

RELACIONES DE LA COMPOSICIÓN PROTEÍNICA Y MEDICIONES REOLÓGICAS EN MASA CON LA CALIDAD PANADERA DE HARINAS DE TRIGO

RELATIONSHIPS OF PROTEIN COMPOSITION AND DOUGH RHEOLOGICAL MEASUREMENTS WITH BREADMAKING PERFORMANCE OF WHEAT FLOURS

Alma Islas Rubio^{1,2*}, Finlay MacRitchie¹, Somayajulu Gandikota¹ y Gary Hou³

¹ Grain Science & Industry Dept., Kansas State University, 201 Shellenberger Hall. Manhattan, KS 66506-2201. ² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Km. 0.6, Carr. A la Victoria. C. P. 83000 Hermosillo, Sonora, México. Tel y Fax: 01 (662) 280-0422. Correo electrónico: aislas@cascabel.ciad.mx ³ Wheat Marketing Center, Inc. 1200 N.W. Naito Parkway, Suite 230. Portland, OR. 97209-2800.

* Autor para correspondencia

RESUMEN

Se determinaron los contenidos de proteína y cenizas, propiedades reológicas, la composición protéica y la calidad panadera de 22 harinas de trigos (*Triticum aestivum* L.) cultivados en la región Centro-Oeste de los Estados Unidos en el año 2000. Las propiedades reológicas de la masa fueron evaluadas con el mixógrafo National, farinógrafo y extensógrafo Brabender, alveógrafo Chopin y el analizador de textura TA-XT2. Las cantidades relativas de proteínas poliméricas y monoméricas se determinaron de los extractos en buffer-SDS separados en el sistema SE-HPLC. La calidad panadera (volumen de pan) fue evaluada mediante la prueba de panificación de masa directa. Se establecieron las relaciones entre la composición protéica, los parámetros reológicos y el volumen de pan. La proporción de proteína polimérica no extraíble en buffer-SDS, tanto en la proteína total (PPNET) como en la proteína polimérica de la harina (PPNEH), fue la fracción que mejor correlacionó con la mayoría de las mediciones reológicas [TdMix ($r=0.6^{**}$ y 0.6^{**}), los parámetros L ($r=0.5^{*}$ y 0.7^{**}) y W ($r=0.2$ y 0.5^{*}) del alveógrafo, Rmax ($r=0.4^{**}$ y 0.7^{**}) y trabajo de deformación del extensógrafo ($r=0.5^{**}$ y 0.7^{**}), resistencia máxima ($r=0.4^{**}$ y 0.4^{**}) y trabajo de deformación ($r=0.3^{*}$ y 0.4^{**}) del analizador de textura]; seguida por albúminas/globulinas [TdMix ($r=-0.5^{**}$), W ($r=-0.7^{**}$), resistencia máxima y trabajo de deformación medidos con el extensógrafo ($r=-0.5^{**}$ y -0.6^{**}) y con el analizador de textura TA-XT2 ($r=-0.4^{**}$ y -0.5^{**})]; mientras que las gliadinas no mostraron correlación significativa. El volumen de pan correlacionó positiva y significativamente con Rmax, TdFar, la estabilidad, L, W, trabajo de deformación del extensógrafo, el contenido de proteína, PPH y PPNEH, y en forma negativa con la extensibilidad, la absorción e ITA del farinógrafo. Se obtuvo un modelo de predicción del volumen de pan que explica 87 % de la variabilidad en volumen.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, cromatografía de exclusión por tamaño, proteína de gluten, proteína polimérica no extraíble, volumen de pan.

SUMMARY

Protein and ash content, rheological properties, protein composition and baking performance of twenty two wheat flours (*Triticum*

aestivum L.) grown in the Center-Western of the United States of America during the year 2000, were determined. Rheological properties were evaluated with the National mixograph, Brabender farinograph and extensigraph, Chopin alveograph, and the texture analyzer TA-XT2. The relative amounts of polymeric and monomeric proteins were determined in SDS-buffer extracts separated by SE-HPLC. The baking quality (bread loaf volume) of the flours was evaluated by a straight dough baking procedure. The relationships among protein composition, rheological properties, and loaf volume were evaluated. The proportion of unextractable polymeric protein, both in the total protein (PPNET) and in the flour (PPNEH), was the fraction that correlated better with most of the rheological measurements [TdMix ($r=0.6^{**}$ and 0.6^{**}), alveograph L ($r=0.5^{*}$ and 0.7^{**}) and W parameters ($r=0.2$ and 0.5^{*}), extensigraph Rmax ($r=0.4^{**}$ and 0.7^{**}) and work of deformation ($r=0.5^{**}$ and 0.7^{**}), TA-XT2 maximum resistance ($r=0.4^{**}$ and 0.4^{**}) and deformation work ($r=0.3^{**}$ and 0.4^{**})], followed by albumins/globulins [TdMix ($r=-0.5^{**}$), W ($r=-0.7^{**}$), extensigraph maximum resistance ($r=-0.5^{**}$) and deformation work ($r=-0.6^{**}$), TA-XT2 maximum resistance ($r=-0.4^{**}$) and deformation work ($r=-0.5^{**}$)]; whereas gliadins showed no significant correlations. Bread loaf volume was positively correlated with Rmax, TdFar, stability, L, W, extensigraph deformation work, PPH, and PPNEH, but negatively with extensibility, and farinograph water absorption and mixing tolerance index (ITA). A prediction model for bread loaf volume was obtained which explains 87 % of the variation in loaf volume.

Index words: *Triticum aestivum*, size exclusion chromatography, gluten protein, unextractable polymeric protein, bread loaf volume.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es único entre los cereales debido a las propiedades viscoelásticas de masa desarrolladas al mezclar su harina con agua. La cantidad y composición de la proteína de trigo son responsables del potencial de panificación de una harina y de las diferentes calidades de los trigos. Las proteínas se clasifican, de acuerdo con su solubilidad; en hidrosolubles (albúminas),

solubles en sal (globulinas), solubles en alcohol (prolaminas) y solubles en ácidos y álcali (glutelinas). A las prolaminas y glutelinas del trigo se les conoce como gliadinas y gluteninas, respectivamente (Pomeranz, 1987). Las gliadinas son prolaminas monoméricas que a su vez se dividen en tres grupos con base en su contenido de azufre y pesos moleculares: las α -, γ - y ω -gliadinas. Las gluteninas son proteínas poliméricas que contienen dos grupos de subunidades, los de bajo peso molecular (LMW) y de alto peso molecular (HMW) (Shewry *et al.*, 1986). Las subunidades de gluteninas LMW tienen pesos moleculares de 36 000-44 000, y por tanto tienen la misma movilidad en SDS-PAGE que las gliadinas. Las subunidades de gluteninas HMW tienen pesos moleculares de 95 000-136 000 (Shewry *et al.*, 1986). El peso molecular de una molécula de glutenina polimérica puede ser de varios millones (Wahlund *et al.*, 1996).

