

## MECANISMOS DE ESTRUCTURACIÓN DE LA RED DE GLUTEN

Alfredo Calvelo

Académico Titular de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

### Resumen

Se analizan los distintos modelos moleculares y estructurales propuestos para las gluteninas, principales responsables de la estructuración de la red de gluten, en términos de la reología específica de las masas panaderas: elasticidad, extensibilidad, aumento de la resistencia con el amasado, disminución de la resistencia en el sobreamasado y cambios durante el descanso de la masa. Los mecanismos son a su vez compatibilizados con el comportamiento de los polímeros de glutenina de alto peso molecular (macropolímero de glutenina) durante el amasado y descanso.

Se acepta así la existencia en la harina de largas cadenas lineales conformadas por subunidades de alto peso molecular unidas por uniones S-S, con ramificaciones conteniendo subunidades de bajo peso molecular. Dichos polímeros se encuentran en configuraciones enredadas estabilizadas por interacciones no covalentes. Durante el amasado, los polímeros se van alineando en la dirección del esfuerzo, desplazándose unos sobre otros a la vez que se desenredan con cambio en la distribución de pesos moleculares. Alcanzado el desarrollo de la masa, los polímeros han llegado al máximo de extensión y ya no es posible disipar la tensión por desenredado, por lo que durante el sobreamasado se producen rupturas de uniones S-S en los polímeros más largos (despolimerización) generando masas poco resistentes. La repolimerización durante el descanso de la masa resulta entonces condicionada por el punto alcanzado durante el amasado.

*Palabras clave:* Gluten, Amasado, Reología, Subunidades de gluteninas de alto peso molecular, Macropolímero de glutenina.

### Abstract

**Structuration mechanisms of gluten.** The different molecular and structural models proposed for glutenins are analysed in terms of the *rheological* parameters of breadmaking doughs: elasticity, extensibility, increasing resistance to extension during mixing, decreasing resistance to extension on overmixing and changes during dough resting. Moreover, the mechanisms are compatibilized with properties and changes of the glutenin macropolymer during mixing and resting.

It is accepted that flours contain long linear polymers constituted by high molecular weight glutenin subunits linked head to tail through disulphide bonds and branched with low molecular weight glutenin subunits. Those polymers are entangled and stabilized through non covalent interactions. During mixing, glutenin polymers are aligned along the direction of extension and slip one over the other while they become disentagled with changes in the molecular weight distribution. Once the dough is developed, polymers attain the maximum extension and the strain cannot be relieved by disentagled, consequently, disulphide bonds breaking and depolymerization of the longer polymers must be expected. Repolymerization during dough resting would be dependent on the degree of mixing attained.

*Key words:* Gluten, Mixing, Rheology, High molecular weight glutenin subunits, Glutenin macropolymer.

### Introducción

La panificación requiere formar una masa esencialmente con harina, agua, sal y levadura. Dicha masa debe ser suficientemente

extensible como para facilitar su amasado, formado y levado y a la vez debe tener una cierta tenacidad a efectos de mantener la forma de las piezas y retener gas durante la fermentación. Por

tanto, entre los atributos importantes para una masa panadera cabe mencionar tenacidad y extensibilidad

Ambas propiedades están muy ligadas a las proteínas del trigo y en primera instancia un parámetro crítico a controlar es el contenido de proteínas de la harina.

Sin embargo, el contenido de proteínas no es suficiente para asegurar un buen comportamiento en la panificación sino que tan o más importante es la calidad de dichas proteínas para formar la red de gluten.

El método para separar gluten fue desarrollado por Jacopo Bartholomew Beccari de la Universidad de Bologna en 1745 y no ha cambiado mucho. Es un ensayo empírico consistente en formar masa y lavarla bajo agua hasta arrastrar el almidón y los compuestos solubles dejando solo un insoluble (gluten) constituido por las proteínas con capacidad para formar masa (cerca del 80% de las existentes en la harina). Sin embargo, si bien la determinación de gluten indica si la proteína contenida en la harina es capaz de formar masa (si es funcional), no permite evaluar la calidad de esa masa en términos de tenacidad y extensibilidad.

Surgen aquí dos vías para caracterizar la calidad de las proteínas de una harina:

1. Estudiar la estructura intrínseca de esas proteínas y su capacidad para formar una red de gluten tridimensional (enfoque químico-estructural).

2. Evaluar la calidad de la harina a través de ensayos funcionales formando masa y determinando sus características reológicas (enfoque macroscópico-funcional)

El común denominador en situaciones como la descripta es que la tecnología debe avanzar aún sin contar con todo el conocimiento básico, por lo que desde hace muchos años la industria panadera optó por el enfoque macroscópico-funcional y así se desarrollaron métodos para evaluar el comportamiento reológico de esas masas a través de parámetros empíricos.

Entre los más utilizados cabe mencionar el Farinógrafo de Brabender, el Extensógrafo de Brabender y el Alvéografo de Chopín.

En el primero de ellos, se efectúa un amasado estándar a velocidad constante y se registra la potencia aplicada en las paletas amasadoras midiendo así la resistencia impuesta por la masa durante el amasado. Esta resistencia presenta un máximo por lo que surgen diversos parámetros capaces de caracterizar reológicamente una harina: Tiempo de desarrollo (tiempo hasta el máximo), Estabilidad (tiempo que tar-

da en caer un valor definido respecto al máximo) Aflojamiento (caída de potencia respecto al máximo después de 15 minutos de amasado)

En el Extensógrafo, se registra la fuerza necesaria para extender una lámina de masa de dimensiones pre-establecidas a una cierta velocidad. Se utilizan dos parámetros: la Resistencia máxima a la extensión (Tenacidad) y la longitud extendida hasta que se rompe (Extensibilidad)

Finalmente, en el Alvéografo se infla una burbuja de masa a caudal constante, a la vez que se mide el volumen y la presión hasta que estalla. Surgen como parámetros característicos la máxima presión P (tenacidad), la dimensión cuando estalla L (extensibilidad), el trabajo de extensión W y la relación P/L.

