

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Trabajo de Tesis Doctoral

**ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENTES ADITIVOS
SOBRE LA CALIDAD Y LA CONSERVACIÓN DE
PANES LIBRES DE GLUTEN**

Lorena S. Sciarini

Directora: Gabriela T. Pérez

Co-director: Alberto E. León

-Año 2011-

Sciarini, Lorena Susana

Estudio del efecto de diferentes aditivos sobre la calidad y la conservación de panes libres de gluten. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.
E-Book.

ISBN 978-950-34-0802-5

1. Alimentación. 2. Gluten. 3. Tesis de doctorado. I. Título
CDD 664.4

Fecha de catalogación: 16/11/2011

AGRADECIMIENTOS

Aun luego de cinco años de ardua labor, no consigo concebir este trabajo como un logro personal. Muchas personas participaron en él, ya sea desde lo académico y profesional, ya sea desde lo personal. Todos, en mayor o menor medida, directa o indirectamente, participaron en esta tesis y, fundamentalmente, en mi formación profesional y personal. Para todos ellos, mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Gabriela Pérez, por haberme dirigido en este trabajo y, especialmente, por haberme apoyado incondicionalmente a lo largo de tantos años. Por su paciencia y tolerancia aun ante las diferencias.

Al Dr. Alberto León, por su codirección, su excelente predisposición y por su presencia en los momentos más difíciles.

Al Dr. Pablo Ribotta, por su presencia y colaboración desinteresada. Por su aporte invaluable a este trabajo y a mi formación académica. Por sus consejos e incondicionalidad.

A la Dra. Marie de Lamballerie, por haberme dirigido en este trabajo durante 10 meses. Por haberme abierto las puertas a una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida. Por haberse preocupado por mi bienestar tan lejos de casa.

A la Dra. Cristina Ferrero, por su impecable acompañamiento como Asesora. Por su excelente predisposición y diligencia. Por su ayuda incondicional siempre que fue necesario.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por el apoyo financiero que permitió la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, por brindarme la posibilidad de desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

A mis compañeros de trabajo, porque trabajar junto a ellos fue la mejor parte de esta tesis. Por darme la tranquilidad de tener un gran respaldo; por amenizar los momentos difíciles. Gracias a Cristina, Paola, Eugenia, Malena, Gabriela y Mariela por su amistad y enorme ayuda, siempre desinteresada. Por su paciencia, y por escucharme siempre que lo necesité. Gracias a Andrés por su tolerancia y presencia, y por sus aportes cada vez que lo requerí. Gracias a Alicia por mostrarme un estilo de vida basado en el buen humor!

A Sandra, por su amistad, compañerismo y rectitud. Por su inmensa paciencia, y su gran apoyo cuando todo resultaba diferente y difícil. Porque, a pesar de la distancia, decidió seguir presente. Gracias a Clémence y Sylvie, por su apoyo y ayuda desinteresada.

Mi más sentido agradecimiento a mis padres, Ernesto y Susana, cuya presencia, apoyo, paciencia y comprensión no pueden agradecerse con palabras. Por tomar y valorar como propio cada logro mío; por sus invaluable consejos cuando las decisiones no eran tan claras, por haberlas respetado siempre, por contrariados que se sintieran.

A mis hermanas, Paula y Natalia, por su incondicionalidad, siempre. Por ser dueñas de mi entera confianza, por ser mis más cercanas confidentes. Por su apoyo constante e incansable. Porque bastó una palabra, una sonrisa, para disipar cualquier duda en los momentos en que los obstáculos parecían infranqueables. Gracias a Sebastián, por su presencia e interés en mi trabajo.

A mi sobrino Andrés, por su compañía durante toda mi tesis, por su alegría contagiosa y por entender la importancia que este logro tenía para mí. A mi sobrina Guillermina, porque en sus escasos meses de vida ha alegrado todo su entorno.

A la Lic. Lorena Cuestas, por su invaluable apoyo en el ámbito personal y profesional.

A mis amigos, por estar siempre predispuestos a ayudar y escuchar. Por toda la alegría y diversión que me aportaron en estos años!

ÍNDICE

Introducción.....	5
1. Enfermedad celíaca.....	6
1.1. Generalidades	6
1.2. Etiología.....	7
1.2.1. Factores inmunológicos.....	7
Sistema inmune.....	7
Complejo mayor de histocompatibilidad	8
Células del sistema inmune.....	9
Respuesta inmune.....	12
1.2.2. Factores genéticos.....	13
Aporte de la transglutaminasa tisular a la unión péptido-DQ2/DQ8.....	14
1.2.3. Factores ambientales	16
1.3. Epidemiología	17
1.4. Alimentos libres de gluten.....	18
2. Pan.....	18
2.1. Panificación	19
2.2. Pan libre de gluten.....	20
2.3. Harinas libres de gluten	22
2.4. Componentes de las harinas	23
2.4.1. Almidón.....	23
2.4.2. Proteínas.....	27
2.4.3. Polisacáridos no almidonosos.....	32
2.4.4. Lípidos.....	33
2.5. Aditivos	34
2.5.1. Hidrocoloides	34
2.5.2. Proteínas.....	37
2.5.3. Emulsionantes	37
2.5.4. Enzimas.....	39
Objetivo general	42
Objetivos específicos	42
Materiales y Métodos.....	43
1. Materiales	44
2. Métodos.....	44
2.1. Composición centesimal de las harinas.....	44
2.2. Elaboración del pan.....	45
2.2.1. Formulación base.....	45
2.2.2. Ensayos de Panificación	46
2.3. Evaluación de la calidad del pan.....	47
2.3.1. Volumen específico	47
2.3.2. Estructura de la miga.....	48