Las proteínas poliméricas dan fuerza y elasticidad a la masa de trigo, mientras que las gliadinas monoméricas son responsables de las propiedades viscoelásticas de la masa (Shewry *et al.*, 1992; Belton, 1999). El solvente con que se extrae a la proteína y el sistema analítico utilizado para separar las distintas fracciones proteínicas determinan su separación y cuantificación. Los sistemas analíticos más utilizados son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en su modalidad de fase reversa, de interacción hidrofóbica y de exclusión por tamaño, así como los sistemas electroforéticos con dodecil sulfato sódico tanto en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), como en capilares (SDS-CE) y los de electroforesis capilar de zona libre (FZCE).

Existen varias pruebas empíricas que se han utilizado para predecir el comportamiento tecnológico y calidad panadera de las harinas (Bloskma y Bushuk, 1988; Weegels *et al.*, 1996; Kieffer *et al.*, 1998). Generalmente, el volumen de pan es considerado el parámetro más importantes en la evaluación de la calidad panadera (Weegels *et al.*, 1996). En la última década se han reportado avances en la determinación de la cantidad y proporción de las diferentes proteínas del gluten (Gupta *et al.*, 1992, 1993; Weiser *et al.*, 1998; Bean *et al.*, 1998; Bean y Lookhart, 2001). Estudios previos han reportado inconsistencia en la solubilidad de las proteínas de diferentes cultivares (Singh *et al.*, 1990a) y en la sobreposición de componentes de las fracciones proteínicas que dependen del procedimiento de aislamiento (Bietz y Wall, 1980; Chakraborty y Khan, 1988).

Bietz (1984) analizó extractos no reducidos en SDS de trigos de diferente calidad panadera mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) y encontró una relación inversa entre la cantidad de glutenina nativa fácilmente extraíble de alto peso molecular (HMW) y la ca-

lidad de la harina. Posteriormente, Singh *et al.* (1990a) desarrollaron un procedimiento para extraer completamente las proteínas no reducidas de la harina mediante esfuerzo mecánico con un vástago sonicador. Después de una extracción completa de las proteínas por sonicación, la cantidad relativa de gluteninas se correlacionó positiva y significativamente con la calidad panadera de diversos genotipos de trigo. Esta prueba rápida a pequeña escala puede utilizarse para predecir la calidad panadera de trigos en programas de mejoramiento genético. Varios estudios (Singh *et al.*, 1990b; Lookhart *et al.*, 1993; Weegels *et al.*, 1996; Vasil *et al.*, 2001) han reportado relaciones entre el contenido de macropolímeros de gluteninas y parámetros de calidad. También se han reportado correlaciones entre la fuerza y extensibilidad de la masa medida a micro-escala (Kieffer *et al.*, 1998) y la calidad panadera; sin embargo, no se consideró la composición proteínica en ese estudio.

El objetivo de este trabajo fue determinar las relaciones entre la composición proteínica (basada en su solubilidad en SDS) de harinas de trigo, mediciones reológicas de la masa y el volumen del pan. Además, establecer si la metodología de SE-HPLC y la medición de la fuerza y extensibilidad de la masa a micro-escala pudieran ser apropiadas para utilizarse en programas de mejoramiento genético del trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Harinas. Se caracterizaron química y reológicamente las harinas de 22 trigos cultivados en la región Centro-Oeste de los Estados Unidos en el año 2000, que fueron donadas por el Wheat Marketing Center, Inc. en Portland, Oregon. Se considera que el material aquí utilizado tiene diversidad genética, porque las variedades provienen de diferentes estados de EE.UU., y algunas fueron traídas de Australia.

Reactivos. Los solventes utilizados en el sistema SE-HPLC fueron: ácido trifluoroacético (ATA) y acetonitrilo (ACN), ambos grado HPLC. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Análisis químicos

Los contenidos de proteína y cenizas en las harinas se determinaron por métodos oficiales (Métodos 46-30 de la AACC, 1995; Método 14.006 de la AOAC, 1990, respectivamente) en el laboratorio del Wheat Marketing Center, Inc.

Pruebas reológicas

Farinograma. Se obtuvieron los farinogramas de acuerdo con el método 54-21 de la AACC (1995). Esta prueba mide la resistencia que opone la masa al amasado y consiste en determinar por medio de prueba y error la cantidad óptima de agua para lograr la consistencia ideal de la masa (500 Unidades Brabender). Los parámetros reportados son: tiempo de desarrollo (TdFar), absorción de agua (Abs, %), estabilidad (Est, min) e índice de tolerancia al amasado (ITA). El TdFar es el tiempo que tarda la masa en adquirir su consistencia óptima. La estabilidad y el ITA son parámetros importantes, sobretodo en la industria de panificación, ya que dan una idea de la calidad de la masa, si la misma es sobreamasada o trabajada en exceso. La industria panadera prefiere harinas con alta absorción de agua, tiempo promedio de mezclado y buena estabilidad o ITA (Serna-Saldívar, 1996). Esta prueba utiliza 300 g de harina y fue realizada en el laboratorio del Wheat Marketing Center, Inc. Es posible realizar esta prueba con 50 g de harina, pero la industria panadera cuenta con un instrumento que opera con 300 g. Se reportan los valores del ITA de sólo 13 harinas.

Alveograma. Se obtuvieron los alveogramas con el método 54-30A de la AACC (1995). El ensayo consiste en amasar 250 g de harina por 8 min con una solución salina a 2.5 %. Para mayores detalles sobre este ensayo consultar a Serna-Saldívar (1996). Los parámetros evaluados fueron: resistencia a la deformación o tenacidad P (mm), extensibilidad L (mm) y trabajo realizado para deformar la masa W ($\times 10^{-4}$ Joules) que es equivalente o proporcional al área bajo la curva y está fuertemente relacionado con el contenido de proteína o fuerza de la harina (Serna-Saldívar, 1996). No se reportan todos los parámetros del alveógrafo para todas las harinas. Los alveogramas se hicieron en el laboratorio del Wheat Marketing Center, Inc.