Estos ensayos han sido adoptados mundialmente, por lo que actualmente, son referenciales para caracterizar y especificar internacionalmente harinas y trigos junto con el contenido de proteínas, el contenido de gluten y otros.

### Enfoque químico estructural

Sin embargo, para el desarrollo genético de nuevas variedades de trigo, la optimización de procesos de elaboración o la evaluación de calidades de trigos y harinas, se hace necesaria una interpretación de las propiedades reológicas de las masas en términos estructurales y moleculares.

Obviamente, todo modelo químico-estructural debe, como mínimo, explicar los fenómenos característicos del enfoque macroscópico-funcional:

- o Elasticidad: tendencia a retornar a la forma inicial una vez eliminado el esfuerzo

- o Extensibilidad: Posibilidad de extender una masa mediante aplicación de un esfuerzo.

- o Aumento de la resistencia con la extensión: a medida que la extensión aumenta, mayor es la fuerza necesaria para llevarla a cabo. Esta propiedad asegura la estabilidad de las paredes de las burbujas durante su crecimiento.

- o Disminución de la resistencia con el sobreamasado: por encima de cierta extensión (o de aplicación de trabajo) la resistencia empieza a disminuir generando una masa blanda, brillante y poco tenaz.

- o Relajación de la masa con el descanso: Si se elimina la aplicación de esfuerzos se advierte un retroceso a una condición de menor amasado.

Además, el modelo propuesto debe mantener coherencia entre composición y comportamiento de harinas “fuertes” y “débiles” donde cada uno de los fenómenos descriptos se manifiestan en mayor o menor medida.

Puede considerarse que el enfoque químico-estructural comienza en 1907 cuando Tomas Burr Osborne publica un método para el fraccionamiento de proteínas de la harina utilizando distintos solventes y obteniendo las siguientes fracciones:

- o Albúminas: solubles en agua
- o Globulinas: solubles en soluciones salinas diluidas
- o Gliadinas: solubles en etanol al 70%
- o Gluteninas: solubles en ácido acético diluido en dodecil sulfato de sodio-SDS
- o Residuo insoluble: almidón y otros compuestos

El gluten, que corresponde a las proteínas insolubles en agua y sal, involucra aproximadamente el 80% de las proteínas totales de la harina y estaría entonces compuesto por gliadinas y gluteninas, constituidas a su vez por largas cadenas de aminoácidos unidos por uniones peptídicas (180 aminoácidos por cadena).

En lo que hace a la viscoelasticidad que caracteriza a las masas, se cree, que las gliadinas contribuyen a la **viscosidad** mientras que las gluteninas aportan **tenacidad**.

Las gliadinas tienen Pesos Moleculares entre 30 y 70 kDa y son monoméricas

Por su parte, las gluteninas pueden formar polímeros (uniéndose entre si a través de uniones S-S) y alcanzar pesos moleculares del orden de 100 a 1000 kDa o aún mayores. Los eslabones de estos polímeros (cadenas de aminoácidos) son denominados subunidades de glutenina (GS) y pueden ser: (Fig. 1) [30]:

- o Subunidades de Alto Peso Molecular (HMW-GS) 70-90 kDa: tienen una zona central repetitiva de aminoácidos que le confiere una configuración en espiral y grupos SH en ambos extremos, lo que les da la posibilidad de unirse con otras subunidades y formar largas cadenas lineales, cadenas laterales y eventualmente redes.
- o Subunidades de Bajo Peso Molecular (LMW-GS) 40-70 kDa: salvo excepciones, tienen grupos S-S en un solo extremo por lo que son terminadoras de cadena. Tienden a formar clusters o cadenas laterales.

En la Fig. 2 se esquematiza una molécula de glutenina [26], donde puede verse la cadena principal con subunidades de alto peso molecular unidas por puentes S-S cabeza-cola y las cadenas laterales de bajo peso molecular. Esas gluteninas alcanzan distintos pesos moleculares acorde a la proporción de extendedores de cadena (HMW-GS) y terminadores de cadena (LMW-GS). Efectivamente, los polímeros largos tienen alta relación HMW-GS/LMW-GS mientras que los polímeros cortos tienen baja relación HMW-GS/LMW-GS.

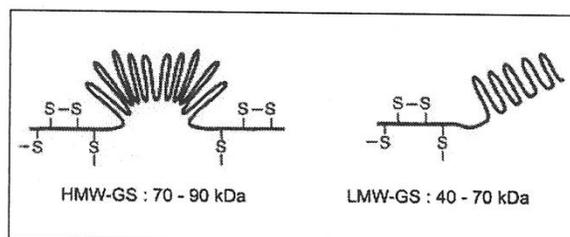


Fig. 1. Subunidades de glutenina de alto y bajo peso molecular [30]

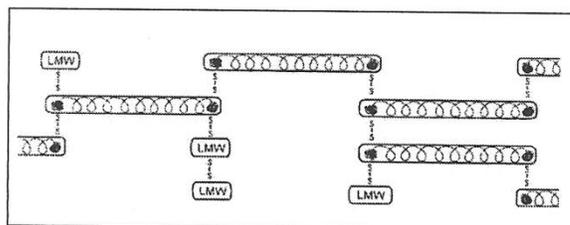


Fig. 2. Modelo estructural de glutenina con uniones S-S entre subunidades [26]

### Desarrollo de la viscoelasticidad durante el amasado

En la harina, los polímeros proteicos de alto peso molecular (gluteninas) tienen una configuración plegada, con las cadenas enredadas y estabilizadas por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Al hidratarse, las proteínas se despliegan y se hinchan debilitando las fuerzas que las mantenían estabilizadas.

Ante los esfuerzos de corte y especialmente los extensionales [11] [17] [23] generados por el amasado, las gluteninas se estiran, se alinean en la dirección del esfuerzo (Fig. 3) y se desplazan unas sobre otras.

Este último fenómeno involucra un mecanismo de ruptura de uniones entre polímeros y reconstitución de esas uniones en configuraciones más extendidas, generando las características reológicas atribuidas al gluten (elasticidad, extensibilidad, etc.)