2.3.3. Textura de la miga.....	50
2.3.4. Color de la corteza.....	51
2.4. Propiedades de las masas/batidos.....	52
2.4.1. Resistencia de los batidos a la extrusión.....	52
2.4.2. Resistencia de las masas a la penetración	53
2.4.3. Reología.....	54
2.4.4. Seguimiento de la fermentación de las masas con bajo contenido de agua	57
2.4.5. Caracterización de la fracción proteica de las masas	58
2.4.6. Caracterización del almidón	59
Calorimetría diferencial de barrido.....	59
Propiedades de <i>pasting</i>	60
2.4.7. Agua congelable	62
2.5. Caracterización del sistema almidón/harina de soja	62
2.5.1. Capacidad de absorción de agua.....	62
2.5.2. Sinéresis.....	63
2.5.3. Reología.....	63
2.5.4. Extracción de proteínas	64
2.5.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión molecular.....	64
2.5.6. Calorimetría diferencial de barrido.....	64
2.5.7. Difracción de rayos X	65
2.5.8. Propiedades de <i>pasting</i>	66
2.5.9. Microscopía confocal de barrido	67
2.6. Análisis estadístico.....	67
Resultados y Discusión.....	68
Primera Sección	
<i>Propiedades de los batidos y calidad de los panes libres de gluten con alto contenido de agua</i>	69
Capítulo 1	
Influencia de diferentes materias primas sobre las propiedades de los batidos y la calidad de panes libres de gluten.....	70
1. Composición centesimal de las harinas.....	72
2. Formulaciones	72
3. Propiedades de los batidos.....	73
3.1. Calorimetría diferencial de barrido	73
3.1.1. Agua congelable.....	73
3.1.2. Gelatinización	75
3.2. Propiedades de <i>pasting</i>	78
3.3. Resistencia de los batidos a la extrusión.....	80
4. Evaluación tecnológica de los panes	81

Capítulo 2

Efecto de la incorporación de diferentes aditivos sobre las propiedades de los batidos y la calidad de panes libres de gluten	87
1. Formulación.....	90
2. Hidrocoloides.....	91
2.1. Efecto de hidrocoloides sobre las propiedades de los batidos	91
2.2. Efecto de hidrocoloides sobre la calidad del pan	95
3. Proteínas	100
3.1. Efecto de la incorporación de proteínas sobre las propiedades del batido.....	100
3.2. Efecto de la incorporación de proteínas sobre la calidad del pan.....	101
4. Emulsionantes	103
4.1. Efecto de la incorporación de emulsionantes sobre las propiedades de los batidos	103
4.2. Efecto de la incorporación de emulsionantes sobre la calidad del pan.....	104
5. Enzimas	106
5.1. Efecto de la incorporación de enzimas sobre las propiedades de los batidos...	106
5.2. Efecto de la incorporación de enzimas sobre la calidad del pan.....	107

Segunda Sección

<i>Propiedades de las masas y calidad de los panes libres de gluten con bajo contenido de agua.....</i>	111
---	-----

Capítulo 3

Estudio del sistema almidón-harina de soja.....	114
1. Composición centesimal de las materias primas empleadas	115
2. Efecto de la harina de soja sobre la interacción de los almidones con el agua	115
3. Calorimetría diferencial de barrido	117
3.1. Gelatinización	118
3.2. Retrogradación.....	119
4. Propiedades de <i>pasting</i>	121
5. Difractometría de Rayos X.....	124
7. Cromatografía líquida de alto rendimiento.....	129
8. Microscopía láser confocal de barrido	132

Capítulo 4

Efecto de la incorporación de diferentes aditivos sobre las propiedades de la masa y la calidad de panes libres de gluten	135
1. Formulación.....	136
2. Composición centesimal de las harinas y/o almidones	136
3. Hidrocoloides.....	137
3.1. Efecto del agregado de hidrocoloides sobre las propiedades de la masa.....	137
3.2. Efecto del agregado de hidrocoloides sobre la calidad del pan	144
4. Proteínas	149
4.1. Efecto del agregado de proteínas sobre las propiedades de la masa.....	149

4.2. Efecto del agregado de proteínas sobre la calidad del pan.....	153
5. Emulsionantes	156
5.1. Efecto del agregado de emulsionantes sobre las propiedades de la masa.....	156
5.2. Efecto del agregado de emulsionantes sobre la calidad del pan.....	161
6. Enzimas	163
6.1. Efecto del agregado de enzimas sobre las propiedades de la masa.....	163
6.2. Efecto del agregado de enzimas sobre la calidad del pan.....	169
7. Análisis de correlación entre los parámetros.....	172
Conclusiones Generales	176
Perspectivas Futuras	179
Bibliografía.....	181

Introducción

1. Enfermedad celíaca

1.1. Generalidades

La enfermedad celíaca (EC), o celiacía, es una enteropatía que se caracteriza por la inflamación crónica del intestino delgado debido a una intolerancia a ciertas proteínas presentes en algunos cereales, particularmente a las prolaminas del trigo (gliadinas), cebada (hordeínas), centeno (secalinas) y especies híbridas como el triticale, y, en algunos casos, de la avena (aveninas).

La inflamación permanente de la mucosa intestinal conlleva al aplanamiento de las vellosidades, que deriva en la mala absorción de nutrientes (Figura I.1). Los síntomas más típicos de la enfermedad incluyen diarrea, pérdida de peso, estrés, vómitos, anemia y dolor abdominal. El único tratamiento que existe en la actualidad es el apego a una dieta libre de gluten de por vida. Si esta dieta no se lleva a cabo adecuadamente pueden desencadenarse complicaciones como osteoporosis, desarrollo de linfomas intestinales, o pueden presentarse problemas en el crecimiento y en la fertilidad de los pacientes.