Mixograma. Se obtuvieron por duplicado los mixogramas de las harinas mediante el método 54-40A de la AACC (1995), con el mixógrafo National (National Manufacturing, Inc., NJ) a partir de 10 g de harina (14 % b.h.) y 0.2 g de cloruro de sodio. Es importante aclarar que este método oficial considera únicamente harina y agua; sin embargo, en este trabajo además de harina y agua se incluyó cloruro de sodio. La adición de sal prolonga el tiempo de desarrollo de la masa (Belitz *et al.*, 1990), por lo que es de esperarse que los tiempos de desarrollo (TdMix) reportados en este estudio sean ligeramente mayores a los que se obtuvieran siguiendo estrictamente el método oficial. La razón de la inclusión de sal en esta prueba es que se deseaba contar con el mismo tipo de masa que se requiere para la prueba del extensógrafo. Esta prueba tiene principios similares al farinógrafo y es el mé-

todo preferido por fitomejoradores ya que sólo requiere 10 o 35 g de muestra y el ensayo tiene una duración de 7 u 8 min (Finney y Shogren, 1972). Actualmente se cuenta con mixógrafos computarizados que operan hasta con 2 g de harina (Walker *et al.*, 1997, Hazelton *et al.*, 1997), pero son usados principalmente en investigación, no como prueba industrial de rutina ya que la pequeña cantidad de harina y agua requieren de procedimientos de muestreo exactos y mediciones precisas. La evaluación de la curva del mixógrafo es más subjetiva que la del farinógrafo (Serna-Saldívar, 1996). Generalmente, en esta prueba se evalúa: altura de la curva, ángulo y grosor (fuerza) de los segmentos, antes y después del punto óptimo de desarrollo, y área bajo la curva. En este trabajo sólo se reporta el tiempo óptimo de desarrollo (TdMix). Esta medición se hizo en el Departamento de Ciencia de Granos e Industria, de la Universidad Estatal de Kansas en Manhattan, KS, EE.UU.

Extensograma. La resistencia de la masa a la tensión hasta llegar al rompimiento (Rmax, Unidades Brabender), su extensibilidad (Ext2, cm) y el trabajo de extensión (W2, cm^2) o área bajo la curva (determinada con un planímetro), se midieron mediante el método 54-10 de la AACC (1995). Esta prueba requiere de 300 g de harina óptimamente amasada en el farinógrafo con una solución salina a 2 %, y se evalúa la masa en tres periodos de reposo (a los 45, 90 y 135 min). La masa en forma de cilindro (150 g) es colocada en una cámara de fermentación a 30 °C y 94 % H. R, se reposa por 45 min e inmediatamente se evalúa con el extensógrafo y, posteriormente, el cilindro de masa es reformado para colocarse de nuevo en la cámara y repetir el procedimiento en los siguientes 45 min. Los parámetros del extensógrafo reportados en este estudio corresponden a las masas reposadas los primeros 45 min. La relación Rmax/Ext2 es un factor importante para determinar la fuerza y características funcionales de la harina de trigo (Serna-Saldívar, 1996). El área bajo la curva es el trabajo realizado por el instrumento para romper la masa y da una indicación de la fuerza de la misma. Estas mediciones se hicieron en el Departamento de Ciencia de Granos e Industria, de la Universidad Estatal de Kansas en Manhattan, KS, EE.UU.

Fuerza de tensión y extensibilidad de la masa. La medición de la fuerza máxima (Fmax, g) y extensibilidad (Ext3, cm) de la masa (micro-escala) se llevó a cabo con un analizador de textura (TA-XT2, SMS/Kieffer dough extensibility rig, Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, England). La masa (10 g), óptimamente amasada en el mixógrafo (por un tiempo igual a TdMix), se colocó en la plataforma ranurada (prensa) con el fin de formar tiras de masa, y se introdujo en una cámara de fermentación (30 °C, 94 % H.R.) por 45 min. Posteriormente, se efectuó la medición de la fuerza y extensibilidad de la masa a una

velocidad de prueba de 3.3 mm s^{-1} . El analizador de textura fue calibrado con una pesa de 5 kg y a una altura de 12 mm. Esta prueba se hizo por duplicado, con 5 a 8 mediciones por repetición. Además, se determinó el área bajo la curva (W3, g cm) que representa el trabajo requerido para estirar la masa hasta romperla. De manera alterna se realizaron también las mediciones de esta prueba a micro-escala en las masas amasadas en el farinógrafo (que incluye sal), mismas que fueron evaluadas en el extensógrafo Brabender. Esta prueba reológica a micro-escala se llevó a cabo en el Departamento de Ciencia de Granos e Industria, de la Universidad Estatal de Kansas en Manhattan, KS. Algunas de las ventajas de utilizar esta prueba a micro-escala en vez de la del extensógrafo es que requiere sólo 10 g de harina, el área bajo la curva al igual que todos los parámetros evaluados se obtienen directamente del aparato sin necesidad de usar un planímetro o cálculos a mano, y por la facilidad del manejo de los datos para su análisis.

Volumen de pan

Se elaboraron panes mediante el método 10-10B de la AACC (1995) con las siguientes modificaciones: cada una de las harinas (35 g, 14 % b.h.) se mezcló en el mixógrafo National con los demás ingredientes: sal (0.53 g), levadura (0.70 g), azúcar (2.1 g), manteca vegetal (1.05 g) y agua. La masa fue extendida con rodillos separados 0.119" ó 2.975 mm (pre-moldeo) y 0.143" ó 3.575 mm para el primer y segundo ponchado (Com. personal)¹. En este procedimiento las masas fueron colocadas en moldes para hornear 35-g, fermentadas por 40 min a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ con una humedad relativa de $94 \pm 1\%$, y horneadas por 17 min a 215°C . Al término del horneado, se midió el volumen de cada hogaza de pan (VP) mediante desplazamiento de semillas de colza.

Extracción de proteína

Proteína polimérica total (PPT). Se pesaron 10 mg de cada harina en tubos de microcentrífuga; a cada tubo se le agregó 1 mL de SDS-buffer (0.5 % SDS en 0.05 M fosfato, pH 6.9) y se agitó la suspensión en un vórtex por 5 min. Posteriormente, se colocó el tubo con la suspensión en un sonicador (modelo 60, Fisher Scientific, Pittsburg, PA), y se introdujo el vástago (3 mm de diámetro) 1/3 de la distancia del fondo del tubo Eppendorf. La potencia y el tiempo de sonicación fueron 6 W y 15 s (Batey *et al.*, 1991). La muestra fue centrifugada a 17 800 g por 15 min en una microcentrífuga Eppendorf 5417C. El sobrenadante

se filtró a través de un filtro de nylon de $0.45 \mu\text{m}$ y se calentó por 2 min a 80°C . Inmediatamente, las muestras fueron enfriadas con agua y se colocaron en los viales para ser analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

Proteína polimérica extraíble (PPE). La proteína extraíble se determinó al colectar el sobrenadante una vez que la suspensión de harina en SDS-buffer (10 mg en 1 mL) fue agitada por 5 min (no sonicación) y centrifugada a 17 800 g por 15 min. Después de filtrar la muestra a través de un filtro de nylon de $0.45 \mu\text{m}$, ésta se calentó por 2 min a 80°C y se enfrió con agua, se colocó en un vial para su análisis mediante SE-HPLC.

