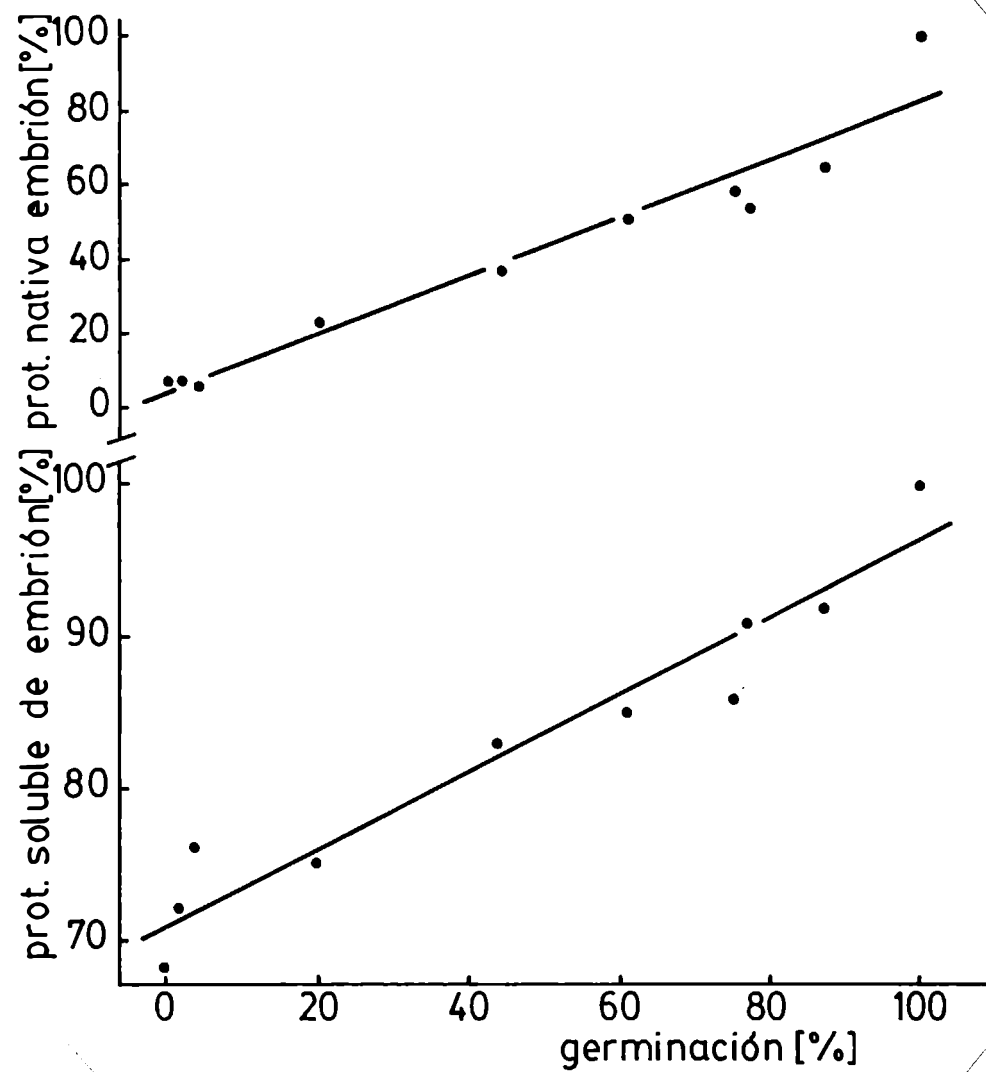
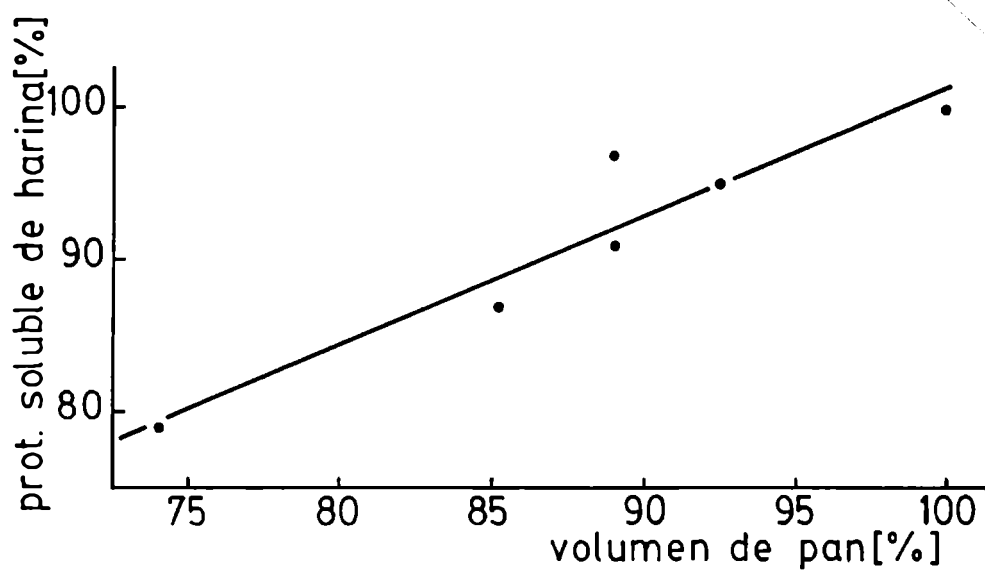


Figura 34. Correlación entre la pérdida de viabilidad de las semillas y la desnaturalización e insolubilización de las proteínas de embrión de trigo. Los puntos corresponden a semillas secadas en distintas condiciones.

En la Figura 35 se muestra la correlación que se obtuvo entre la proteína soluble de harina y el volumen de pan obtenido con esta harina. El coeficiente de correlación fue de 0,948, y se puede ver que, excepto uno de los puntos, todos los demás caen aproximadamente dentro de la recta.

Los resultados anteriores indican que existe una correlación muy buena entre las alteraciones observadas en las proteínas como consecuencia del secado de la semilla, y la pérdida de viabilidad y de calidad industrial. Esto no implica, sin embargo, que la desnaturalización de proteínas sea el factor determinante primario de la pérdida de viabilidad o de capacidad panadera, aunque juega un papel fundamental en el deterioro de la semilla, unida a las alteraciones sufridas por otros componentes. De todas maneras, esta correlación permitiría estimar el grado de deterioro alcanzado por la semilla, a través del análisis de sus proteínas.

De la misma manera que para el embrión, hay que tener en cuenta al considerar la correlación entre la proteína soluble de harina y el volumen de pan, que puede haber proteína desnaturalizada que altere el volumen de pan, pero que permanezca soluble en el medio de extracción.



**Figura 35.** Correlación entre la pérdida de calidad panadera y la insolubilización de las proteínas de harina de trigo. Los puntos corresponden a semillas secadas en distintas condiciones.