Se han sugerido distintas fuerzas interaccionantes entre los polímeros de glutenina:

- o Uniones covalentes: Puentes S-S
- o Uniones no covalentes: Puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas
- o Enredamiento polimérico

Sobre la base de estas fuerzas se han propuesto a lo largo del tiempo y con éxito dispar diversos modelos de estructuración de la red de gluten.

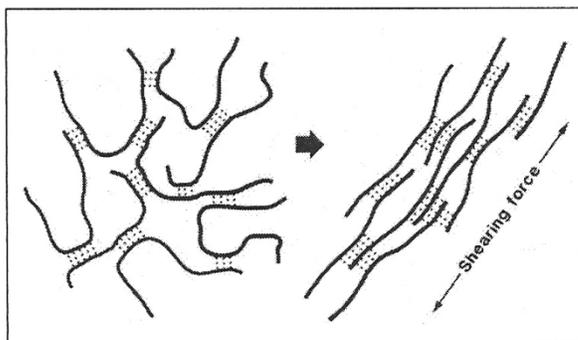


Fig. 3. Alineamiento de las gluteninas en la dirección del esfuerzo [27]

### Modelo de Meredith

Es uno de los primeros modelos propuestos para la red de gluten [22].

Imagina una red continua de moléculas de glutenina con uniones cruzadas covalentes de tipo S-S. Explica fácilmente la elasticidad en base a las uniones cruzadas que generan una red molecular tridimensional. Al respecto, supone que en cada cadena habría 4 residuos sulfhidrilos disponibles para unirse con residuos similares de 3 o 4 cadenas vecinas, originando una red convencional altamente entrecruzada con características elásticas.

Sin embargo, el modelo tiene dificultades en explicar la extensibilidad que experimenta una masa. A efectos de explicar el flujo viscoso se introdujo el concepto de intercambio entre uniones sulfhidrilo/disulfuro que involucra la ruptura y reformación de puentes S-S en configuraciones más extendidas. Originariamente se postuló que se producía mediante la intervención de grupos sulfhidrilos de moléculas con bajo peso molecular que cortaban la unión S-S permitiendo un desplazamiento de ambas cadenas hasta formar un nuevo puente S-S con la liberación de la molécula de bajo peso molecular que podía volver a interactuar. La resultante era una extensión y un mejor alineamiento de ambos polímeros. También se ha sugerido que en el mecanismo de ruptura y reformación de puentes disulfuro intervienen radicales libres [30].

### Modelo de Ewart

Posteriormente, Ewart [10] [14] presentó evidencias que rechazaban la hipótesis de la molécula "gigante" de Meredith y propuso una estructura en base a la interacción no covalente entre largos polímeros lineales de glutenina.

Para explicar la formación de cadenas lineales, a diferencia de la hipótesis aceptada hasta ese momento de que habría al menos 4 residuos

-SH libres en cada subunidad polipeptídica capaz de unirse a 3 o 4 vecinos y formar una red entrecruzada, Ewart y col. propusieron que dos de los residuos se unirían con una cadena, mientras que los otros dos se combinarían con otra.

Con este mecanismo de unión, se generaba un sistema donde había largas moléculas lineales, cada una consistente en cadenas polipeptídicas unidas unas a otras por uniones disulfuro que denominaron concatenaciones.

En la Fig. 4 [14] se muestra esquemáticamente un fragmento de concatenación, donde habría 5 cadenas polipeptídicas (subunidades) unidas unas a otras a través de 2 uniones S-S (puntos separados). Los puntos enteros representan uniones S-S intracadena.

Una evidencia para estas suposiciones son las estructuras fibrosas que presentan las moléculas de glutenina a la microscopía electrónica de barrido (SEM).

Paralelamente, Ewart fue el primero en introducir el concepto de enredamiento entre polímeros, proponiendo que las concatenaciones estarían enredadas unas con otras. Las regiones donde se enredan, que denominaron nudos, formarían las uniones cruzadas que le darían al glúten la elasticidad tipo goma a bajas extensiones.

Admitieron que los nudos tenían distinta estabilidad acorde a su estructura, los tipos de cadenas polipeptídicas vinculadas y la orientación relativa de las cadenas.

Cuando la extensión aumenta, los nudos comienzan a desenredarse por efecto del esfuerzo. Los más débiles lo hacen primero, aunque los más fuertes pueden permanecer si la concentración del esfuerzo no es suficiente.

De esta manera el sistema propuesto explicaba más racionalmente el flujo viscoso ya que la estructura tridimensional no estaba basada en uniones covalentes.

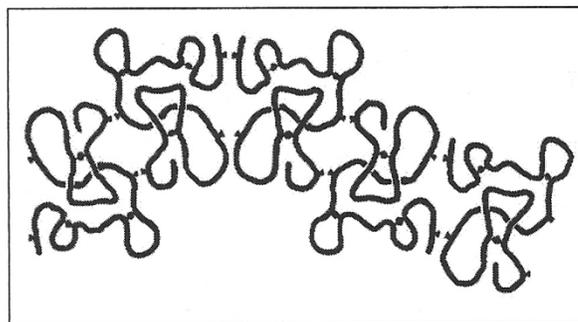


Fig. 4. Fragmento de una concatenación - Puntos separados: uniones intercadena [14]

Explicaba asimismo el efecto dramático de los tioles que rompen uniones disulfuro sobre la base de rupturas en las concatenaciones.

La presencia de un trabajo máximo óptimo durante el amasado también era explicable en base al modelo lineal. Efectivamente, durante la extensión, al orientarse las concatenaciones en la dirección del esfuerzo, el alineamiento, aumentaría las fuerzas secundarias (no covalentes) generando una mayor resistencia a medida que aumenta el tiempo de amasado.