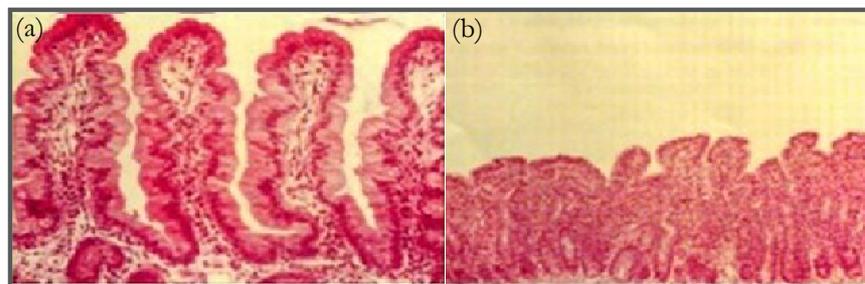


Figura I.1. Vellosidades intestinales. a) paciente normal; b) paciente celíaco.

La EC se encuentra entre las enfermedades alimentarias más frecuentes, con una prevalencia de hasta el 1% en algunas regiones geográficas. Es una enfermedad clínicamente difícil de diagnosticar debido a la variedad de cuadros sintomáticos que pueden presentarse. Sólo 1 de cada 12 pacientes presenta la sintomatología clásica, 3 presentan sintomatología atípica, mientras que los 8 restantes no muestran síntomas clínicos, aunque sí lesiones intestinales (Gómez y col., 2001). Por este motivo, el método de diagnóstico más conveniente es la realización de una biopsia intestinal.

1.2. Etiología

La intolerancia al gluten se debe a una respuesta inadecuada del sistema inmune ante la exposición a las prolaminas, en individuos genéticamente susceptibles. La etiología es multifactorial, con interrelaciones complejas de factores genéticos, inmunológicos y ambientales.

1.2.1. Factores inmunológicos

A fin de comprender las bases de la EC, es necesario conocer los mecanismos inmunológicos que subyacen a la misma. A tal fin, se expondrán sintéticamente algunos conceptos referentes al sistema inmunológico.

Sistema inmune

El sistema inmune se divide en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa inmunológica y se caracteriza por poseer mecanismos efectores, como fagocitos, complemento y péptidos antimicrobianos, que se activan en forma rápida y vigorosa frente a la presencia de un antígeno. Por su parte, la inmunidad adaptativa gira alrededor de los linfocitos T y B, que poseen receptores altamente específicos y variados que se unen a los antígenos y disparan la activación y proliferación celular en un proceso conocido como *expansión clonal*. La expansión clonal de los linfocitos es necesaria para generar una respuesta inmunitaria eficiente, pero es lenta, tomando entre 3 a 5 días para generar linfocitos efectores. Por esta razón, la inmunidad innata es fundamental para controlar la mayoría de las infecciones o agresiones cutáneas y para disparar la inmunidad adaptativa (Medzhitov y Janeway, 2000; Janeway, 2001).

La diferencia principal entre la inmunidad innata y la adaptativa reside en los mecanismos y los receptores utilizados para el reconocimiento inmunitario (Janeway, 2001). En el sistema inmunológico adaptativo, los receptores de los linfocitos T (TCR) y B (BCR) son generados durante el desarrollo celular, dotando a cada célula con un receptor estructuralmente único, aunque no están predestinados a reconocer un antígeno en particular. El diverso repertorio de BCR y TCR se genera en forma

aleatoria, y aquellos linfocitos portadores de receptores, al encontrarse con sus antígenos específicos son seleccionados para la expansión clonal.

En contraste, en la inmunidad innata la especificidad de cada receptor está determinada genéticamente. Por selección natural, estos receptores evolucionaron para reconocer microorganismos infecciosos. Así, la inmunidad innata reconoce estructuras altamente conservadas en los microorganismos.

Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

El complejo mayor de histocompatibilidad es la región del genoma que codifica para las moléculas de membrana que intervienen en la presentación de antígenos a los linfocitos T. En los humanos, esta región recibe el nombre de HLA (antígeno leucocitario humano) y se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 (Figura I.2). Las moléculas del MHC que presentan antígenos se dividen en dos clases principales: MHC clase I y MHC clase II (Tabla I.1).

Las moléculas MHC clase I se encuentran presentes en la superficie de todas las células nucleadas. Están constituidas por una cadena polipeptídica pesada de 44 kDa, unida de manera no covalente a un polipéptido más pequeño de 12 kDa (β -microglobulina) (Figura I.3). La cadena pesada está organizada en tres dominios globulares (α_1 , α_2 y α_3) y está codificada por los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C.

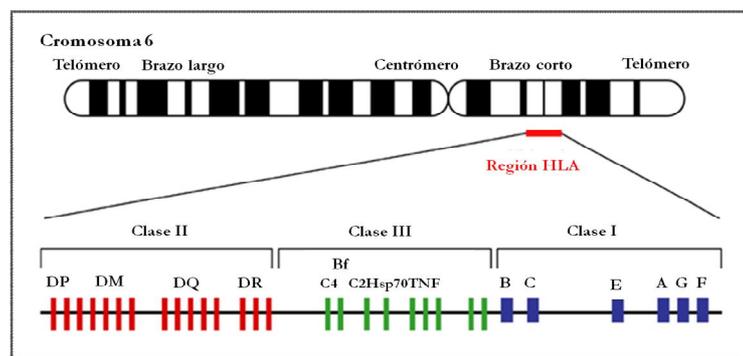


Figura I.2. Distribución de los genes HLA en el cromosoma 6 de humanos.

Las moléculas MHC clase II normalmente están presentes sólo en las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) y también en los linfocitos T. Son proteínas de membrana, en este caso constituidas por cadenas α y β de 34 y 29 kDa,

respectivamente (Figura I.3). Ambas cadenas están codificadas por los genes HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR.

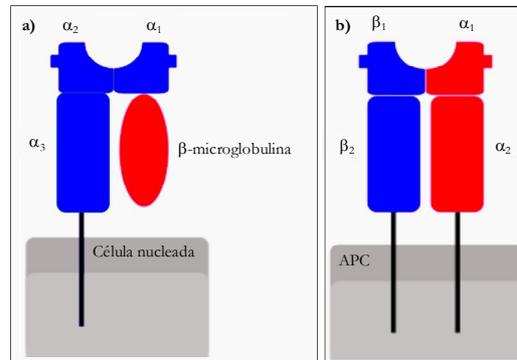


Figura I.3. a) Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I; b) Moléculas del MHC tipo II.