## CONCLUSIONES





- Los resultados obtenidos en este trabajo indican que una de las principales causas de la pérdida de viabilidad y calidad industrial observada en las semillas sometidas a un tratamiento térmico, es la desnaturalización de proteínas.
- La desnaturalización térmica de las proteínas de embrión pudo estudiarse por medio de ensayos calorimétricos, en los que se observó un pico endotérmico a 83°C para una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La desnaturalización de las proteínas del endosperma, por el contrario, no se pudo estudiar por este método por no dar picos definidos, lo que se atribuyó a las diferentes uniones que estabilizan la estructura en ambos tipos de proteínas.
- Las proteínas del endosperma presentan una mayor cantidad de puentes disulfuro intercatenarios que las proteínas de embrión.
- Tanto en las proteínas de embrión como en las de endosperma se produce una pérdida de solubilidad debido al tratamiento térmico, que se correlaciona con las condiciones de secado de las semillas.
- Los resultados obtenidos indican que la pérdida de solúbilidad de las proteínas del endosperma se debe a la formación de uniones covalentes.
- Las alteraciones producidas en las proteínas debido al calentamiento de la semilla, tienen lugar principalmente en las especies proteicas de alto peso molecular, tanto en embrión como en endosperma. En el caso del endosperma, estas proteínas están en la fracción de gluteninas.

- Los ensayos realizados indican que el embrión se afecta más rápidamente con el tratamiento térmico que el endosperma de la semilla.
- Las semillas calentadas presentan diferencias en el metabolismo con respecto a las no calentadas, en relación a la velocidad de consumo de oxígeno y a la sensibilidad al NaF.
- Los estudios cinéticos de pérdida de solubilidad y desnaturalización de proteínas realizados en embrión, permitieron obtener curvas que muestran claramente la influencia del tiempo y de la temperatura en el proceso de secado.
- Las pruebas de deterioro que se realizaron tanto en semilla entera como en embrión y endosperma, indican que la temperatura es un factor mucho más crítico para la calidad de la semilla que el tiempo de secado.

## APENDICE



DESARROLLO DE UN ENSAYO PARA  
DETECTAR DETERIORO POR SECADO



## 1. INTRODUCCION

El deterioro que pueden sufrir las semillas de trigo durante el proceso de secado, ocasiona pérdidas importantes al disminuir la viabilidad y la calidad industrial. Los ensayos más significativos para detectar este deterioro son las pruebas de panificación y de germinación. Sin embargo, estos ensayos tienen la desventaja de requerir tiempos largos.

El objetivo de este ensayo fue la obtención de un método que permita detectar el daño ocasionado por el secado más rápidamente, sin necesidad de recurrir a equipos o procedimientos complicados.

## 2. FUNDAMENTO DEL METODO

El método propuesto se basa en el hecho que la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  después de la imbibición es menor en las semillas dañadas por calor (págs. 130 y 133), por lo que habría una correlación entre la acidez producida en el medio de incubación en un tiempo determinado, y el grado de deterioro de las semillas.

Así, lo que se hace es medir la acidez alcanzada por el medio de incubación, debida al  $\text{CO}_2$  producido durante la respiración. Esta acidez se determina por medio de un indicador de pH que vira en el rango del ensayo, a través de medidas colorimétricas.

## 3. MATERIALES Y METODOS

### 3.1 Reactivos

**3.1.1 Medio de Incubación:** el medio de incubación utilizado para la mayoría de estos ensayos fue una solución de antibióticos, aunque en algunos casos se incubó con agua destilada



obteniendo resultados equivalentes. Esto indicaría que el uso de antibióticos no es necesario.

Composición del medio con antibióticos:

	Para 200 ml de medio 5X	Concentración final 1X
Penicilina G-Na 1580 Umg	30 mg	30 $\mu$ g/ml
Estreptomina $\text{SO}_4^-$	150 mg	150 $\mu$ g/ml
Agua Destilada	c.s.p. 200 ml	

Este medio 1X (o agua destilada) se llevó a pH 10 con NaOH 1N (aproximadamente 6 gotas de NaOH 1N para 50 ml de medio), midiendo el pH con papel indicador universal Merck. Posteriormente se agregaron 2 gotas de solución de fenolftaleína (fenolftaleína 1% en etanol de 96° al 60%) por cada 50 ml de medio, y se agitó suavemente con una varilla hasta homogeneizar el color. Este medio debe prepararse inmediatamente antes de usar, o guardarse en un recipiente herméticamente cerrado.

**3.1.2 Medios empleados para tratamientos previos a la incubación:** se hicieron ensayos tratando previamente las semillas con acetona y con SDS 1%.

El tratamiento realizado se describirá oportunamente.

### **3.2 Semillas empleadas**

**3.2.1 Semillas secadas en distintas condiciones:** se utilizaron las semillas cultivar Marcos Juárez-INTA, cosecha 1982/83, tratadas como se describió en la pág. 19. Como control se utilizaron semillas sin procesar.

**3.2.2 Semillas de otros cultivares y cosechas calentadas y no calentadas:** Se utilizaron semillas Marcos Juárez-INTA cosecha 1983/84, Leones-INTA cosecha 1983/84, Trigo 708 cosecha

1982/83, Saira-INTA cosecha 1983/84, Buck patacón cosecha 1983/84 y Buck napostá cosecha 1983/84.

Las semillas calentadas fueron todas humectadas y se ca da s en las mismas condiciones, siguiendo un procedimiento equivalente al descrito en la pág. 19 para el lote de se m i l l a s I I b,

**3.2.3 Semillas no viables:** en algunos ensayos se utilizaron como blanco semillas cultivar Marcos Juarez-INTA cosecha 1982/83, que habían sido calentadas durante 2 hs a 130°C.

### **3.3 Procedimiento**

Para las pruebas se utilizaron recipientes de plástico de 10 ml y 2,3 cm de diámetro, con tapa a rosca. En cada uno se pusieron entre 29 y 31 semillas, de aproximadamente el mismo peso total, utilizando como control semillas Marcos Juare z no calentadas, y como blanco semillas no viables o medio de incubación.

A cada recipiente se agregaron 4 ml de medio de incuba ci o n, logrando con la ayuda de una varilla que todas las se m i l l a s quedaran cubiertas de líquido. Se cerraron inmediatamente los recipientes y se pusieron en un baño a 30°C. A pa r t i r de las 3 hs se observó si el medio correspondiente a las semillas control se había decolorado, agitando suavemente en forma circular. Al producirse la decoloración del control se sacaron las muestras del baño, y se pasó el medio sin se m i l l a s a otros tantos recipientes. Posteriormente se leyó la ab so r b a n c i a en un espectrofotómetro, a 550 nm. En la Figura 36 se puede ver el espectro de absorción de la fenolftaleína.