Una extensión de las concatenaciones más allá del óptimo de desarrollo (sobreamasado) tendría los nudos restantes apretados sin posibilidad de desenredado por lo que la tensión local haría que se rompan algunas uniones covalentes. En base a consideraciones energéticas, postularon que se romperían los puentes S-S entre cadenas bajando el grado de polimerización y generando dos radicales libres S\* que luego se transformarían en SH por abstracción de hidrógeno del agua. Estos grupos sulfhidrilos liberarían a su vez concatenaciones adyacentes estresadas, por intercambio disulfuro por lo que la masa terminaría perdiendo resistencia por caída del grado de polimerización. Explicaban así que el sobreamasado derive en una masa débil y pegajosa que, habiendo reducido drásticamente su grado de polimerización y perdido muchos de sus entrecruzamientos secundarios tiende a incrementar su componente viscosa.

Explicaron también el efecto de los oxidantes que, al reducir la concentración de tioles, disminuyen la posibilidad de que una unión estresada sea dañada y proveen estabilidad a la masa.

#### **Modelo de Graveland y col.**

Posteriormente, Graveland y col. [13], en base al análisis de las fracciones obtenidas por solubilización en solución de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) propusieron un modelo lineal con ramificaciones.

La parte lineal consistía en una "columna vertebral" constituida por subunidades de glutenina de alto peso molecular (HMW-GS) con residuos SH ubicados cerca de los extremos, distinguieron dos tipos:

- o Las que tenían solo 2 grupos cisteína capaces de formar cadenas uniéndose cabeza con cola (A1, A3 y A5)

- o Las A10, que tenían 6 residuos cisteína también capaces de formar cadenas lineales con 2 de ellos, pero que además podían formar hasta cuatro cadenas laterales con los 4 restantes.

La columna vertebral se formaba con unidades A de alto peso molecular con la

subunidad A10 ocupando la posición central y con la estructura 1 - 10 - 5 o 3 - 10 - 5.

Propusieron también, subunidades de bajo peso molecular (LMW-GS) con uniones S-S intramoleculares y aquí distinguieron entre las C, capaces de formar cadenas y las B, que son terminadoras de cadena. Las LMW-GS presentaban posibilidades de formar clusters entre sí, que denominaron glutenina III y además capacidad para unirse a la columna vertebral de las HMW-GS A10 formando la glutenina lineal ramificada que denominaron glutenina II, con pesos moleculares del orden de 800 kDa.

Finalmente, propusieron que las gluteninas II podían agregarse a través de uniones S-S para formar oligómeros de muy alto peso molecular (hasta 20.000 kDa) que denominaron glutenina I (Fig. 5). Sugirieron que esta sería la forma en que se encontrarían las gluteninas en el grano de harina.

La estructura molecular de la glutenina II, con una columna vertebral lineal de subunidades A con alto peso molecular, coincide parcialmente con el modelo de concatenaciones lineales propuesto por Ewart aunque en el modelo de Graveland se admite la presencia de cadenas laterales.

Graveland y col. [13] detectaron que durante el amasado, la glutenina I se despolimeriza parcialmente formando glutenina II de menor peso molecular y que durante las etapas de descanso se estaría reformando nuevamente la glutenina I.

#### **Modelo de enredamiento**

Por su parte, MacRitchie and Lafianra [19] [20] [21] reafirmaron el concepto de enredamiento propuesto por Ewart, pero aplicado a cadenas lineales ramificadas acorde a Graveland. Sugirieron que los polímeros de glutenina presentaban en el gluten zonas de enredamiento. De esta manera existirían pequeñas zonas de los polímeros en que interaccionarían unos con otros (zonas enredadas) separadas por largas regiones donde no habría interacción. Una vez que hay dos o más puntos de enredamiento por molécula se forma una red. En tales circunstancias, para que una molécula fluya requiere tirar de las vecinas con las que está enredada. Estas, a su vez, están conectadas a otras y así sucesivamente.

A diferencia de una red con uniones cruzadas covalentes, ante la aplicación de un esfuerzo, en la red de enredamiento se produce un deslizamiento de los polímeros en los nudos hacia una configuración más extendida.

La etapa de desarrollo en el amasado, involucra en este modelo, el estiramiento de los polímeros hacia una configuración más extendi-

da y alineada en la dirección del esfuerzo. Consecuentemente, la duración de esa etapa de desarrollo depende del tiempo necesario para alcanzar esa estructura a partir de la configuración inicial.

Respecto a la elasticidad, Tatham [25] [27] [31] propuso que la parte central espiralada de las subunidades de glutenina de alto peso molecular (Fig. 1), se estira ante la aplicación esfuerzos extensionales y presenta una tendencia a retornar a su estado natural de menor energía libre al retirarse el esfuerzo (Fig. 6).

De esa manera existirían dos fases de extensión. Durante la primera fase, se estirarían las cadenas espiraladas de las subunidades de glutenina y una extensión posterior causaría el deslizamiento de los puntos de enredamiento [18]. Las diferencias de extensibilidad entre masas se deberían a diferencias en la capacidad de extensión de las subunidades y a diferencias al deslizamiento en los puntos de enredamiento.

El aumento de la resistencia a la extensión con el amasado o con la extensión, sería equivalente a la existente en materiales poliméricos ramificados, donde resulta altamente dependien-

te del grado de enredado y del grado de ramificación [9]. En este último aspecto, cabe mencionar que hoy se acepta que las HMW-GS del gluten presentan una estructura ramificada con cadenas laterales cada 50-60 nm. Esas ramificaciones serían responsables del enredamiento que, junto con el estiramiento de la columna vertebral elástica entre puntos de enredamiento, produciría el aumento de la resistencia con la extensión.

A medida que las largas moléculas de glutenina son estiradas se establecen fuerzas de restauración que tienden a retornar las moléculas extendidas a su configuración estable. Las fuerzas para extenderlas, serán tanto mayores cuanto mayores sean los pesos moleculares de esas moléculas, por lo que esto se refleja en las altas intensidades críticas de mezclado que requieren las harinas más fuertes para dar una performance panadera óptima.