El grupo de genes MHC también incluye los genes del MHC clase III, que codifican para numerosas moléculas importantes durante la inflamación. Incluyen ciertas moléculas del complemento -C2, C4 y factor B-, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), linfotoxina α y linfotoxina β .

Tabla I.1. Principales diferencias entre el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y tipo II.

	MHC I	MHC II
Loci genéticos	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR y otras
Estructura de la cadena	Cadena α + β -microglobulina	Cadena α + cadena β
Distribución celular	Mayoría de células nucleadas	APC, Linfocitos B y T
Presentan antígeno a	Linfocitos Tc	Linfocitos Th
Origen del antígeno	Proteínas producidas en citosol	Proteínas extracelulares y endocitadas

Células del sistema inmune

❖ Las **células presentadoras de antígeno profesionales** (APC) tienen como función captar, procesar y presentar moléculas antigénicas asociadas a moléculas MHC II sobre sus membranas, para que sean reconocidas por los linfocitos T. Existen numerosas APC, entre ellas: **células dendríticas**, que poseen características prolongaciones citoplasmáticas repletas de receptores antigénicos. Se encuentran en

los órganos linfáticos, en el epitelio de la piel y la mucosa del sistema digestivo y respiratorio; **macrófagos**, principalmente presentan antígenos procesados de bacterias y parásitos, ya que son células fagocíticas por excelencia; **Linfocitos B** (LB), que reconocen antígenos por medio del receptor BCR. Fagocitan el complejo antígeno-BCR, lo procesan y presentan el péptido antigénico a linfocitos T cooperadores por medio del MHC II; **toda célula del organismo** puede presentar antígenos a los linfocitos T citotóxicos, ya que, como se expuso anteriormente, todas las células nucleadas del cuerpo presentan en su superficie las moléculas MHC I.

❖ Los **linfocitos T** (LT) son los responsables de coordinar la respuesta inmune celular, constituyendo el 70% del total de los linfocitos que segregan citocinas. También se ocupan de realizar la cooperación para desarrollar todas las formas de respuestas inmunes, como la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Los LT de un individuo presentan una propiedad denominada *restricción MHC*, es decir, sólo pueden detectar un antígeno si éste es presentado por una molécula del MHC. Esto se debe a que cada linfocito T tiene una especificidad dual: el receptor del linfocito T (TCR) reconoce algunos residuos del péptido antigénico y, simultáneamente, algunos residuos de la molécula MHC que lo presenta.

Se han descrito varios subtipos de LT, cada uno de ellos con una función definida: **LT citotóxicos** (LTc), se caracterizan por poseer, además de los receptores característicos de los LT, el receptor de membrana CD8 (Figura I.4), y reconocen células somáticas infectadas o tumorosas, que se convierten en la célula blanco, siempre que presenten un péptido expuesto en su superficie unida a una molécula de MHC I. La unión del TCR y el CD8 al complejo péptido-MHC I induce la muerte celular de la célula blanco; **LT cooperadores** (LTh), se caracterizan por la presencia del receptor de membrana CD4 (Figura I.4), y reconocen, por medio de los receptores TCR y CD4, al complejo antígeno-MHC II, presentado por una célula presentadora de antígeno profesional (APC). La unión del TCR y el receptor CD4 al complejo antígeno-MHC II activa al linfocito Th, que proporcionará la ayuda (por ejemplo, por medio de la secreción de citocinas) necesaria para la expresión de la función efectora

de otras células del sistema inmune que darán lugar a la respuesta correspondiente. Las **células T asesinas naturales** (NK), son un tipo especial de linfocito, situados entre la respuesta inmune adaptativa y la innata. Las células NK provienen del mismo precursor hematopoyético que el resto de los linfocitos T, pero no expresan el TCR. Poseen el receptor de membrana Fas-L, capaz de reconocer moléculas Fas (relacionadas con la apoptosis) en la superficie de células blanco. Además, las células NK reaccionan ante la ausencia de MHC I en la célula blanco, ya que esto puede significar que la célula esté infectada o que se trate de una célula tumoral. Los **LT TCR $\gamma\delta^+$** , son un pequeño grupo de LT que poseen un TCR particular en su superficie. La mayor parte de los linfocitos tienen un TCR compuesto por dos cadenas glucoproteicas, α y β . Sin embargo, en las células $\gamma\delta^+$, el TCR está formado por una cadena γ y una cadena δ . Este grupo de linfocitos es muy poco frecuente (5% del total de LT que expresan TCR), pero son abundantes en la mucosa del intestino, formando parte de una población de linfocitos denominada linfocitos intraepiteliales (IEL). Se desconocen los antígenos que activan a estos linfocitos. Sin embargo, los linfocitos $\gamma\delta^+$ no presentan restricción MHC, y parece que reconocen proteínas completas en lugar de péptidos.

❖ Los **Linfocitos B** (LB) adquieren, durante su desarrollo, los receptores específicos de membrana para antígenos -BCR- (Figura I.4). Cuando un LB reconoce, procesa y presenta un antígeno al LTh correspondiente, en el marco de las moléculas MHC II, éste secreta citocinas que activan al LB, condición bajo la cual se produce la proliferación y diferenciación del LB en células plasmáticas, secretoras de anticuerpos contra el antígeno que lleva en su superficie.