El tiempo de incubación osciló en general entre 3 hs 15min. y 4hs. Este rango de tiempo se atribuyó a pequeñas difere n ci as

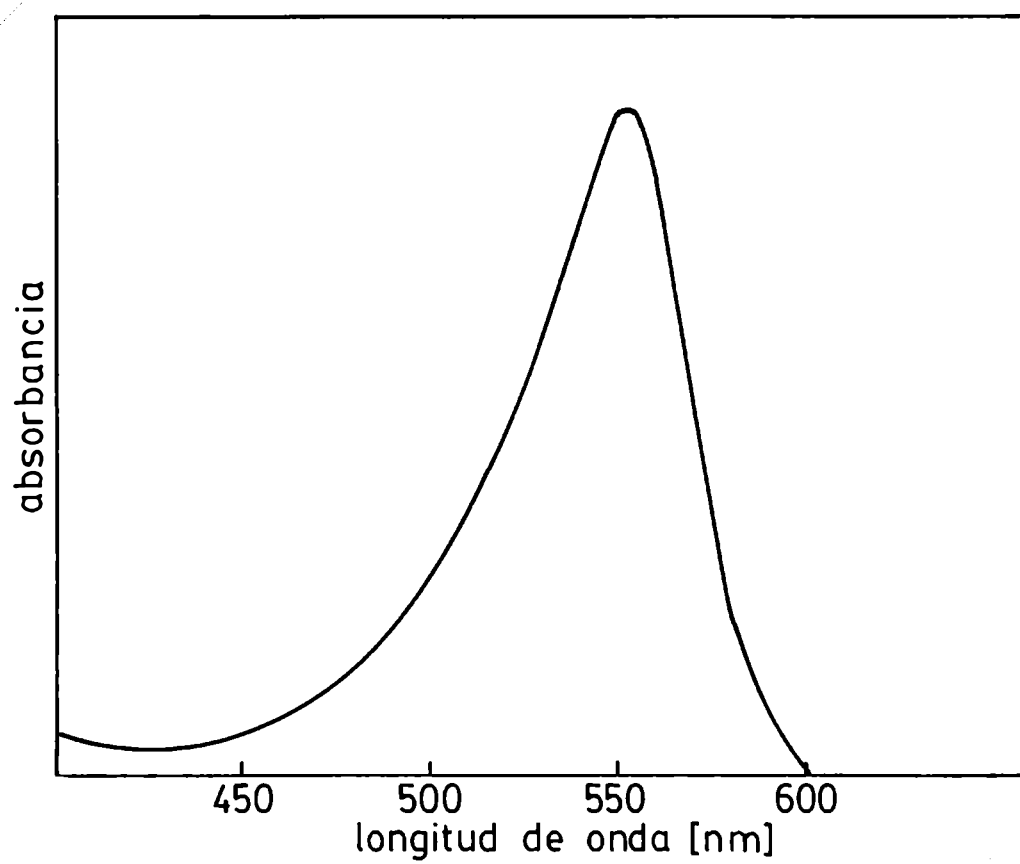


Figura 36. Espectro de absorción de la fenolftaleína.

rencias en el pH inicial y en la concentración de fenolftaleína del medio de incubación, que se preparaba inmediatamente antes de cada experiencia. Se podría lograr un tiempo de incubación fijo y reproducible preparando un volumen mayor de medio de incubación y midiendo con más exactitud cada reactivo, pudiendo guardarlo en recipientes herméticos para un uso posterior. En este caso no se necesitarían semillas control, y disminuiría la dispersión en los resultados, como se discutirá más adelante.

La lectura en el espectrofotómetro podría reemplazarse por la comparación con una escala de color.

### **3.4 Ensayos de germinación**

Se hicieron ensayos de germinación con las semillas de distintas variedades calentadas y no calentadas, siguiendo el procedimiento descrito en la pág. 39.

## **4. Resultados**

### **4.1 Ensayos realizados en semillas de la misma variedad secadas en distintas condiciones**

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos con las semillas secadas en las condiciones de la Tabla I.

**4.1.1 Diferencias debidas a las condiciones de secado:** en esta sección se presentarán los resultados obtenidos a partir de 5 experiencias, y también se discutirán los valores que se obtienen considerando sólo dos de ellas, que tuvieron el mismo tiempo de incubación (3 hs 15 min), ya que una de las principales causas de dispersión en los resultados se atribuyó a pequeñas diferencias en el pH inicial del medio de incubación, que traía como consecuencia que los tiempos de incubación variaran de un ensayo a otro.

En la Figura 37 se muestra una foto en la que se observan las diferencias de color del medio de incubación debidas a los distintos tratamientos térmicos sufridos por las semillas. Se puede ver que la intensidad de color es cada vez mayor a medida que las condiciones de secado son más drásticas.

En la Tabla XX están los valores de densidad óptica obtenidos en los 5 ensayos realizados, y los porcentajes de decoloración promedio con sus desviaciones standard, calculados a partir de las 5 determinaciones, y a partir de dos de ellas que tuvieron el mismo tiempo de incubación. Estos cálculos se hicieron tomando como blanco el medio de incubación, y considerando 100 % el valor correspondiente al control.

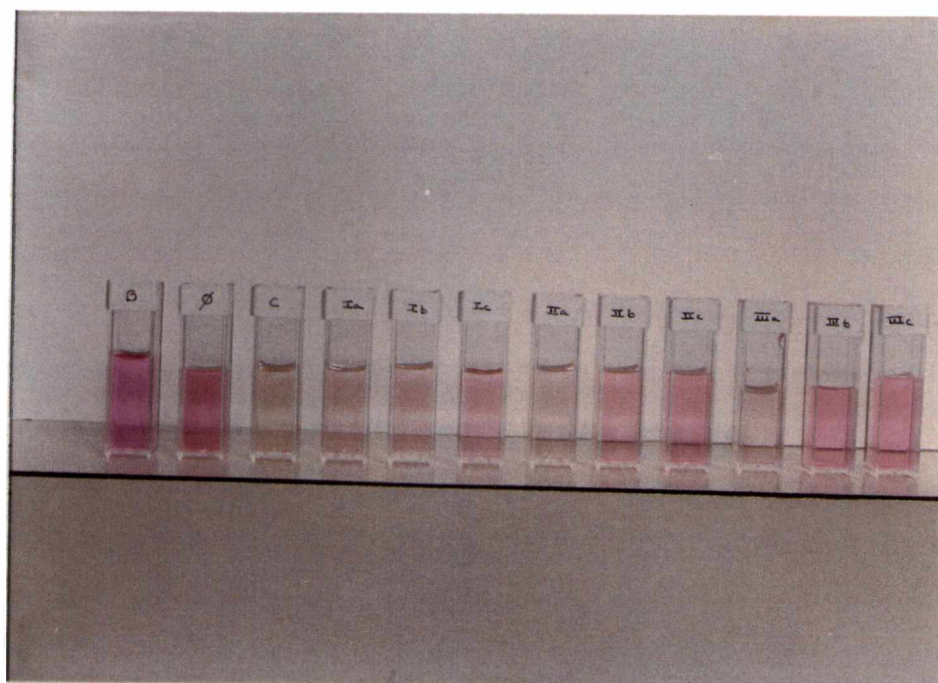
Tabla XX. Resultados de los ensayos de decoloración, realizados con semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)</sup>.