Con respecto al sobreamasado, una vez que se alcanzó el pico de desarrollo, algunos polímeros de glutenina tienden a romperse, la masa se afloja y disminuye la elasticidad. La degradación mecánica por esfuerzos es un bien conocido fenómeno en polímeros, donde se recono-

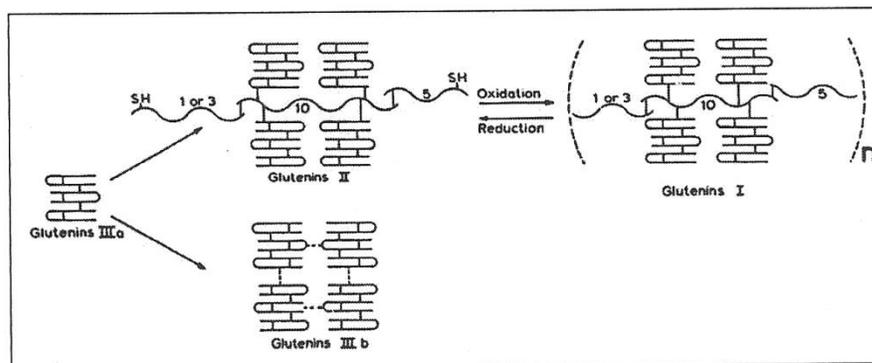


Fig. 5. Modelo de Graveland para la glutenina polimérica [13]

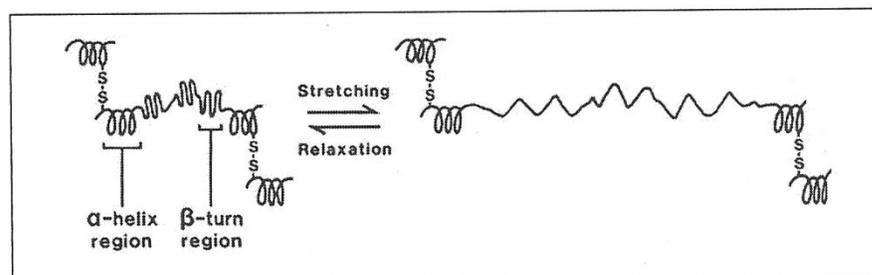


Fig. 6. Extensión y relajación de una subunidad de glutenina [27]

ce que, a velocidades de aplicación de esfuerzos prácticas, solo ocurre si hay presencia de enredamiento.

La ruptura de las uniones, se produce porque las cadenas moleculares no pueden desenredarse suficientemente rápido en respuesta a la velocidad de aplicación del esfuerzo. En tales circunstancias, la mayor tensión ocurre en el centro de la cadena y como resultado, se rompen preferentemente en su parte central. Existe buena evidencia de que son las uniones S-S las que se rompen en el sobreamasado. Esto es consistente con su menor fortaleza en comparación con las uniones peptídicas de la cadena principal.

Se cree que para polímeros con una amplia distribución de pesos moleculares, como es el caso del gluten, no se romperán los polímeros de menor peso molecular, sino que solo lo harán aquellos con una masa molecular mayor que un tamaño crítico. Como las cadenas se rompen cerca de su centro, el resultado neto es una distribución de pesos moleculares más estrecha con pérdida de los pesos moleculares más altos.

Los cambios que se han observado en las proteínas del gluten durante el amasado se corresponden cercanamente con dicho mecanismo.

### Modelo de Belton (loop and train model)

Propuesto en 1999 [2] también pone énfasis en las proteínas de alto peso molecular y en especial en las subunidades de alto peso molecular (HMW-GS) postulando que interactúan entre ellas a través de uniones S-S y puentes de hidrógeno. Acepta la formación de largos polímeros por efecto de uniones S-S cabeza con cola, por lo que una proteína aislada estaría representada por una larga cadena, convertida en "pegajosa" por la alta densidad de grupos polares susceptibles de formar puentes de hidrógeno.

En ausencia de agua, las cadenas estarían plegadas unidas por puentes de hidrógeno. Sin embargo, al agregar agua se produciría un aumento en el número de uniones agua-proteína, generando un balance entre los puentes de hidrógeno entre proteínas y aquellos hidratados. Se formarían así entre polímeros, regiones ligadas interaccionantes a través de puentes de hidrógeno (trains) y regiones móviles (loops) donde la interacción es entre el polímero y el solvente. En la Fig. 7a se esquematiza la configuración de loops y trains entre dos polímeros (la rayas perpendiculares simbolizan puentes de hidrógeno polímero-polímero o polímero-solvente).

A medida que la hidratación aumenta, se reduce la cantidad de trains y aumentan los loops. Los trains con otras cadenas estructurarían en-

tonces una red interconectada por uniones no covalentes.

Ante una pequeña extensión, los loops se tensionan, se estiran y se alinean (Fig 7c). Eliminado el esfuerzo, los loops recuperan su forma generando así una recuperación elástica.

Con extensiones mayores (Fig 7d), se desprenderían los trains permitiendo que las cadenas se deslicen unas sobre otras. Ante la eliminación del esfuerzo, la estructura se relajaría retornando al equilibrio entre loops y trains que corresponde al contenido de agua.

El modelo de loops and trains permite explicar la extensibilidad, ya que ante extensiones importantes, una vez estirados y alineados los loops, el proceso prosigue con deslizamiento de los trains a través de la ruptura y reformación de uniones hidrógeno.

También presenta una explicación para el aumento de la resistencia con la extensión, ya que cuanto más alineadas estén las cadenas, existe mayor contacto, mayor interacción no covalente (trains) y mayor resistencia.

En caso que el sistema se deforme en exceso, el modelo acepta, al igual que las teorías anteriores, que habría ruptura de uniones S-S con una destrucción de la estructura y una disminución en la resistencia (sobreamasado).