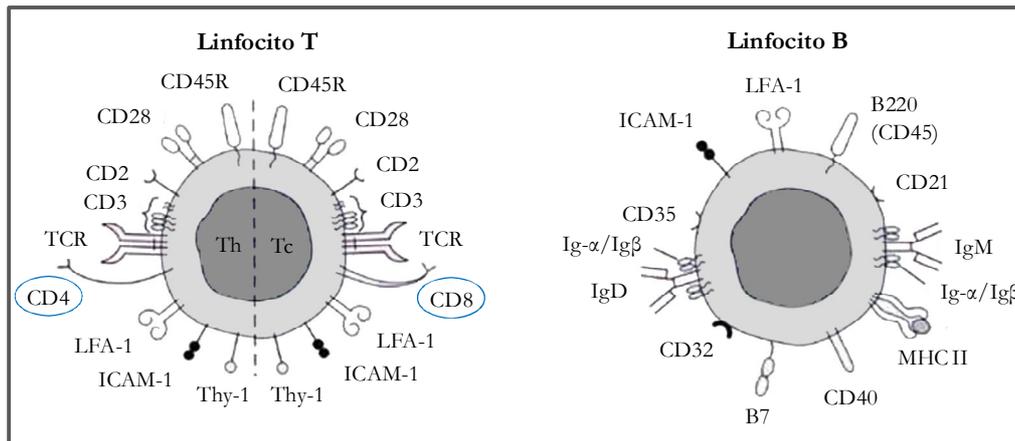


Figura I.4. Esquema de los receptores de membrana de los linfocitos T (Th y Tc) y linfocitos B. Los círculos azules muestran los marcadores de membrana específicos de los linfocitos T colaboradores (Th) y citotóxicos (Tc).

Respuesta inmune

El reconocimiento de los antígenos se realiza a través de diversos receptores de membrana presentes en las APC. Una vez que el antígeno se encuentra dentro de la célula -en los endosomas-, se induce la síntesis de las moléculas del MHC II que formarán un complejo con los péptidos resultantes del procesamiento del antígeno. Este complejo será luego expuesto en la membrana plasmática de la APC para ser presentados a los linfocitos Th (Figura I.5). La activación del linfocito se realiza mediante la unión del TCR y la molécula CD4 al complejo antígeno-MHC II. Esta estrecha relación linfocito Th-APC da la señal necesaria para estimular al linfocito. Inmediatamente después que el linfocito es activado, comienza a secretar la interleucina 2 (IL-2) y la síntesis de su receptor correspondiente (IL-2R). La IL-2 tiene un efecto tanto autócrino como parácrino; es un poderoso mitógeno, por lo que la unión de la IL-2 al IL-2R induce la proliferación de los linfocitos Th activados. Así, comenzará la secreción de interleucinas que activarán la respuesta correspondiente, por ejemplo, la producción y liberación de anticuerpos por parte de los LB.

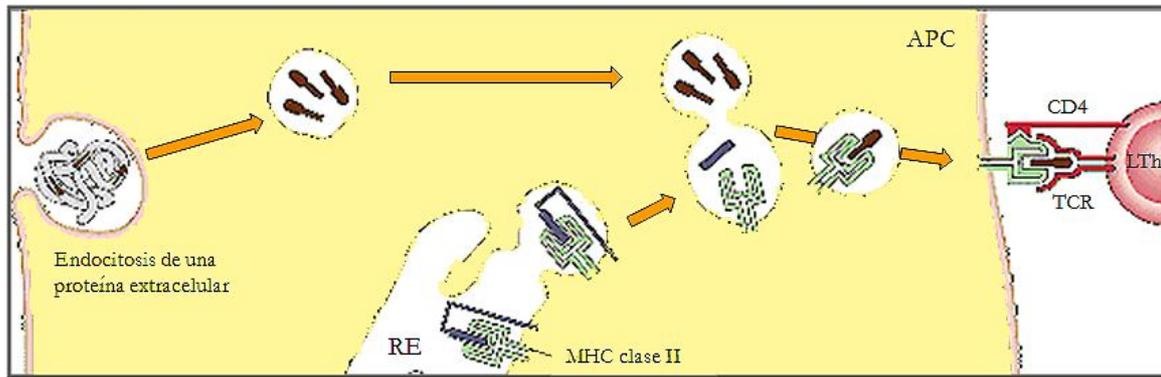


Figura I.5. Esquema simplificado de la estimulación de un LTh por parte de una célula presentadora de antígenos (APC). La proteína será fagocitada y procesada por la APC. En este momento comenzará la síntesis en el retículo endoplásmico (RE) de las moléculas MHC II, que formarán el complejo antígeno-MHCII que se expondrá en la superficie de la APC. Este complejo será presentado a los linfocitos Th, disparando la respuesta inmune.

1.2.2. Factores genéticos

Un alto porcentaje (95%) de los enfermos celíacos lleva en su dotación génica los alelos DQA1*0501/DQB1*0201, que codifican, respectivamente, para las cadenas α y β del heterodímero HLA-DQ2 del MHC II; el otro 5% porta los genes DQA1*0301/DQB1*0302, codificando, respectivamente, las cadenas α y β del heterodímero HLA-DQ8. Cabe destacar que el porcentaje de estos genes en la población general es de sólo un 40%. Las moléculas DQ2 y DQ8 confieren susceptibilidad a la celiaquía porque tienen la capacidad de presentar los péptidos relacionados con la enfermedad (derivados de las prolaminas) a los LT en el intestino delgado (Lundin y col., 1993; Lundin y col., 1994). Los motivos estructurales de DQ2 y DQ8 predicen una preferencia hacia los péptidos con carga negativa en las posiciones de anclaje a los sitios de unión del heterodímero. Sin embargo, las proteínas de gluten, por lo general, contienen escasos residuos con carga negativa. Esta paradoja fue resuelta cuando se observó que los LT derivados de las lesiones intestinales reconocían predominantemente a los péptidos de gluten deaminados, y que esta deaminación era mediada por la enzima transglutaminasa tisular (TG2) (Molberg y col., 1998; van de Wal y col., 1998).

Se ha demostrado un efecto de dosis de gen (monocigosis), ya que se ha relacionado con la cantidad de moléculas DQ2 o DQ8 capaces de presentar péptidos de gliadina a los linfocitos T.