Condiciones de secado	Densidad óptica					Porcentaje de decoloración promedio <sup>(2)</sup>	
	ensayo 1	ensayo 2	ensayo 3	ensayo 4	ensayo 5	de los 5 ensayos	de los ensayos 2 y 5
Blanco	0,981	0,879	0,695	0,851	0,760	---	---
Sem. no viables	0,588	0,834	0,385	0,885	0,758	---	---
Control	0,040	0,068	0,037	0,120	0,051	100	100
I <sub>a</sub>	0,067	0,163	0,024	0,272	0,151	90,4 ± 9,1	87,0 ± 11,4
I <sub>b</sub>	0,117	0,196	0,058	0,433	0,187	82,2 ± 15,4	82,5 ± 2,1
I <sub>c</sub>	0,163	0,322	0,023	0,352	0,250	79,6 ± 14,7	70,5 ± 2,1
II <sub>a</sub>	0,076	0,098	0,030	0,240	0,125	93,4 ± 6,5	93,0 ± 4,2
II <sub>b</sub>	0,296	0,387	0,230	0,598	0,372	59,0 ± 15,3	58,0 ± 4,2
II <sub>c</sub>	0,466	0,493	0,225	0,846	0,683	37,2 ± 29,9	29,5 ± 26,2
III <sub>a</sub>	0,057	0,273	0,036	0,419	0,279	80,0 ± 18,3	71,5 ± 4,9
III <sub>b</sub>	0,396	0,545	0,326	0,767	0,527	40,6 ± 20,2	37,0 ± 5,7
III <sub>c</sub>	0,427	0,623	0,410	0,825	0,650	30,8 ± 21,7	24,0 ± 11,3

- (1) Las condiciones de secado fueron las especificadas en la Tabla I.
- (2) Los porcentajes se calcularon tomando como blanco el medio de incubación de cada ensayo, y considerando como 100% el valor correspondiente al control. Posteriormente se sacó el promedio de los porcentajes.

Con estos resultados se hizo un análisis de varianza, tomando como fuentes de variación la temperatura del aire de secado y la humedad inicial de las semilla. El análisis dio como resultado que existen diferencias significativas detectables por este ensayo, a un nivel de significación del 1%, entre los lotes de semillas sometidos a distintos tratamientos térmicos. No se observó en este caso una interacción a este nivel de significación entre los dos factores considerados (temperatura y humedad inicial). Este análisis se hizo también considerando los dos ensayos mencionados anteriormente, obteniendo resultados equivalentes (Tabla XXI a y b).

Con el objeto de observar si se detectan diferencias por este método entre dos lotes de semilla secados en distintas condiciones, se hizo un análisis LSD (mínima diferencia significativa), comparando las medias de las poblaciones. En la Tabla XXI c se muestran las diferencias entre las medias considerando los 5 ensayos o considerando sólo 2. Los valores de LSD obtenidos fueron de 33,0 y de 39,2 respectivamente, para un nivel de significación del 1%.



**Figura 37.** Ensayo de decoloración realizado con semillas secadas en distintas condiciones. La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I.

Tabla XXI. Diferencias en los porcentajes de decoloración en tre las medias de poblaciones de semillas secadas en distintas condiciones<sup>(1)(2)</sup>

a) Tomando como fuente de variación la temperatura del aire de secado (a = 110°C, b = 125°C, c = 140°C):

- Considerando los cinco ensayos:

$$|\bar{x}_a - \bar{x}_b| = \underline{27,3} \quad |\bar{x}_b - \bar{x}_c| = 11,4$$

- Considerando el segundo y el quinto ensayo:

$$|\bar{x}_a - \bar{x}_b| = \underline{24,7} \quad |\bar{x}_b - \bar{x}_c| = 17,8$$

b) Tomando como fuente de variación el contenido de humedad inicial de las semillas (I = 17%, II = 21%, III = 25%):

- Considerando los cinco ensayos:

$$|\bar{x}_I - \bar{x}_{II}| = \underline{20,9} \quad |\bar{x}_{II} - \bar{x}_{III}| = 12,7$$

- Considerando el segundo y el quinto ensayo:

$$|\bar{x}_I - \bar{x}_{II}| = 19,8 \quad |\bar{x}_{II} - \bar{x}_{III}| = 16,0$$

c) Tomando cada condición de secado individualmente<sup>(3)</sup>:

- Considerando los cinco ensayos:

I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>	Condiciones de secado
-	8,2	10,8	3,0	31,4	53,2	10,4	49,8	59,6	I <sub>a</sub>
	-	2,6	11,2	23,2	45,0	2,2	41,6	51,4	I <sub>b</sub>
		-	13,8	20,6	42,4	0,4	39,0	48,8	I <sub>c</sub>
			-	<u>34,4</u>	56,2	13,4	52,8	62,6	II <sub>a</sub>
				-	21,8	21,0	18,4	28,2	II <sub>b</sub>
					-	<u>42,8</u>	3,4	6,4	II <sub>c</sub>
						-	<u>39,4</u>	49,2	III <sub>a</sub>
							-	9,8	III <sub>b</sub>
								-	III <sub>c</sub>



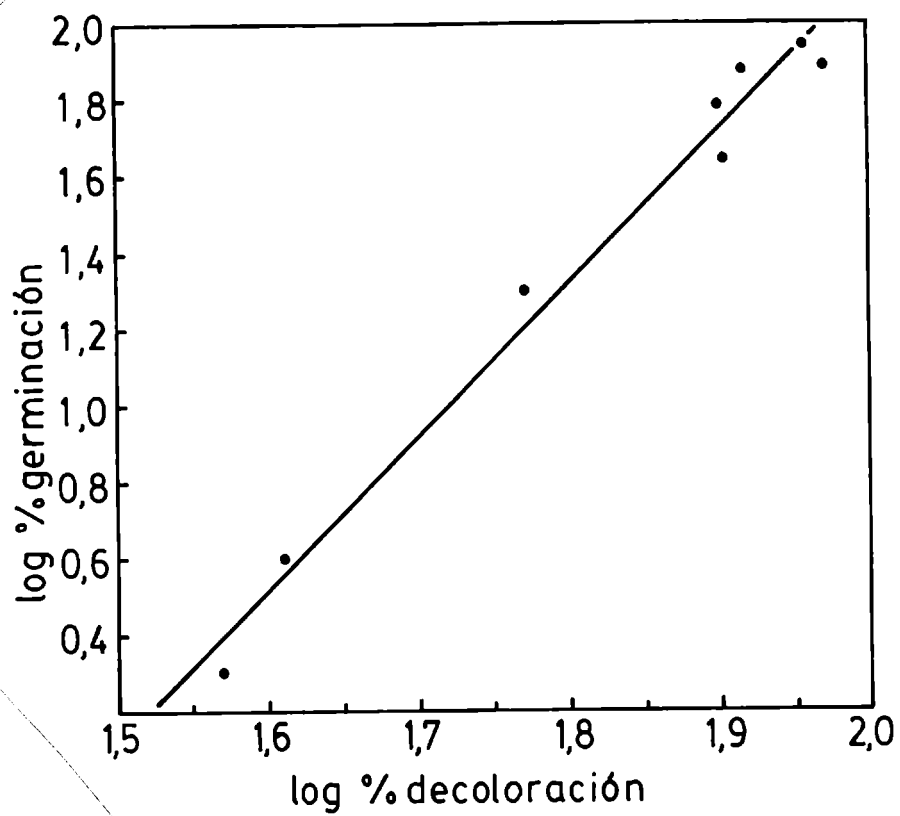
- Considerando el segundo y el quinto ensayo:

I <sub>a</sub>	I <sub>b</sub>	I <sub>c</sub>	II <sub>a</sub>	II <sub>b</sub>	II <sub>c</sub>	III <sub>a</sub>	III <sub>b</sub>	III <sub>c</sub>	Condiciones de secado
-	4,5	16,5	6,0	29,0	57,5	15,5	50,0	63,0	I <sub>a</sub>
	-	12,0	10,5	24,5	53,0	11,0	45,5	58,5	I <sub>b</sub>
		-	22,5	12,5	41,0	1,0	33,5	46,5	I <sub>c</sub>
			-	35,0	63,5	21,5	56,0	69,0	II <sub>a</sub>
				-	28,5	13,5	21,0	34,0	II <sub>b</sub>
					-	42,0	7,5	5,5	II <sub>c</sub>
						-	34,5	47,5	III <sub>a</sub>
							-	13,0	III <sub>b</sub>
								-	III <sub>c</sub>

- (1) La nomenclatura utilizada es la de la Tabla I.
- (2) Los valores recuadrados son diferentes al nivel de significación del 1%.
- (3) Los valores de estas Tablas son las diferencias entre las medias de las semillas secadas en las condiciones de las columnas, con respecto a las secadas en las condiciones de las filas.

**4.1.2 Correlación con los ensayos de germinación:** Una de las pruebas más significativas para determinar si las semillas han sufrido deterioro durante el proceso de secado, es el ensayo de germinación. Esto hizo que se buscara una correlación entre el porcentaje de germinación de las semillas y los resultados obtenidos con este ensayo, que tiene la ventaja de ser mucho más rápido.

En la Figura 38 se muestra la recta obtenida al grafi



**Figura 38.** Correlación entre el porcentaje de germinación de las semillas y el porcentaje de decoloración de un medio con fenoltaleína. Los puntos corresponden a semillas secadas en distintas condiciones.

car log % germinación vs log % decoloración. Cada punto de la figura es el promedio de las cinco determinaciones consideradas anteriormente. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,99. Si se grafican los promedios de la segunda y la quinta determinación, el coeficiente de correlación es también de 0,99 pero la ecuación de la recta obtenida es ligeramente diferente:  $\log \% \text{ germ.} = 3,4647 \log \% \text{ dec.} - 4,7883$  (21) para este último caso y  $\log \% \text{ germ} = 4,001 \log \% \text{ dec.} - 5,8832$  (22) para el primero.

Como se puede ver, la correlación es muy buena, y permitiría estimar a partir de este ensayo para una determinada variedad de semillas, el porcentaje de germinación de las mismas.

#### **4.2 Ensayos realizados con semillas de distintas variedades calentadas y no calentadas**

Con el objeto de analizar si las semillas de otras variedades y cosechas se comportaban de manera equivalente en relación a este ensayo, se secaron semillas de distintos cultivares, cosechadas en campañas diferentes, y se hicieron ensayos de germinación con las semillas secadas y con semillas control sin secar, determinándose también para cada lote el porcentaje de decoloración, de la manera descrita anteriormente.

En la Tabla XXII se muestran los porcentajes de germinación de cada lote de semillas, a los tres y a los seis días de la siembra. Se puede observar que, a pesar de que todas las semillas calentadas fueron sometidas al mismo tratamiento de humectación y secado, algunas sufrieron mayor deterioro que otras con respecto a su viabilidad.

Tabla XXII. Porcentajes de germinación de semillas de distintos cultivares y cosechas, calentadas y no calentadas.

Cultivar	Cosecha	Semillas no calentadas		Semillas calentadas	
		% germ. a los 3 días	% germ. a los 6 días	% germ. a los 3 días	% germ. a los 6 días
Marcos Juarez-INTA	1983/84	97	97	53	53
Leones-INTA	1983/84	96	97	33	39
Trigal 708	1982/83	94	95	26	44
Buck patacón	1983/84	96	97	3	11
Buck napostá	1983/84	97	97	0	0
Saira-INTA	1983/84	91	95	14	21

En la Tabla XXIII se pueden ver los porcentajes de decoloración obtenidos para cada lote.

Tabla XXIII. Porcentajes de decoloración de semillas de distintos cultivares y cosechas, calentadas y no calentadas<sup>(1)(2)</sup>

Cultivar	Cosecha	% Decoloración	
		Sem. no calentadas	Sem. calentadas
Marcos Juarez-INTA	1983/84	(100)	74 ± 7
Leones-INTA	1983/84	96 ± 3	71 ± 13
Trigal 708	1982/83	98 ± 3	66 ± 4
Buck patacón	1983/84	41 ± 10	22 ± 10
Buck napostá	1983/84	77 ± 3	31 ± 2
Saira-INTA	1983/84	81 ± 5	58 ± 9

(1) Los valores de esta Tabla son los promedios de datos provenientes de tres determinaciones.

(2) Los cálculos se hicieron tomando como 100% el valor correspondiente a las semillas Marcos Juárez-INTA cosecha 1983/84 sin calentar, y utilizando como blanco semillas no viables.

Con estos valores se estimaron los porcentajes de semillas germinadas, a través de las ecuaciones (21) y (22). En la Tabla XXIV se muestran los resultados obtenidos.

Tabla XXIV. Porcentaje de semillas germinadas, estimado a través de las ecuaciones (21) y (22), utilizando los resultados del ensayo de decoloración.

Cultivar	Cosecha	% de germinación calculado			
		Sem. no calentadas		Sem. calentadas	
		(a)	(b)	(a)	(b)
Marcos Juárez-INTA	1983/84	-	-	49	39
Leones-INTA	1983/84	120	112	42	33
Trigal 708	1982/83	129	121	33	25
Buck patacón	1983/84	6	4	1	0
Buck napostá	1983/84	56	46	2	1
Saira-INTA	1983/84	67	57	21	15

(a) Valores obtenidos con la ecuación (21).

(b) Valores obtenidos con la ecuación (22).