Proteína polimérica no extraíble (PPNE). El precipitado de la extracción que no incluyó sonicación se mezcló con 1 mL de SDS-buffer (0.5 % SDS en 0.05 M fosfato, pH 6.9) y se procedió de manera similar a la determinación de proteína extraíble, excepto que la potencia y tiempo de sonicación fueron de 14 W y 25 s (Batey *et al.*, 1991). Después de centrifugar y filtrar las muestras, éstas se colocaron en viales para analizarlas mediante SE-HPLC.

Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño

Los extractos proteínicos fueron analizados en un sistema HP 1100 (Hewlett Packard) con inyección automática y fraccionados con una columna Biosep-SEC-S4000 (Phenomenex, Torrence, CA). El solvente de arrastre fue ACN y agua (1:1) conteniendo 0.05 % ATA. El perfil HPLC se dividió en picos 1, 2 y 3 correspondientes a proteína polimérica (gluteninas), gliadinas y albúminas/globulinas, respectivamente. La Figura 1 muestra los cromatogramas típicos (perfiles HPLC) que se obtienen con los extractos de la proteína total, de la extraíble y de la no extraíble de una harina. Además, se registró el área absoluta y la relativa de cada pico. Se calculó la proporción entre el pico 1 de la proteína extraíble y el pico 1 de la proteína no extraíble, o el porcentaje del pico 1 de la proteína no extraíble en el pico 1 de la proteína total (pico 1 proteína extraíble + pico 1 proteína no extraíble), una medida de la distribución de tamaño relativo de la proteína polimérica. El porcentaje de proteína polimérica en la proteína de las harinas (PPH) se calculó multiplicando el contenido de proteína en la harina y la proporción de proteína polimérica, mientras que el porcentaje de proteína polimérica no extraíble de las harinas (PPNEH) se calculó multiplicando el contenido de proteína en la harina y la proporción de proteína polimérica no extraíble por la proporción de proteína polimérica.

¹ M G Shogren. Profesor Adjunto. Kansas State University. Manhattan, KS. Experto en panificación.

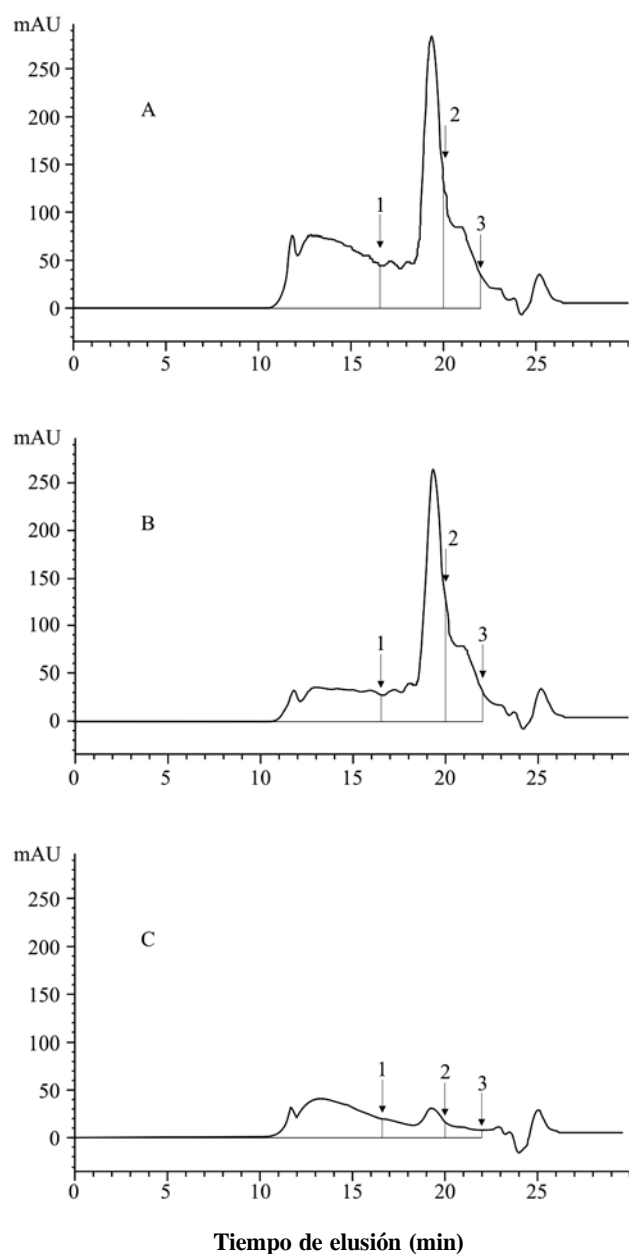


Figura 1. Separación de los extractos de la proteína total (A), proteína extraíble (B) y proteína no extraíble (C) de una de las harinas mediante SE-HPLC con una columna Biosep-SEC-S4000 Phenomenex. ▼ Indica la demarcación de cada pico (1, 2 y 3).

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SAS (1990) y se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo, análisis de varianza y regresión múltiple, mediante el modelo lineal general y el procedimiento por pasos "stepwise".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químicos

Los contenidos de proteína y cenizas de las harinas variaron de 9.1 a 13.3 % y de 0.33 a 0.56 %, respectivamente. Tres de las harinas presentaron contenidos de proteína menores de 10 %. El contenido de proteína se correlaciona con casi todas las propiedades de la harina, como requerimiento de agua para el amasado, tolerancia al amasado, características de manejo, requerimiento de oxidación, volumen de pan, y aún las características de la miga (Pomeranz, 1987). El contenido de cenizas en harina indica la eficiencia de la molienda del grano y además afecta al color de la harina; entre menor sea la remoción de pericarpio del grano durante la molienda, los valores de cenizas serán más altos y la harina presentará una coloración más oscura. Los contenidos de cenizas de las harinas analizadas se encuentran dentro del rango esperado para harinas panificables.