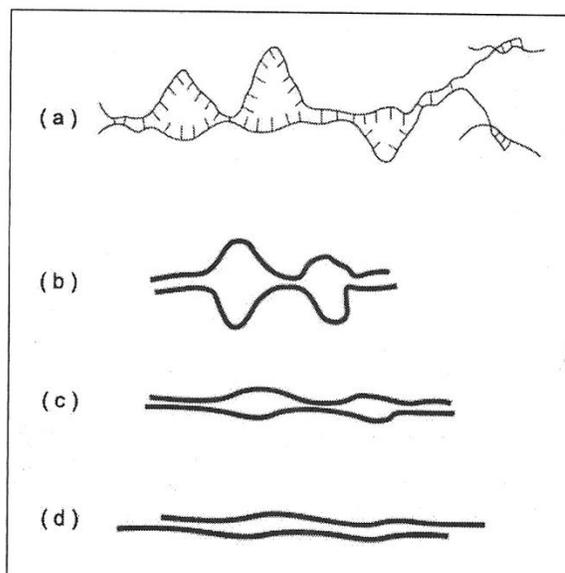


Fig. 7. (a) Loops y trains entre dos polímeros. (b) Configuración de equilibrio. (c) Pequeñas extensiones. (d) Deslizamiento entre cadenas

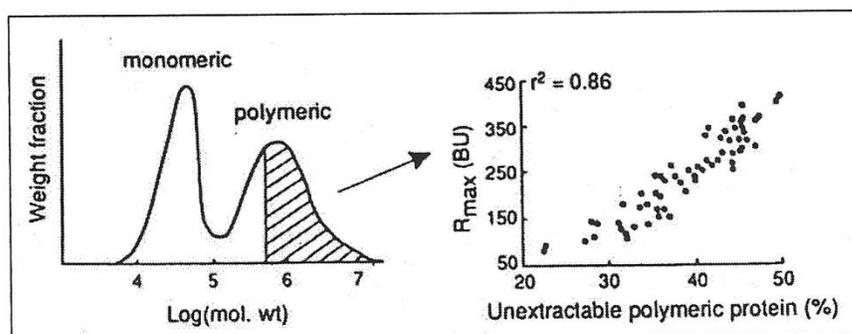


Fig. 8. Correlación entre  $R_{max}$  y GMP en diversas harinas [19]

### El macropolímero de glutenina

En 1982 Graveland [12] demostró que el residuo insoluble en ácido acético o en SDS que queda una vez solubilizadas las gluteninas, además de almidón tenía gluteninas inextraíbles de alto peso molecular (del orden de los 10.000 kDa).

A esta nueva fracción se la denominó Macropolímero de glutenina (GMP) y durante los años 90's, numerosos trabajos mostraron que el contenido de **GMP en las harinas** correlacionaba bastante bien con la calidad panadera y con algunos parámetros reológicos característicos como  $R_{max}$ , P/L, W, etc [33] [15] [24].

La Figura 8 presenta por ejemplo, una correlación entre  $R_{max}$  la resistencia máxima en el extensógrafo y el contenido de GMP para distintas harinas [19]. A la izquierda, se indica esquemáticamente, que en la correlación solo importan las gluteninas de alto peso molecular.

El GMP revolucionó la química de cereales, hasta el punto que hoy se piensa que es la fracción responsable de las propiedades únicas del gluten.

En 2003 Don, Hamer y otros [5] [6] [7] [8], separaron GMP de harina y en la suspensión coloidal en SDS, lograron ver por Confocal Scanning Laser Microscopy que estaría constituido por agregados poliméricos en forma de partículas esféricas entre 5 y 30  $\mu\text{m}$ . Detectaron también que durante el amasado, estas partículas se iban desagregando. Esta última observación está en línea con algo que se conocía desde que comenzaron los estudios sobre el GMP: el contenido de GMP se reduce durante el amasado. [32] [34] [35] [28] [29]

En la Figura 9 se muestra como se reduce el contenido de GMP durante el amasado, pasando desde un 100% en la harina, hasta valores del orden del 5% al final del mismo.

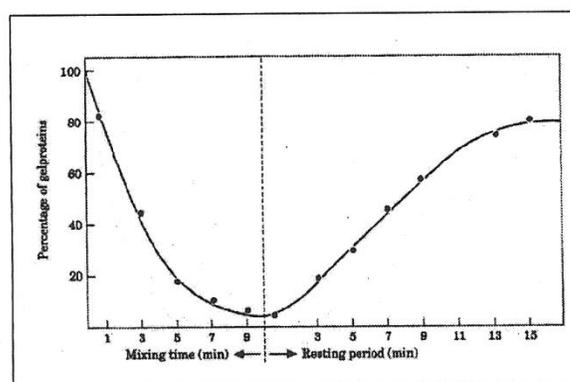


Fig. 9. Efecto del amasado y del descanso sobre el contenido de GMP [32]

Esta disminución del GMP insoluble, indica que durante el amasado está teniendo lugar una despolimerización [32] que facilita su extracción como glutenina.

Efectivamente, se ha verificado que la disminución del GMP se corresponde con un aumento de las gluteninas extraíbles.

Otro aspecto importante es que si una vez desarrollada, se deja descansar la masa, vuelve a aumentar el contenido de GMP (tanto más cuanto mayor es el tiempo de descanso) mostrando que al eliminar la aplicación de esfuerzos existe un proceso de repolimerización del GMP en la masa. Como puede verse en la Figura 9, no siempre se recupera el 100% del existente en la harina.

La Figura 10 compara, por su parte, la distribución de pesos moleculares de una harina y la de su masa desarrollada [1].

Puede observarse que han disminuido las proteínas de alto peso molecular a la vez que

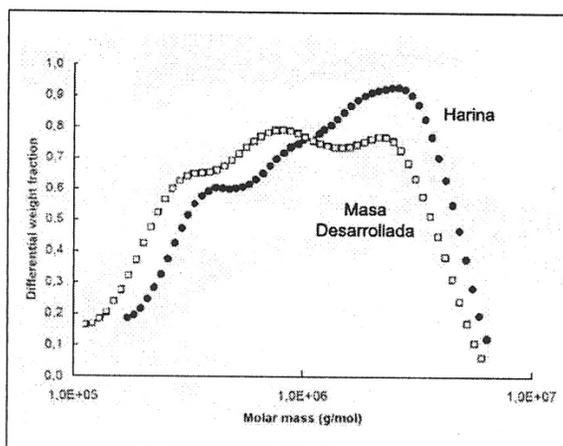


Fig. 10. Distribución de pesos moleculares de gluteninas totales [1]