Si se comparan los valores calculados con los reales (Tabla XXII) se observa que, para las semillas calentadas, los porcentajes de germinación estimados con los resultados de los ensayos de decoloración son comparables con los porcentajes de germinación reales, para todas las variedades en

sayadas. Sin embargo, los porcentajes de germinación estimados a partir de los porcentajes de decoloración de las semillas no calentadas, fueron incluso mayores que los reales para las semillas Leones y Trigal 708, mientras que para las semillas Saira-INTA, Buck patacón y Buck napostá los porcentajes de germinación estimados fueron mucho menores que los reales.

Con el objeto de ver si se trataba de un problema de diferente permeabilidad, se trataron estas semillas con SDS 1% durante 3 min, con agitación, enjuagándolas luego tres veces con agua destilada, antes de hacer el ensayo de decoloración. Este tratamiento se hizo también con acetona. A continuación se practicó con estas semillas el ensayo de decoloración, utilizando como control semillas Marcos Juárez tratadas de igual forma, y como blanco semillas no viables. Los resultados se muestran en la Tabla XXV.

Tabla XXV. Ensayo de decoloración en semillas tratadas con SDS o acetona<sup>(1)</sup>

Tratamiento	Cultivar	Cosecha	% de decoloración	% germ. calculado	
				(a)	(b)
SDS	Marcos Juárez-INTA		(100)	-	-
	Saira-INTA	1983/84	96	120	112
	Buck patacón		50	13	8
	Buck napostá		81	67	57
Acetona	Marcos Juárez-INTA		(100)	-	-
	Saira-INTA	1983/84	100	138	131
	Buck patacón		52	14	10
	Buck napostá		79	61	51

(a) Valores obtenidos con la ecuación (21).

(b) Valores obtenidos con la ecuación (22).

(1) Los ensayos se hicieron con semillas no calentadas.

Se puede ver que las semillas Saira INTA tratadas con acetona o con SDS se comportaron como las Marcos Juarez, lo que indicaría que su respuesta anormal en el ensayo de decoloración pudo deberse a una menor permeabilidad al agua, que se superaría con un tratamiento previo con acetona o SDS. En el caso de las semillas Buck patacón y Buck napostá, no se logró una respuesta equivalente a la de las otras semillas a pesar del tratamiento previo con SDS o acetona. Posiblemente la menor velocidad de liberación de  $\text{CO}_2$  al medio que presentan estas semillas se deba a diferencias en el metabolismo o a la necesidad de un tratamiento más prolongado.

Los resultados obtenidos permitirían decir que las semillas que dan porcentajes de decoloración mayores a un valor límite fijado, no habrían sufrido deterioro durante el secado. Con respecto a las semillas que dan porcentajes de decoloración inferiores a este límite, habría que hacer ensayos adicionales para decidir si están dañadas o no.

## BIBLIOGRAFIA





- A.A.C.C. 1983a. Crude protein. Kjeldahl method, boric acid modification. En "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol. II 46-12.
- A.A.C.C. 1983b. Gluten-Hand washing method. En "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists" Vol. I 38-10.
- A.A.C.C. 1983c. Sedimentation test for wheat. En "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol. II 56-61A.
- Adams, C.A. y L. Novellie 1975. Acid hydrolases and autolytic properties of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seeds of Sorghum bicolor(Linn.) Moench. Plant. Physiol. 55:7.
- Adams, C.A., L. Novellie y N.V.d.W. Liebenberg 1976. Biochemical properties and ultrastructure of protein bodies isolated from selected cereals. Cereal Chem. 53:1.
- A.O.A.C. 1980a. Total solids (Moisture, indirect method). Air oven method (3) - Official final action. En "Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists". Pág. 211.
- A.O.A.C. 1980b. Alpha-amylase. A.A.C.C. Falling Number (FN) Determination Method (26) Official First Action. En "Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists". Pág. 218.
- Appell, K.C., T.W., Keenan y P.S. Low 1982. Differential scanning calorimetry of milk fat globule membranes. Biochim. Biophys. Acta 690:243.
- Arntfield, S.D. y E.D. Murray 1981. The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 14:289.

- Arntfield, S.D., E.D. Murray y M.A.H. Ismond 1985. The influence of processing parameters on food protein functionality. III. Effect of moisture content on the thermal stability of fababean protein. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18:226.
- A.S.T.M. E 698 1979. Standard test method for: Arrhenius kinetic constants for thermally unstable materials.
- Baardseth, P. 1977. Meat products and vegetables. En "Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing". Pág. 280. Editores: T. Høyem y O. Kvåle. Applied Science Publishers Limited. London.
- Barnes, P.J. 1982. Composition of cereal germ preparations. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174:467.
- Beckwith, A.C. y J.S. Wall 1966. Reduction and reoxidation of wheat glutenin. *Biochim. Biophys. Acta.* 130:155.
- Beveridge, T., S.D. Arntfield y E.D. Murray 1985. Protein structure development in relation to denaturation temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18:189.
- Bietz, J.A. y J.S. Wall 1972. Wheat gliadin subunits: Molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 49:416.
- Bishop, D.G., J.R. Kenrick, J.H. Bayston, A.S. Macpherson, S. R. Johns y R.I. Willing 1979. The influence of fatty acid unsaturation on fluidity and molecular packing of chloroplast membrane lipids. En "Low temperature stress in crop plants. The role of the membrane". Pág. 375. Editores: J.M. Lyons, D. Graham y J.K. Raison. Academic Press, Inc. New York.
- Bloksma, A.H. 1978. Rheology and chemistry of dough. En "Wheat Chemistry and Technology". Pág. 523. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota.

- Booth, M.R. y J.A.D. Ewart 1969. Studies on four components of wheat gliadins. *Biochim. Biophys. Acta.* 181:226.
- Booth, M.R., R.C. Bottomley, J.R.S. Ellis, G. Malloch, J.D. Schofield y M.F. Timms 1980. The effect of heat on gluten-physico-chemical properties and baking quality. *Ann. Technol. Agric.* 29:399.
- Bottomley, R.C., H.F. Kearns y J.D. Schofield 1982. Characterisation of wheat flour and gluten proteins using buffers containing sodium dodecyl sulphate. *J. Sci. Food Agric.* 33:481.
- Bourdet, A. y P. Feillet 1967. Distribution of phosphorus compounds in the proteins fractions of various types of wheat flours. *Cereal Chem.* 44:457.
- Bray, C.M. 1979. Nucleic acid and protein synthesis in the embryo of germinating cereals. En "Recent advances in the biochemistry of cereals". Pág. 147. Editores: D.L. Laidman y R.G. Wyn Jones. Academic Press Inc. London Ltd.
- Burt, D.J. y P.L. Russell 1983. Gelatinization of low water content wheat starch-water mixtures. A combined study by differential scanning calorimetry and light microscopy. *Starch/Stärke.* 35:354.
- Doll, H. 1977. Storage proteins in cereals. En "Genetic diversity in plants". Pág. 337. Editores: A. Muhammed, R. Aksel y R.C. von Borstel. Plenum Press. New York.
- Donovan, J.W., C.J. Mapes, J. Gorton Davis y J.A. Garibaldi 1975. A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J. Sci. Food Agric.* 26:73.
- Duswalt, A.A. 1974. The practice of obtaining kinetic data by Differential Scanning Calorimetry. *Thermochim. Acta* 8:57.