Pruebas reológicas

Las harinas presentaron amplias diferencias en sus características reológicas. El tiempo de desarrollo en el farinógrafo varió entre 1.9 y 33.1 min. Seis de las harinas presentaron tiempos de desarrollo cortos (< 3 min) y sólo tres harinas requirieron más de 20 min de amasado en el farinógrafo para desarrollar óptimamente su gluten.

La absorción de agua del farinógrafo (Abs) fluctuó entre 52.5 y 70 % y la estabilidad (Est) osciló de 3.1 a 48.7 min. Tres harinas resultaron de baja estabilidad (< 5 min) por lo que no satisfacen los requerimientos de la industria de panificación mecanizada que son de al menos 8 min de estabilidad. El ITA (evaluado sólo en 13 harinas) fluctuó entre 5 y 70 Unidades Brabender (UB); los valores superiores a 30 UB no son deseables en harinas para panificación porque indican baja calidad panadera. Cuatro de las trece harinas presentaron valores superiores a 30 UB, por lo que para poder utilizarse en la elaboración de pan, requerirán de aditivos o mezclarse con otras harinas que mejoren esta condición, lo cual implicaría mayor costo.

Los alveogramas se corrieron sólo con nueve harinas en las que los parámetros medidos con el alveógrafo (P, L y W) mostraron un amplio rango en la fuerza de la masa. P varió de 78 a 133 mm y L de 77 a 129 mm. Sobresalieron por su poca extensibilidad (P/L) las masas elaboradas con tres harinas, cuya relación P/L fue de 0.63, 0.67 y 0.79 que corresponden a masas poco extensibles (Pomeranz, 1987). El índice L del alveógrafo fue particularmente útil en la predicción del volumen de pan cuando se

consideraron los requerimientos de amasado y de oxidación de las harinas. Una limitación sería del alveógrafo es que utiliza una absorción fija de agua, lo cual parece satisfactorio con harinas débiles pero da resultados erráticos con harinas fuertes de alta absorción de agua (Pomeranz, 1987). Sólo tres de las nueve harinas analizadas requirieron menos de 300×10^{-4} J para deformar su masa hasta romperla, y estas tres harinas débiles también presentaron valores de W inferiores a los requeridos por la industria panadera mecanizada. En los tiempos de desarrollo del mixógrafo (TdMix), seis de las harinas presentaron TdMix significativamente más prolongados (> 6.4 min).

Las masas presentaron diferencias significativas en los parámetros reológicos evaluados con el extensógrafo. La resistencia a la extensión (Rmax) varió entre 273 y 950 UB, y una de las harinas presentó un Rmax significativamente mayor que el resto de las harinas. En la extensibilidad (Ext2) del extensógrafo, cuatro harinas fueron las más extensibles, y en la fuerza del gluten cuatro harinas resultaron ser las más fuertes (mayores áreas) y tres las más débiles.

En la prueba de fuerza y extensibilidad de la masa a micro-escala se obtuvieron valores de máxima resistencia a la extensión (Fmax) entre 13.5 y 43.1 g, mientras que la extensibilidad (Ext3) varió de 5.3 a 10.6 cm. El área bajo la curva, una indicación del trabajo requerido para extender la masa antes de romperse (W3), presentó valores entre 87 y 216 gcm. Una harina registró la mayor área bajo la curva y superó a 90 % de las harinas estudiadas; otra harina mostró una fuerza significativamente menor que el resto de las harinas, excepto una de ellas.

En las áreas bajo la curva (W3) del analizador de textura TA-XT2, cuatro harinas requirieron un mayor trabajo de deformación. Para tratar de eliminar el efecto del mecanismo de mezclado entre la amasadora del farinógrafo y la amasadora del mixógrafo se realizaron también mediciones con la masa preparada para la prueba del extensógrafo. En general, la masa obtenida en el farinógrafo presentó mayor resistencia a la extensión (de 18.3 a 54.5 g) y se extendió menos (de 3.9 a 8.7 cm) que la masa del mixógrafo. Posiblemente la acción de amasado más suave del farinógrafo mantiene un mayor número de enlaces que le dan fuerza al gluten y éste presenta mayor resistencia a la extensión. En la Figura 2 se muestra la relación entre la resistencia máxima medida con el extensógrafo Brabender y con el analizador de textura TA-XT2 en la masa amasada en el farinógrafo.

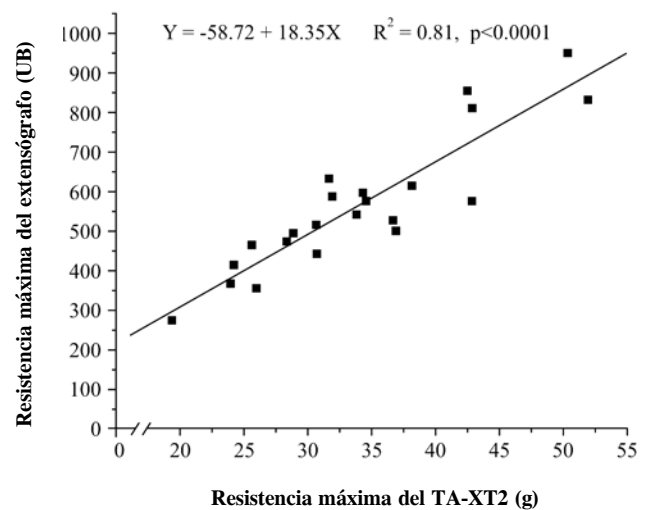


Figura 2. Relación entre la resistencia máxima medida con el extensógrafo Brabender y con el analizador de textura TA-XT2.

Volumen de pan

El volumen de pan fluctuó entre 148, 314 cm³, con diferencias significativas entre las harinas, en especial una de las harinas que fue significativamente mayor que el resto; otras tres harinas presentaron los segundos mejores volúmenes. Sólo seis harinas produjeron pan de un volumen menor de 200 cm³.

Composición proteínica

El porcentaje de proteína polimérica total (PPT, pico 1) varió de 31.2 a 42.8 %, el de gliadinas (pico 2) de 43.1 a 51.6 % y el de albúminas/globulinas (pico 3) de 10.4 a 17.2 %, diferencias que resultaron significativas entre las variedades. Una harina se diferenció del resto por presentar un contenido de PPT significativamente menor. Tres harinas presentaron el mayor contenido de gliadinas y otras tres tuvieron el menor contenido. Sobresale una harina por su alto contenido de albúminas y globulinas. Cinco harinas superaron significativamente al resto de las harinas en PPNET, y otra harina se diferenció del resto por tener el valor más bajo de PPNET. La proteína polimérica en la proteína de la harina (PPH) varió entre 3 y 5.3 %. Cuatro harinas presentaron valores de PPH significativamente superiores al resto de las harinas, y sólo una harina presentó un valor significativamente menor. En la proporción de proteína polimérica no extraíble en la proteína de la harina (PPNEH), dos harinas superaron al resto de las harinas.