Aporte de la transglutaminasa tisular a la unión péptido-DQ2/DQ8

Las transglutaminasas (EC 2.3.2.13) forman una familia de enzimas que estabilizan los ensamblajes proteicos a través de entrecruzamientos entre residuos de γ -glutamina y ϵ -lisina (Folk y Finlayson, 1977; Lorand y Conrad, 1984). Son responsables de la modificación pos-transcripcional de las proteínas. Se trata de una aciltransferasa que cataliza dos tipos de reacciones diferentes. Como ya se mencionó, una de ellas es la transaminación, que es la formación de la unión isopeptídica entre residuos de lisina y glutamina (Seguro y col., 1996). En ausencia de aminas primarias ocurre la deaminación, donde el agua actúa como aceptora de grupos acilo, y la glutamina es entonces deaminada y transformada en ácido glutámico (Figura I.6).

Estas reacciones ocurren en forma simultánea; sin embargo, a pH 7,3 la reacción de transaminación ocurre a mayor velocidad. Una pequeña disminución del pH disminuye esta velocidad favoreciéndose la reacción de deaminación, que da origen a ácido glutámico, cargado negativamente; esto favorece la unión del péptido a las moléculas del MHC II (HLA-DQ2 o HLA-DQ8).

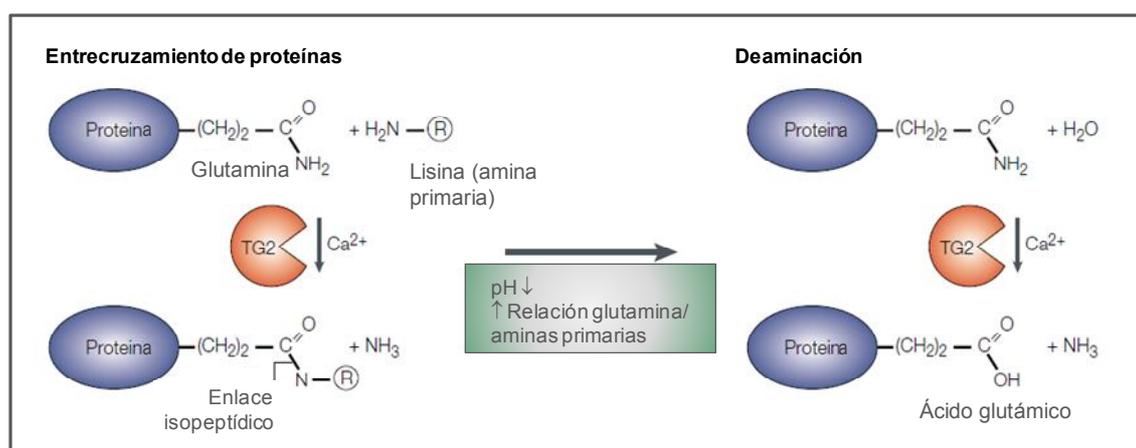


Figura I.6. Acción catalítica de la transglutaminasa. La TG2 cataliza la transaminación (entrecruzamiento) o la deaminación de residuos específicos de glutamina en proteínas o polipéptidos. El grado de ocurrencia de la deaminación comparado con la transaminación aumenta cuando desciende el pH y cuando aumenta la concentración de glutaminas en relación a las poliaminas. (Adaptado a partir de Sollid, 2002).

La transglutaminasa tisular (TG2) se expresa en casi todos los tipos celulares, y se encuentra mayormente en forma intracelular (inactiva), liberándose su forma activa para contribuir a la estabilidad de la matriz celular. Su liberación se ve incrementada en procesos inflamatorios o de estrés mecánico. También está involucrada en la maduración del factor transformador del crecimiento- β (TGF- β), que es un regulador de la proliferación y diferenciación celular.

El reconocimiento de auto-antígenos por parte de los linfocitos T es un evento crucial en la autoinmunidad. La TG2 ha sido identificada como el principal auto-antígeno en la EC (Dieterich y col. 1997); sin embargo, ésta se torna antigénica sólo luego de interactuar con las prolaminas en la lámina propia. Los auto-anticuerpos de los pacientes celíacos están dirigidos principalmente a la TG2 extracelular (activa) (Dieterich y col., 1997), aunque también se encuentran anticuerpos anti-calreticulina y anti-actina (Clemente y col., 2000; Sánchez y col., 2000). Los anticuerpos contra la TG2 son IgA e IgG. Se ha demostrado que estos anticuerpos poseen un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la TG2 (Espósito y col., 2002; Dieterich y col., 2003), lo que toma relevancia a la hora de evaluar la formación de las lesiones en los pacientes celíacos. Como ya se expuso, entre las funciones de la TG2 se encuentra la activación del TGF- β . La inhibición indirecta de la activación de este factor puede tener efectos como la desregulación de los enterocitos. La TG2 está involucrada, además, en la movilidad de los fibroblastos y los monocitos mediante interacciones con las integrinas y la fibronectina (Akimov y Belkin, 2001). Así, se ha publicado que la atrofia de las vellosidades intestinales en los celíacos puede deberse a los anticuerpos anti-TG2, que impiden la migración de los fibroblastos y células epiteliales desde el extremo distal hacia el proximal de las vellosidades (Halttunen y Mäki, 1999).

1.2.3. Factores ambientales

❖ **Gluten: prolaminas**

El gluten es la fracción proteica de reserva del endosperma de la mayoría de los cereales. Son las proteínas insolubles en agua, y está constituido por prolaminas y gluteninas en una proporción aproximada de 1:1. Las prolaminas constituyen la fracción soluble en alcohol; y poseen ciertas características que contribuyen a sus propiedades inmunogénicas. Son ricas en prolina y glutamina; debido al alto contenido en prolina, el gluten es resistente en gran parte a la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal, ya que las enzimas gástricas y pancreáticas no poseen capacidad proteolítica pos-prolina.