- Eliasson, A.C. y P.O. Hegg 1980. Thermal stability of wheat gluten. *Cereal Chem.* 57:436.
- Ewart, J.A.D. 1966. Fingerprinting of glutenin and gliadin. *J. Sci. Food Agric.* 17:30.
- Ewart, J.A.D. 1973. Sodium dodecyl sulfate electrophoresis of wheat gliadins. *J. Sci. Food Agric.* 24:685.
- Ghiasi, K., R.C. Hoseney y E. Varriano-Marston 1983. Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. *Cereal Chem.* 60:58.
- Giner, S.A. y A. Calvelo 1986. Modeling of wheat drying in fluidized beds. *J. Food Sci.* Enviado para su publicación.
- Glasstone, S. 1979. Cinética química. En "Tratado de química física". Pág. 938. Traducido de la 2da. edición norteamericana (1949) por J.S. Gomez. Aguilar (España).
- Guilfoyle, T.J. 1981. DNA and RNA polymerases. En "The biochemistry of plants. A comprehensive treatise". Vol. 6. "Proteins and nucleic acids". Pág. 207. Editor: A. Marcus. Academic Press Inc. London Ltd.
- Hoerz, W. y K.S. McCarty 1969. Evidence for a proposed initiation complex for protein synthesis in reticulocyte polyribosome profiles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 63:1206.
- Hook, S.C.W. 1980. Dye-binding capacity as a sensitive index for the thermal denaturation of wheat protein. A test for heat-damaged wheat. *J. Sci. Food Agric.* 31:67.
- I.C.C. 1982. Standard N° 137. Standard Methods of the International Association for Cereal Chemistry. Verlag Moritz Schäfer Detmold.
- Jendrisak, J. y W.M. Becker 1973. Isolation, purification and characterization of RNA polymerases from wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta.* 319:48.

- Jones, R.W., G.E. Babcock, N.W. Taylor y F.R. Senti 1961. Molecular weights of wheat gluten fractions. Arch. Biochem. Biophys. 94:483.
- Jones, I.K. y P.R. Carnegie 1971. Binding of oxidised glutathione to dough proteins and a new explanation, involving thiol-disulphide exchange, of the physical properties of dough. J. Sci. Food Agric. 22:358.
- Jones, I.K., J.W. Phillips y F.J.R. Hird 1974. The estimation of rheologically important thiol and disulphide groups in dough. J. Sci. Food Agric. 25:1.
- Kasarda, D.D., J.E. Bernardin y W. Gaffield 1968. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of  $\alpha$ -gliadin. Biochemistry 7:3950.
- Kasarda, D.D., J.E. Bernardin y Ch.C. Nimmo 1976. Wheat proteins. En "Advances in cereal science and technology" Vol. I. Pág. 158. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists. St. Paul. Minnesota.
- Kasarda, D.D., Ch.C. Nimmo y G.O. Kohler 1978. Proteins and the amino acid composition of wheat fractions. En "Wheat. Chemistry and Technology". Pág. 227. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul. Minnesota.
- Krull, L.H., J.S. Wall, H. Zobel y R.J. Dimler 1965. Synthetic polypeptides containing side-chain amide groups; water insoluble polymers. Biochemistry 4:626.
- Labouriau, L.G. 1983. Metabolismo. En "A germinação das sementes". Pág. 119. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227:680.

- Laemmli, U.K. y M. Favre 1973. Maturation of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. J. Mol. Biol. 80:575.
- Laidler, K.J. y P.S. Bunting 1973. The denaturation of proteins. En " The chemical kinetics of enzyme action". Pág. 413. Clarendon Press. Oxford.
- Lendzian, K.J. y M.H. Unsworth 1983. Ecophysiological effects of atmospheric pollutants. En "Encyclopedia of plant physiology". New Series. Vol. 12D. "Physiological plant ecology IV. Ecosystem processes: mineral cycling, productivity and man's influence". Pág. 465. Editores: O.L.Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond y H. Ziegler. Springer - Verlag. Berlin.Heidelberg. New York.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.L. Randall 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.
- Lowy, G.D.A., J.G. Sargeant y J.D. Schofield 1981. Wheat starch granule protein: the isolation and characterisation of a salt-extractable protein from starch granules. J. Sci. Food Agric. 32:371.
- MacMasters, M.M., J.J.C. Hinton y D. Bradbury 1978. Microscopic structure and composition of the wheat kernel. En "Wheat.Chemistry and Technology". Pág. 52. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota.
- Mahler, H.R. y E.H. Cordes 1966. Enzyme kinetics. En "Biological chemistry". 2da. Edición. Pág. 267. Editores: H.R. Mahler y E.H. Cordes. Harper y Row Publishers. E.E.U.U.
- McMurchie, E.J. 1979. Temperature sensitivity of ion-stimulated ATPases associated with some plant membranes. En "Low temperature stress in crop plants. The role of the membrane" Pág.163. Editores: J.M. Lyons, D. Graham y J. K. Raison. Academic Press, Inc. New York.

- Marcus, A. y J. Feeley 1966. Ribosome activation and polysome formation in vitro: requirement for ATP. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56:1770.
- Marcus, A., J. Feeley y T. Volcani 1966. Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetics of amino acid incorporation, ribosome activation, and polysome formation. Plant Physiol. 41:1167.
- Mašková, H., J. Fiala y B. Cempírek 1982. Heat damage of grain in the drying process. Proc. 7th World Cereal and Bread Congress, Prague, 1982.
- Mazzoni, M.R.C. y J.L. Robutti 1983. Evaluación del método de sedimentación "dodecil sulfato de sodio" para determinar calidad panadera en mejoramiento de trigo. Informe Técnico N° 185. Estación Experimental Regional Agropecuaria. Pergamino. INTA.
- Mecham, D.K., E.G. Cole y H.A. Sokol 1963. Modification of flour proteins by dough mixing: effects of sulfhydryl-blocking and oxidizing agents. Cereal Chem. 40:1.
- Meredith, O.B. y J.J. Wren 1969. Stability of the molecular weight distribution in wheat flour proteins during dough mixing. J. Sci. Food Agric. 20:235.
- Mory, Y.Y., D. Chen y S. Sarid 1975. De novo biosynthesis of deoxyribonucleic acid polymerase during wheat embryo germination. Plant Physiol. 55:437.
- Multon, J.L. 1970. Sur quelques aspects thermodynamiques de la dénaturation thermique des protéines en milieu solide peu hydraté. C.R. Acad. Sc. Paris 271:601.