Cuadro 1. Matriz de correlación para parámetros de calidad y composición proteínica de las harinas.

r	PPT	Gli	A-G	PPH	PPNET	PPNEH	Fmax	Ext3	W3	Rmax	Ext2	W2	TdMix	Abs	TdFar	Est	ITA	VP	P	L	W
W	0.3	0.3	-0.7**	0.6**	0.2	0.5*	0.6**	0.1	0.8**	0.8**	-0.1	0.7**	0.8**	0.6**	0.2	-0.4	-	0.6**	0.3	0.2	1.0
L	-0.3	0.3	-0.1	0.4	0.5*	0.7**	0.2	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5*	0.4	-0.3*	0.2	-0.2	-	0.5*	-0.8**	1.0	
P	0.6**	-0.3	-0.2	0.1	-0.4	-0.4	0.1	0.1	0.3	-0.0	-0.1	-0.1	0.0	0.6**	-0.3	0.0	-	-0.3	1.0		
VP	0.3	0.0	-0.5**	0.6**	0.1	0.4**	0.3	-0.3*	0.3	0.6**	-0.5**	0.3	0.3	-0.3*	0.7**	0.7**	-0.7**	1.0			
ITA	-0.3	-0.0	0.6**	-0.6**	-0.7**	-0.7**	-0.7**	0.4	-0.7**	-0.6**	-0.2	-0.7**	-0.4*	-0.3	-0.3	-0.8**	1.0				
Est	0.2	-0.2	-0.1	0.2	0.3	0.3*	0.3	-0.4**	0.2	0.3*	-0.3*	0.1	0.1	-0.4**	0.3*	1.0					
TdFar	0.1	0.2	-0.3	0.4**	0.1	0.3*	0.3	-0.3*	0.2	0.6**	-0.6**	0.2	0.2	-0.0*	1.0						
Abs	-0.4**	0.5**	-0.1	0.0	-0.1	-0.0	0.3	-0.1	0.3*	-0.1	0.2	-0.0	-0.3	1.0							
TdMix	0.5**	-0.1	-0.5**	0.2	0.6**	0.6**	0.5**	-0.2	0.4**	0.6**	-0.1	0.6**	1.0								
W2	0.4**	-0.1	-0.6**	0.7**	0.5**	0.7**	0.4**	0.2	0.6**	0.8**	0.3*	1.0									
Ext2	0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.1	0.2	-0.2	0.6**	-0.2	-0.2	1.0										
Rmax	0.4**	-0.0	-0.5**	0.7**	0.4**	0.7**	0.5**	-0.2	0.6**	1.0											
W3	0.1	0.3	-0.5**	0.4*	0.3*	0.4**	0.9**	-0.2	1.0												
Ext3	0.0	-0.0	-0.0	0.1	-0.1	-0.0	-0.6**	1.0													
Fmax	0.1	0.1	-0.4**	0.2	0.4**	0.4**	1.0														
PPNEH	0.6**	-0.2	-0.6**	0.7**	0.9**	1.0															
PPNET	0.5**	-0.3*	-0.4*	0.2	1.0																
PPH	0.5**	-0.0	-0.8**	1.0																	
A-G	-0.4**	-0.2	1.0																		
Gli	-0.8**	1.0																			
PPT	1.0																				

*, ** = significativo a 0.05 y 0.01 de probabilidad respectivamente; PPT = proteína polimérica total; Gli = gliadinas; A-G = albúminas y globulinas; PPH = proporción de proteína polimérica en la harina; PPNET = proporción de proteína polimérica no extraíble en la proteína; PPNEH = proporción de proteína polimérica no extraíble en la harina; Fmax = resistencia máxima en el TA-XT2; Ext3 = extensibilidad en el TA-XT2; W3 = trabajo de deformación en el TA-XT2; Rmax = resistencia máxima en el extensógrafo Brabender; Ext2 = extensibilidad en el extensógrafo Brabender; W2 = trabajo de deformación en el extensógrafo Brabender; TdMix = tiempo de desarrollo del mixógrafo; Abs = absorción de agua del farinógrafo; TdFar = tiempo de desarrollo del farinógrafo; Est = estabilidad del farinógrafo; ITA = índice de tolerancia al amasado; VP = volumen de pan; P = tenacidad; L = extensibilidad del alveógrafo; W = trabajo de deformación del alveógrafo. Los coeficientes son basados en regresión lineal. Coeficientes - = cuando el coeficiente fue menor de 0.05.

Correlaciones entre parámetros de calidad y las fracciones proteínicas

Las relaciones entre los parámetros reológicos, fracciones proteínicas y volumen de pan se muestran en el Cuadro 1. La absorción de agua del farinógrafo (Abs) se correlacionó positivamente ($\alpha = 0.01$) con los parámetros P y W del alveógrafo y con el trabajo de deformación (W3) del analizador de textura TA-XT2 ($\alpha = 0.05$). El TdFar se correlacionó positivamente con la estabilidad de la masa y con el Rmax del extensógrafo, pero mostró una relación negativa con la extensibilidad de la masa medida ya sea con el extensógrafo o con el analizador de textura TA-XT2. Es decir, al incrementar el tiempo de desarrollo del farinógrafo se incrementa también la estabilidad y Rmax, mientras que la extensibilidad disminuye. Además, la estabilidad correlacionó significativamente con Rmax, la extensibilidad medida con el extensógrafo (Ext2) ó con el analizador de textura (Ext3) TA-XT2. En cambio, el ITA mostró una correlación negativa con TdMix y con la resistencia máxima a la extensión, ésta medida con el extensógrafo ó con el analizador de textura TA-XT2, y con el área de la curva del extensógrafo.

En el tiempo de desarrollo del mixógrafo (TdMix) mostró una correlación positiva con Rmax, el trabajo de deformación con el extensógrafo (W2), la resistencia máxima (Fmax) medida con el analizador de textura TA-XT2, el trabajo de deformación con el analizador de textura (W3), y con el W del alveógrafo. Los parámetros medidos con la prueba de fuerza y extensibilidad de la masa a

micro-escala y los otros parámetros evaluados con los otros instrumentos, correlacionaron significativamente.