Las porciones del gluten que son resistentes a la degradación enzimática son transportadas a través de la barrera epitelial como polipéptidos. Esos péptidos son deaminados por la TG2. En la lámina propia, los LT CD4⁺ (Th) reconocen principalmente a los péptidos deaminados presentados por las moléculas HLA-DQ2 o -DQ8 en la superficie de las APC. Además, en el epitelio hay una infiltración de LT CD8⁺ que expresan el receptor NK. En la lámina propia hay LB específicos para TG2 (Figura I.7a).

El gluten puede inducir la expresión de moléculas NK en los linfocitos intraepiteliales (IEL) normales y moléculas de estrés (MIC) en las células del epitelio intestinal, mediante la estimulación de la secreción de IL-15 (Figura I.7b). No se conoce exactamente el mecanismo por el cual se incrementa la secreción de la IL-15 en los pacientes celíacos. Los IEL con sobre-regulación de receptores NK reconocen a los enterocitos que expresan moléculas MIC, disparándose la citotoxicidad contra éstos.

Las moléculas HLA-DQ2 y -DQ8 tienen preferencia por los aminoácidos cargados negativamente, por lo que se unen con mayor afinidad a los péptidos del gluten deaminados por la TG2 (Figura I.7c). En la Figura I.7d se presenta un modelo propuesto (Sollid y Jabri, 2005) de cómo los LT específicos para gluten controlan la formación de anticuerpos anti-TG2. Esto podría ocurrir en la lámina propia o en los nódulos linfáticos mesentéricos. Durante la reacción de deaminación, se forma un

complejo enzima-sustrato (TG2-gliadina) que sería estable gracias a la formación de enlaces tioéster. Este complejo se uniría a la inmunoglobulina de los LB específicos para TG2, y serían endocitados, y los péptidos de gliadina serían luego expuestos en la membrana en el marco de las moléculas DQ2 y DQ8. A partir de aquí, los péptidos así presentados pueden ser reconocidos por LT específicos para gluten, proveyendo al LB de la ayuda necesaria para la producción de anticuerpos anti-TG2.

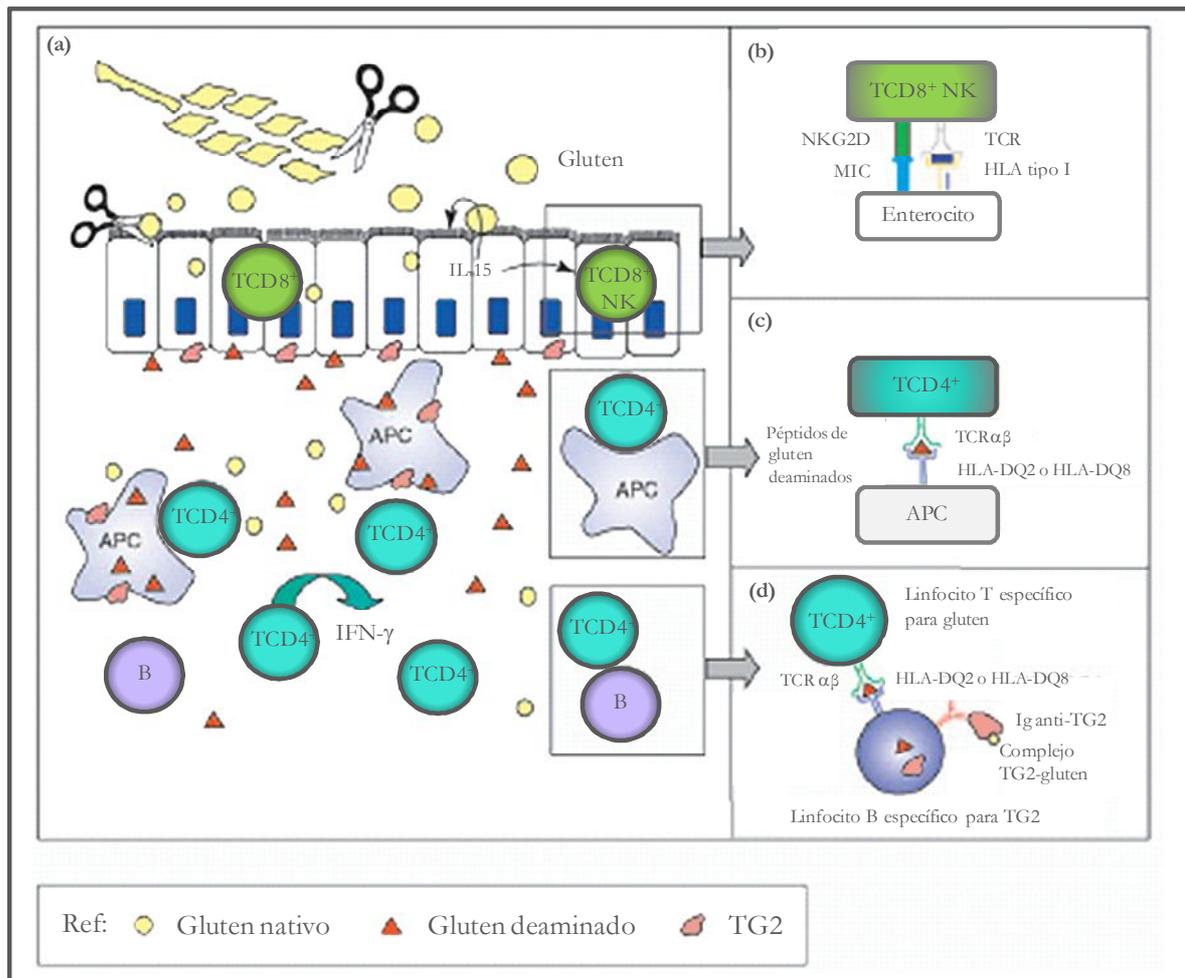


Figura I.7. Para la descripción de la figura, véase texto. (Adaptado a partir de Sollid y Jabri, 2005).