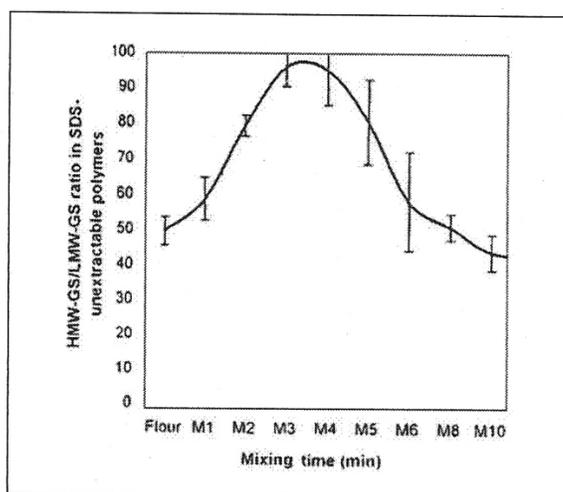


Fig. 11. Relación HMW-GS / LMW-GS en el GMP durante el amasado (desarrollo = 4 min)

crecen las de bajo peso molecular, confirmando la existencia de una despolimerización con formación de gluteninas de menor peso molecular.

La fuerte correlación del contenido de GMP en las harinas, con la performance panadera y con algunos de los parámetros reológicos, generó la necesidad de vincular el comportamiento del GMP con los modelos de estructuración de la red de gluten.

Surgieron al respecto diversas hipótesis y algunas controversias. Así, Don y colaboradores, que detectaron el desagregado de las partículas de GMP durante el amasado, [6] [7] [8] sugieren que el tamaño inicial de las partículas de GMP determina la energía necesaria para amasar hasta el

pico de desarrollo. Por su parte, Belton en recientes comunicaciones, [3] [4] objetiva esta interpretación en base a que la resistencia a la extensión es máxima justamente cuando las partículas de GMP son mínimas, por lo que deduce que las propiedades reológicas en el pico de desarrollo, no están determinadas por las partículas de GMP sino por sus productos de descomposición, que contribuyen a la formación de una matriz proteica. También Lee y col. [17] asignan importancia a la matriz proteica, afirmando que la fuerza de una masa estaría relacionada con la cantidad de matriz presente generada a partir de gluteninas mediante la aplicación de esfuerzos extensionales.

La reducción de los agregados de GMP durante el amasado detectada por microscopía Laser, el fenómeno de despolimerización y el mecanismo de desenredado, permiten sin embargo especular sobre una alternativa adicional basada en los siguientes puntos:

1. Los polímeros de glutenina de alto peso molecular tienden a enredarse. En la propia harina, los polímeros tienen un alto grado de enredamiento, formando los grandes ovillos de GMP inextraíbles con SDS.

2. Los esfuerzos de corte y extensionales del amasado desenredan los ovillos de GMP (reducción de agregados). Los polímeros más cortos se desenredan antes y se hacen solubles en SDS (disminución del GMP). Paralelamente aumenta la cantidad de gluteninas alineadas (matriz proteica) con el correspondiente aumento de la resistencia a la extensión.

3. En la masa desarrollada (máxima resistencia), una gran proporción del GMP se ha desagregado (los agregados pierden identidad) y solo quedan enredados los polímeros más largos (los formados con HMW-GS)

4. En el sobreamasado, los polímeros largos enredados son tensionados y tienden a cortarse en una unión S-S de la zona central de la cadena principal despolimerizándose y generando masas poco consistentes y pegajosas.

5. Se advierte entonces que la despolimerización durante el amasado, es distinta a la despolimerización en el sobreamasado. En la primera hay desenredado de polímeros, en la segunda hay ruptura de uniones S-S en las cadenas lineales.

6. El mecanismo descrito explica variaciones de la relación HMW-GS/LMW-GS medida en el GMP durante el amasado [1] Fig. 11.

Así, durante el amasado, como se desenredan primero los polímeros cortos (con menor relación HMW-GS/LMW-GS), el GMP se enriquece en los mas largos con el consiguiente aumento de la relación.

Durante el sobreamasado en cambio, los largos de cortan y la relación disminuye.

7. Durante el descanso, producto de una repolimerización se produce un aumento del GMP acercándose al valor original en la harina.

8. En 2005 Don, Hamer y otros [7] establecieron que si se llegó al amasado óptimo, la recuperación del GMP alcanza niveles similares a los de la harina original (la estructura del GMP desenredada durante el amasado vuelve a agregarse durante el descanso). Además, la relación HMW-GS/LMW-GS en el GMP repolimerizado también es similar a la de la harina original.

9. Si en cambio, la masa fue sobreamasada (con ruptura de uniones S-S) no se alcanzan durante el descanso los niveles de GMP originales y la relación HMW-GS/LMW-GS en el GMP es menor que la de la harina, indicando que las cadenas principales rotas no vuelven a reestructurarse igual. Se ha propuesto que las subunidades terminadoras de cadena, bloquean la unión de las largas cadenas principales rotas, limitando la repolimerización total.

### Conclusiones

A más de 3000 años que el hombre elabora pan, con una industria farinácea supersofisticada que mueve miles de millones de dólares, aún existen discrepancias sobre los mecanismos que conducen a la estructuración de la red de gluten y acerca del vínculo preciso entre reología y estructura polimérica. Sin embargo, detrás de ese vínculo se vislumbran oportunidades tecnológicas invalorable como la caracterización química de trigos y harinas (selección de variedades), el desarrollo de nuevos y más eficaces aditivos (oxidantes, reductores, enzimas, etc) y el desarrollo de variedades de trigo con propiedades predecibles a través del control genético del contenido y composición de proteínas (relación gluteninas/gliadinas, contenido de GMP, relación HMW-GS/LMW-GS, etc ).