La fuerza máxima o resistencia máxima del analizador de textura TA-XT2 correlacionó positivamente con Rmax del extensógrafo, el área del extensógrafo, TdMix y W del alveógrafo, y de manera negativa con el ITA del farinógrafo. La fuerza máxima también correlacionó positivamente con el trabajo de deformación y negativamente con la extensibilidad, parámetros medidos con el analizador de textura.

La extensibilidad medida a micro-escala (Ext3) mostró una correlación positiva con la extensibilidad medida en el extensógrafo (Ext2) e inversa con TdFar y con la estabilidad. El trabajo de deformación o área bajo la curva del analizador de textura (W3) TA-XT2 correlacionó positivamente con Rmax, el área bajo la curva del extensógrafo (W2), TdMix, Abs y W del alveógrafo, y en forma negativa con el ITA del farinógrafo. Las correlaciones significativas encontradas entre los distintos parámetros reológicos medidos con los métodos oficiales y con la prueba a micro-escala indican que hay una correspondencia entre las mediciones realizadas con el extensógrafo (método oficial) y las realizadas con el analizador de textura TA-XT2. Por tanto, la prueba de tensión a micro-escala se puede usar para caracterizar harinas de trigo, especialmente en programas de mejoramiento genético donde la cantidad de muestra es limitada.

La resistencia máxima medida con el extensógrafo (Rmax) correlacionó positivamente con PPT, PPH, PPNET, y PPNEH. Ello implica que al aumentar la proteína polimérica en la proteína (PPT) y su proporción en la harina (PPH) y en el extracto no extraíble (PPNET y PPNEH), también aumenta Rmax. Relaciones similares a éstas ya habían sido reportadas por otros autores (MacRitchie, 1992; Gupta *et al.*, 1992, 1993; Weegels *et al.*, 1996; Cuniberti *et al.*, 2003).

El trabajo de deformación del extensógrafo (W2) correlacionó positivamente con PPT, PPH, PPNET y PPNEH, y negativamente con la cantidad de albúminas/globulinas ($r=-0.6^{**}$) y con el ITA del farinógrafo ($r=-0.7^{**}$). La extensibilidad, ya sea la medida con el extensógrafo o con el analizador de textura TA-XT2, no presentó correlación significativa con ninguna fracción proteínica, pero la L del alveógrafo (que indica también extensibilidad) correlacionó positivamente con PPNET ($r=0.5^{*}$) y con PPNEH ($r=0.7^{**}$). Estos resultados evidencian que la medición del parámetro reológico depende del tipo de prueba y del instrumento en que se realice la medición. El principio de operación del alveógrafo es distinto del de los otros dos instrumentos; en el alveógrafo el esfuerzo al que es sometida la masa es aplicado bidireccionalmente (la masa es inflada), mientras que en el extensógrafo y en el analizador de textura TA-XT2 es aplicado unidireccionalmente (la masa es estirada), y a ésta diferencia puede deberse la discrepancia en los resultados de extensibilidad.

Se ha reportado que la extensibilidad y Rmax dependen en diferentes grados, de la composición proteínica; la extensibilidad depende de la cantidad total de glutenina en la harina, mientras que Rmax se relaciona con la proporción de proteínas poliméricas a monoméricas (MacRitchie, 1992). Las gliadinas no mostraron correlación significativa con ninguna de las propiedades reológicas de la masa, lo cual confirma que las proteínas monoméricas no contribuyen a la fuerza de la masa (MacRitchie, 1992). TdMix correlacionó significativamente con PPT, PPNET, PPNEH y con albúminas/globulinas, mientras que el W del alveógrafo lo hizo con PPH, PPNEH y con albúminas/globulinas. La P del alveógrafo sólo correlacionó significativamente con PPT. Estos resultados demuestran que la proteína polimérica juega un papel importante en la determinación de

las propiedades de la masa y confirman lo reportado por otros autores (Bekes *et al.*, 1994a, 1994b).

Se encontraron correlaciones positivas del contenido de proteína con la máxima resistencia tanto en el extensógrafo ($r=0.6^{**}$) como en el analizador de textura TA-XT2 ($r=0.4^{*}$), con el trabajo de deformación de la masa tanto

en el extensógrafo ($r=0.5^{**}$) como en el analizador de textura TA-XT2 ($r=0.4^{*}$), con TdFar ($r=0.4^{**}$), y con el índice L del alveógrafo ($r=0.5^{*}$). El contenido de proteína mostró una relación negativa con el ITA del farinógrafo ($r=-0.5^{**}$).

El volumen de pan correlacionó positivamente y significativamente con Rmax, TdFar, estabilidad del farinógrafo, los índices L y W del alveógrafo, el contenido de proteína ($r=0.4^{*}$) y con las proporciones de PPH y PPNEH, pero en forma negativa con la extensibilidad medida tanto en el extensógrafo o en el analizador de textura, Abs y el ITA del farinógrafo.

Regresión múltiple

Los parámetros del modelo de predicción para el volumen de pan obtenido por regresión lineal se anotan en el Cuadro 2. Después de eliminar las variables que presentaban colinearidad, se corrió el procedimiento por pasos con sólo 15 variables. Las variables seleccionadas en el modelo fueron: PPNET, trabajo de deformación medido con el TA-XT2, contenido de proteína y absorción de agua del mixógrafo, variables que explican 87 % de la variabilidad en el volumen de pan.

Cuadro 2. Parámetros estimados del modelo de predicción para el volumen del pan obtenidos por regresión por pasos.

Variable	GL	Parámetro estimado	Error estándar	T para Ho: Parámetro = 0	Prob > T
Intersección	1	2669.5	321.9	8.29	0.0001
PPNET	1	2.09	0.56	3.74	0.0016
Trabajo deformación con el TA-XT2	1	-0.31	0.14	-2.25	0.0378
Contenido de proteína	1	95.9	9.70	9.89	0.0001
Absorción agua-Mixógrafo	1	-57.7	6.81	-8.47	0.0001

CONCLUSIONES

Las propiedades reológicas de la masa fueron influenciadas en mayor grado por la proteína y en menor grado por las albúminas/globulinas, y por último por las gliadinas. El volumen de pan correlacionó positivamente con la resistencia de la masa a la tensión, el tiempo de desarrollo de la masa, la estabilidad del farinógrafo, los índices de estabilidad y del trabajo de formación estimado por el alveógrafo, trabajo de deformación del extensógrafo y el contenido de proteína, y correlacionó negativamente con la extensibilidad medida tanto en el extensógrafo como en el analizador de textura, absorción del agua y con el índice de tolerancia al amasado del farinógrafo. La prueba de tensión a micro-escala y el análisis de las fracciones proteínicas de las harinas separadas por SE-HPLC son

metodologías apropiadas para programas de mejoramiento genético del trigo, porque complementan las pruebas tradicionalmente utilizadas en estos programas (mixógrafo y contenido de proteína, entre otras), y en conjunto permiten discriminar harinas con poca fuerza de gluten y predecir el potencial de una harina para panificación.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Kansas State University, en particular al Grain Science and Industry Dept., por la oportunidad y el apoyo brindado durante la estancia sabática de uno de los autores de este trabajo; a CONACYT por el apoyo económico (beca) para que este trabajo se realizara; y a Mary Roth por su apoyo técnico.