- Multon, J.L. 1982. Les mécanismes d'altération des grains et graines dans l' éco-système post-récolte, les pertes qui en résultant et les stratégies de défense des stocks. En: "Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés". Vol. I. Pág. 1. Editor: J.L. Multon. Technique et Documentation (Lavoisier). Paris Cedex.
- Nielsen, H.C., B.E. Babcock y F.R. Senti 1962. Molecular weight studies on glutenin before and after disulfide-bond splitting. Arch. Biochem. Biophys. 96:252.
- Obendorf, R.L. y A. Marcus 1974. Rapid increase in adenosine 5'triphosphate during early wheat embryo germination. Plant Physiol. 53:779.
- Ory, R.L. y K.W. Henningsen 1969. Enzymes associated with protein bodies isolated from ungerminated barley seeds. Plant Physiol. 44:1488.
- Ozawa, T. 1970. Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. J. Therm. Anal. 2:301.
- Pence, J.W. y H.S. Olcott 1952. Effect of reducing agents on gluten proteins. Cereal Chem. 29:292.
- Pravisani, C.I., A.N. Califano y A. Calvelo 1985. Kinetics of starch gelatinization in potato. J. Food Sci. 50:656.
- Pringle, M.J. y D. Chapman 1981. Biomembrane structure and effects of temperature. En "Effects of low temperatures on biological membranes". Pág. 21. Editores: G.J. Morris y A. Clarke. Academic Press Inc. London Ltd.
- Ress, T. Ap 1980. Assessment of the contributions of metabolic pathways to plant respiration. En "The biochemistry of plants. A comprehensive treatise". Vol. 2."Metabolism and respiration". Pág. 1. Editor: D.D. Davies. Editores en Jefe: P.K. Stumpf y E.E. Conn. Academic Press, Inc. New York.

- Schofield, J.D. y M.R. Booth 1983. Wheat proteins and their technological significance. En "Developments in food proteins". Vol. II. Pág. 1. Editor: B.J.F. Hudson. Applied Science Publishers. London.
- Schofield, J.D., R.C. Bottomley, M.F. Timms y M.R. Booth 1983. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions. J. Cereal Sci. 1:241.
- Schreiber, H., W. Mühlbauer, L. Wassermann y H. Kuppinger 1981. Influence of drying on wheat quality—Study of the reaction kinetics. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 173:169.
- Sexson, K.R. y Y.V. Wu 1972. Molecular weights of wheat  $\gamma_1$ - and  $\gamma_3$ -gliadins in various solvents. Biochim. Biophys. Acta 263:651.
- Shellenberger, J.A. 1978. Production and utilization of wheat. En "Wheat. Chemistry and Technology". Pág. 1. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota.
- Shurpalekar, S.R. y P. Haridas Rao 1977. Wheat germ. En "Advances in food research". Vol. 23 . Pág. 188. Editores: C.O. Chichester, E.M. Mrak y G.F. Stewart. Academic Press. E.E.U.U.
- Simmonds, D.H. 1978. Structure, composition and biochemistry of cereal grains. En "Cereals'78: Better nutrition for the world's millions". Pág. 105. Editor: Y. Pomeranz. USA, American Association of Cereal Chemists. Canada. Canadian International Grains Institute, International Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota.

- Simmonds, D.H. y T.P. O'Brien 1981. Morphological and biochemical development of the wheat endosperm. En "Advances in Cereal Science and Technology". Vol. IV. Pág. 5. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota.
- Spiegel, S. y A. Marcus 1975. Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. Nature 256:228.
- Steponkus, P.L. 1981. Responses to extremes temperatures. Cellular and sub-cellular bases. En "Encyclopedia of plant physiology". New Series Vol. 12A. "Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment". Pág. 371. Editores: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond y H. Ziegler. Springer - Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.
- Tanaka, K. y W. Bushuk 1973. Changes in flour proteins during dough-mixing. III. Analytical results and mechanisms. Cereal Chem. 50:605.
- Tatham, A.S., B.J. Mifflin y P.R. Shewry 1985. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationship to gluten elasticity. Cereal Chem. 62:405.
- Tomos, A.D. y D.L. Laidman 1979. The control of mobilization and metabolism in the aleurone tissue during germination. En "Recent advances in the biochemistry of cereals". Pág. 119. Editores: D.L. Laidman y R.G. Wyn Jones Academic Press Inc. London Ltd.
- Umbreit, W.W., R.H. Burris y J.F. Stauffer 1959. The Warburg constant volume respirometer. En "Manometric techniques". Pág. 1. Editores: W.W. Umbreit, R.H. Burris y J.F. Stauffer. Burgess Publishing Co. Minneapolis U.S.A.

- Verjee, Z.H.M. 1969. Isolation of three acid phosphatases from wheat germ. *European J. Biochem.* 9:439.
- Wall, J.S. 1979. The role of wheat proteins in determining baking quality. En "Recent advances in the biochemistry of cereals". Pág. 275. Editores: D.L. Laidman y R.G. Wyn Jones. Academic Press Inc. London Ltd.
- Wall, J.S. y F.R. Huebner 1981. Adhesion and cohesion. En "Protein functionality in foods". Pág. 111. ACS Symposium Series N° 147. Editor: P. Cherry.
- Wasserman, L. 1978. Effect of drying on the baking quality of wheat. *Agrartechnische Berichte.* 4:91. Symposium 23-2-1978 on "Trocknung von Getreide und Mais"
- Weeks, D.P. 1981. Protein biosynthesis: Mechanisms and regulation. En "The biochemistry of plants. A comprehensive treatise". Vol. 6. "Proteins and nucleic acids". Pág. 491. Editor: A. Marcus. Academic Press Inc. London Ltd.
- Woychik, J.H., J.A. Boundy y R.J. Dimler 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.* 94:477.
- Wu, Y.V. y J.E. Cluskey 1965. Optical rotatory dispersion studies on wheat gluten proteins: gluten, glutenin, and gliadin in urea and hydrochloric acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 112:32.
- Wu, Y.V., J.E. Cluskey y K.R. Sexson 1967. Effect of ionic strength on the molecular weight and conformation of wheat gluten proteins in 3M urea solutions. *Biochim. Biophys. Acta.* 133:83.

- Wu, Y.V. y R.J. Dimler 1964. Conformational studies of wheat gluten, glutenin, and gliadin in urea solutions at various pH's. Arch. Biochem. Biophys. 107:435.
- Yakovensko, V.A., T.A. Kozachenko y L.Yu. Isarova 1979. Effect of drying patterns on wheat proteins. Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Pishchevaya Tekhnologiya. 1:48.
- Zeleny, L. 1947. A simple sedimentation test for estimating the bread-baking and gluten qualities of wheat flour. Cereal Chem. 24:465.

"...Y volvió hacia el zorro:

- Adiós - dijo.

- Adiós - dijo el zorro -. He aquí mi secreto. Es muy simple: lo esencial es invisible a los ojos."

El principito, Antoine de Saint-Exupéry