### Referencias

- [1] Aussenac, T., Carceller, J., Kleiber, D. Changes in SDS solubility of glutenin polymers during dough mixing and resting. *Cereal Chem.* 78, 39 (2001)
- [2] Belton, P.S., On the elasticity of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 29, 103 (1999)
- [3] Belton, P.S., New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *J. Cereal Sci.* 41, 203 (2005)
- [4] Belton, P.S., What makes a good theory of gluten viscoelasticity?. en: *The Gluten Proteins*, Lafiandra, D., Masci, S., D'Ovidio, R. (Eds) pp 203 (2003)
- [5] Don, C., Lichtendonk, W., Plijter, J.J., Hamer, R.J., Glutenin macropolymer: a gel formed by glutenin particles. *J. Cereal Sci.*, 37, 1 (2003)
- [6] Don, C., Lichtendonk, W., Plijter, J.J., Hamer, R.J., Understanding the link between GMP and dough : from glutenin particles in flour towards developed dough. *J. Cereal Sci.*, 38, 157 (2003)
- [7] Don, C., Lichtendonk, W., Plijter, J.J., van Vliet, T., Hamer, R.J., The effect of mixing on glutenin particle properties: aggregation factors that affect gluten function in dough. *J. Cereal Sci.*, 41, 69 (2005).
- [8] Don, C., Mann, G., Bekes, F., Hamer, R.J., HMW-GS affect the properties of glutenin particles in GMP and thus flour quality. *J. Cereal Sci.* 44, 127 (2006).
- [9] Dobraszczyk, B.J., Morgenstern, M.P., Rheology and the breadmaking process. *J. Cereal Sci.* 38, 229 (2003).
- [10] Ewart, J.A.D., Re-examination of the linear gluten hypothesis. *J. Sci. Food Agric.* 28, 191 (1977).
- [11] Gras, P.W., Carpenter, H.C., Anderssen, R.S., Modelling the developmental rheology of wheat-flour dough using extension tests. *J. Cereal Sci.* 31, 1 (2000).
- [12] Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Moonen, J.H.E., Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *J. Sci. Food Agric.* 33, 1117 (1982).
- [13] Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Marseille, J.P., Moonen, J.H.E., Scheepstra, A. A model for the molecular structure of the glutenins from wheat flour, *J. Cereal Sci.* 3, 1 (1985)
- [14] Greenwood, C.T., Ewart, J.A.D., Hypothesis for the structure of glutenin in relation to rheological properties of gluten and dough. *Cereal Chem.* 52, 146r (1975).
- [15] Gupta, R.B., Batey, I.L., Mac Ritchie, F. Relationship between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal Chem.* 69, 125 (1992).
- [16] Hamer, R.J., Van Vliet, T., Understanding the structure and properties of gluten: an overview. en *Wheat Gluten*, Shewry, P.R., Tatham, A.S., Royal Society of Chemistry, pp 125 (2000).
- [17] Lee, L., Ng, P.K.W., Whallon, J.H., Steffe, J.F., Relationship between rheological properties and microstructural characteristics of nondeveloped, partially developed and developed doughs. *Cereal Chem.* 78, 447 (2001).
- [18] Lindsay, M.P., Skerritt, J.H., The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure - function perspectives. *Trends in Food Sci. & Tech.* 10, 247 (1999).
- [19] MacRitchie F. Physicochemical processes in mixing. en: *Chemistry and Physics of Baking*, Blanshard, J.M.V, Frazier, P.J. and Galliard, T. (Eds.) Chap. 10 pp 132 (1987).
- [20] MacRitchie F., Wheat proteins: Characterization and role in flour functionality. *Cereal Foods World*, 44, 188, (1999).
- [21] MacRitchie F., Singh, H. Polymer concepts applied to gluten behavior in dough. en: *The*

- Gluten Proteins, Lafiandra, D., Masci, S., D'Ovidio, R. (Eds) pp 227 (2003).
- [22] Meredith, P., A theory of gluten structure. *Cereal Sci. Today*, 9, 33 (1964).
- [23] Peighambardoust, S.H., van del Goot, A.J., Hamer, R.J., Boom, R.M. Effect of simple shear on the physical properties of glutenin macropolymer (GMP). *J. Cereal Sci.* 42, 59 (2005).
- [24] Sapirstein, H.D., Suchy, J. SDS protein gel test for prediction of bread loaf volume. *Cereal Chem.* 76, 164 (1999).
- [25] Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S., High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 15, 105 (1992).
- [26] Shewry, P.R., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P., Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Sci. & Tech.* 11, 433 (2001).
- [27] Schofield, J.D., Flour proteins: structure and functionality in baked products. en: *Chemistry and Physics of Baking*, Blanshard, J.M.V., Frazier, P.J. and Galliard, T (Eds) The Royal Society of Chemistry Chap. 2 pp 14 (1987).
- [28] Skerritt, J.H., Hac, L., Lindsay, M.P., Bekes, F., Depolymerization of the glutenin macropolymer during mixing: I Changes in levels, molecular weight distribution and overall composition. *Cereal Chem.* 76, 395 (1999).
- [29] Skerritt, J.H., Hac, L., Lindsay, M.P., Bekes, F., Depolymerization of the glutenin macropolymer during mixing: II Differences in retention of specific glutenin subunits. *Cereal Chem.* 76, 402 (1999).
- [30] Stauffer, C.E. Principles of dough formation. en: *Technology and breadmaking* Cauvain, S.P., Young L.S. (Eds) Blackie Acad. & Prof., Chap. 11 (1998).
- [31] Tatham, A.S., Mifflin, B.J., Shewry, P.R., The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: Relationship to gluten elasticity. *Cereal Chem.* 62, 405 (1985).
- [32] Weegels, P.L., Hamer, R.J., Schofield, J.D. Functional properties of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 23, 1 (1996).
- [33] Weegels, P.L., van de Pijpekamp, A.M., Graveland, A., Hamer, R.J., Schofield, J.D., Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *J. Cereal Sci.* 23, 103 (1996).
- [34] Weegels, P.L., Hamer, R.J., Schofield, J.D., Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. II. Changes in composition. *J. Cereal Sci.* 25, 155 (1997).
- [35] Weegels, P.L., Hamer, R.J., Schofield, J.D., Functional properties of low Mr wheat proteins. III. Effects on composition of the glutenin macropolymer during dough mixing and resting. *J. Cereal Sci.* 25, 165 (1997).

*Manuscrito recibido el 26 de diciembre de 2007.*

*Aceptado el 15 de enero de 2008.*