BIBLIOGRAFÍA

- American Association of Cereal Chemists (1995)** Approved Methods of the AACC, 9th Ed. The Association: St. Paul, MN. Methods 46-30, 54-21, 54-30A, 54-40A, 54-10, and 10-10B.
- Association of Official Analytical Chemists (1990)** Official Methods of Analysis, 15th Ed. The Association: Washington, DC. pp:777-778.
- Batey I L, R B Gupta, F MacRitchie (1991)** Use of size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins: an improved chromatographic procedure. *Cer. Chem.* 68:207-209.
- Bean S R, G L Lookhart (2001)** Factors influencing the characterization of gluten proteins by size-exclusion chromatography and multiangle laser light scattering (SEC-MALLS). *Cer. Chem.* 78:608-618.
- Bean S R, R K Lyne, K A Tilley, O K Chung, G L Lookhart (1998)** A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flours. *Cer. Chem.* 75:374-379.
- Bekes F, O Anderson, P W Gras, R B Gupta, A Tam, C W Wrigley, R Appels (1994a)** The contributions to mixing properties of 1D HMW glutenin subunits in a bacterial system: *In: Improvement of Cereal Quality by Genetic Engineering*. R J Henry, J A Ronalds (eds). Plenum Publishing Corp., USA. pp:97-103.
- Bekes F, P W Grass, R B Gupta, D R Hickman, A Tatham (1994b)** Effects of a high Mr glutenin subunit (1Bx20) on the dough mixing properties of wheat flour. *J. Cer. Sci.* 19:3-7.
- Belitz, H D, R Kieffer, J J Kim, W Seilmeier, H Wieser (1990)** Some factors important for gluten functionality: *In: Interactions of Cereal Components and Their Implications for the Future*. Proc. Of ICC-AACC Symposium. R Lasztity, R C Hoskeny (eds). ICC Vienna. pp:94-109.
- Belton P S (1999)** On the elasticity of wheat gluten. *J. Cer. Sci.* 29:103-107.
- Bietz J A (1984)** Analysis of wheat gluten proteins by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 255:219-238.
- Bietz J A, J S Wall (1980)** Identity of high molecular weight gliadin and ethanol soluble glutenin subunits of wheats: relation to gluten structure. *Cer. Chem.* 57:415-421.
- Bloksma A H, W Bushuk (1988)** Rheology and chemistry of dough: *In: Wheat Chemistry and Technology*. Y Pomeranz (ed). Am. Assoc. Cer. Chem. St. Paul, MN. pp:131-218.
- Chakraborty K, K Khan (1988)** Biochemical and breadmaking properties of wheat protein components. I. Compositional differences revealed through quantitation and polyacrylamide gel electrophoresis of protein fractions from various isolation procedures. *Cer. Chem.* 65:333-340.
- Cuniberti M B, M R Roth, F MacRitchie (2003)** Protein composition-functionality relationships of a set of Argentinean wheats. *Cer. Chem.* 80:132-134.
- Finney K F, M D Shogren (1972)** A ten-gram mixograph for determining and predicting functional properties of wheat flours. *Baker's Digest* 46:32-35, 38-42, 77.
- Gupta R B, I L Batey, F MacRitchie (1992)** Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cer. Chem.* 69:125-131.
- Gupta R B, K Khan, F MacRitchie (1993)** Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *J. Cer. Sci.* 18:23-41.
- Hazelton J L, O K Chung, J J Eastman, C E Lang, P J McCluskey, R A Miller, M A Shipman, C E Walker (1997)** Regression equation for predicting absorption for 2-g direct drive mixograph. *Cer. Chem.* 74:400-402.
- Kieffer R, H Wieser, M H Henderson, A Graveland (1998)** Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. *J. Cer. Sci.* 27:53-60.
- Lookhart G L, M L Martin, E Mosleth, A K Uhlen, R C Hoskeny (1993)** Comparison of high-molecular-weight subunits of glutenin and baking performance of flours varying in bread-making quality. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie* 26:301-306.
- MacRitchie F (1992)** Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. *In: Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 36. J E Kinsella (ed.) Academic Press, Inc. NY. pp:1-87.
- Pomeranz Y (1987)** Modern Cereal Science and Technology. VCH Publishers. New York. 486 p.
- SAS Institute Inc. (1990)** SAS User's Guide: Statistics 6.04 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Serna-Saldívar S R O (1996)** Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. AGT Editor, S.A. México, D.F. 521 p.
- Shewry P R, N G Halford, A S Tatham (1992)** High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cer. Sci.* 15:105-120.
- Shewry P R, A S Tatham, J Forde, H Kreis, B J Mifflin (1986)** The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *J. Cer. Sci.* 4:97-106.
- Singh N K, G R Donovan, I L Batey, F MacRitchie (1990a)** Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cer. Chem.* 67:150-161.
- Singh N K, R Donovan, F MacRitchie (1990b)** Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. II. Relative quantity of glutenin as a measure of breadmaking quality. *Cer. Chem.* 67:161-169.
- Vasil I K, S Bean, J Zhao, P McCluskey, G Lookhart, H Zhao, F Altpeter, M Vasil (2001)** Evaluation of baking properties and gluten protein composition of field grown transgenic wheat lines expressing high molecular weight glutenin gene 1Ax1. *J. Plant Physiol.* 158:521-528.
- Wahlund K G, M Gustavsson, F MacRitchie, T Nylander, L Wannerberger (1996)** Size characterization of wheat proteins, particularly glutenin, by asymmetrical flow field-flow fractionation. *J. Cer. Sci.* 2:113-119.
- Walker C E, J L Hazelton, M D Shogren (1997)** The Mixograph Handbook. National Manufacturing Division, TCMCO, Lincoln, NE. 139 p.
- Weegels P L, A M van de Pijpekamp, A Graveland, R J Hamer, J D Schofield (1996)** Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *J. Cer. Sci.* 23:103-111.
- Weiser H, S Antes, W Seilmeier (1998)** Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cer. Chem.* 75:644-650.