1.3. Epidemiología

En Argentina, el último estudio realizado arrojó un índice de incidencia de la EC de 1/167, que concuerda con los indicadores de las áreas de Europa relacionadas genéticamente con nuestra población (Gómez y col., 2001). Esto significa que aproximadamente 250 000 personas en nuestro país no pueden consumir alimentos derivados de cereales como el trigo, la cebada y el centeno.

1.4. Alimentos libres de gluten

El *Codex Alimentarius* (CODEX STAN 118-1979, 2008) establece que los alimentos exentos de gluten son alimentos que están constituidos o elaborados únicamente con uno o más ingredientes que no contienen trigo (es decir, ninguna de las especies de *Triticum*, como el trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena (aunque la avena puede ser tolerada por algunos celíacos) o sus variedades híbridas, y cuyo contenido de gluten no sobrepase los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor; o alimentos que estén constituidos por estos ingredientes, pero que hayan sido procesados de forma tal para eliminar el gluten, y donde el contenido de gluten no sobrepase los 20 mg/kg en total.

Además establece que los productos que sustituyan a alimentos básicos importantes deberían suministrar aproximadamente la misma cantidad de vitaminas y minerales que los alimentos originales a los que sustituyen (*Codex Alimentarius*, 2008).

2. Pan

El pan es un alimento básico en muchas culturas en todo el mundo y es uno de los primeros alimentos elaborados por la humanidad. De acuerdo a los hallazgos arqueológicos, el primer “pan” consumido por el hombre era elaborado a partir de agua y harina y cocinado en piedras calientes. El pan fermentado comenzó a masificarse en Egipto hace aproximadamente 5 000 años. Los primeros hornos especialmente diseñados para hornear el pan datan de hace aproximadamente 4 500 años. A partir de allí, la tecnología de la panificación ha evolucionado en numerosas técnicas diferentes. Se han ido incorporando nuevos ingredientes en la composición panaria a medida que la investigación ha ido generando un progreso en la metodología de la panificación. Muchos países utilizan el método de panificación tradicional, mientras que otros han ido cambiando sus metodologías drásticamente; cada región fue desarrollando su método de panificación tradicional de acuerdo a la calidad de la materia prima y a las características exigidas por los consumidores locales.

El pan es un producto leudado obtenido gracias a la acción de levaduras que fermentan el azúcar de la harina de trigo producida por la hidrólisis del almidón (por

parte de las enzimas naturalmente presentes en la harina). Durante la fermentación se generan gases como producto de la actividad metabólica de las levaduras. Muchos microorganismos pueden fermentar azúcares para producir dióxido de carbono (CO_2), pero el organismo más eficiente a tal fin en la masa panaria es *Saccharomyces cerevisiae*. Los principales productos de la fermentación son, en este caso, el CO_2 y el alcohol etílico, resultado de una serie compleja de reacciones controladas por enzimas. El CO_2 es el responsable del aumento de volumen de la masa, mientras que el alcohol colabora en la producción del aroma complejo de estos productos horneados.

A la hora de determinar la calidad del pan, uno de los atributos clave es el sabor (Heiniö, 2006). Las reacciones enzimáticas y de fermentación son las mayores responsables del sabor de la miga de pan; mientras que las reacciones que se llevan a cabo a altas temperaturas (reacciones de Maillard y de caramelización) influyen en el sabor de la corteza del pan (Kirchhoff y Schieberle, 2001). Además del sabor, la frescura, el color y la textura intervienen de manera notable en la percepción global del pan (Gellynck y col., 2009). Una serie de ensayos han sido desarrollados para evaluar de manera objetiva la calidad tecnológica del pan. Así, el volumen específico se utiliza como indicador de la esponjosidad; por otra parte, la dureza (un parámetro de la textura) de la miga es evaluada mediante el uso de texturómetros que comprimen la miga un porcentaje establecido, y determinan la dureza como la máxima fuerza que realizan durante la compresión. La estructura de la miga se evalúa mediante el análisis computarizado de imágenes obtenidas de las rodajas de pan; los atributos generalmente informados son la distribución de tamaño de los alvéolos, el área de la rodaja ocupada por aire, y la porosidad de la miga. El color de la corteza se mide objetivamente mediante el empleo de un colorímetro y la escala CIELab.

2.1. Panificación

Con el objeto de convertir la mezcla de ingredientes en una estructura esponjosa como lo es la miga de pan, se siguen una serie de procesos que llevan, en su conjunto, a la obtención de una masa con las propiedades mecánicas apropiadas que permitan la retención de gases produciendo una pieza de pan expandida con una estructura de

miga pareja (Bloksma y Bushuk, 1988; Gan y col., 1990; Kokelaar y Prins, 1995). Por medio de estos procesos se persiguen los siguientes objetivos: 1) mezclar y desarrollar la masa (por medio del amasado y la fermentación); 2) formar una estructura espumosa (por medio del moldeado, fermentación y horneado), y 3) estabilizar la estructura porosa alterando la configuración molecular de los componentes poliméricos en las paredes de los alvéolos por medio de la aplicación de calor (horneado) (Kent y Evers, 1994).

Independientemente de la manera en que se realicen el amasado y la fermentación, tres hechos ocurren fehacientemente (Bloksma, 1990; Campbell y col., 1991; Kent y Evers, 1994): 1) hidratación: el amasado de los ingredientes, además de la tarea obvia de mezclarlos, tiene como función distribuir el agua entre los polímeros; 2) desarrollo del gluten: aunque algunas de las proteínas presentes en la harina son solubles en agua, es en las proteínas insolubles, conocidas colectivamente como *gluten*, donde se enfocan los estudios que pretenden elucidar cómo el trabajo aplicado transforma al agua y la harina en una masa cohesiva (Weegels y col., 1996). Cuando la masa es desarrollada bajo condiciones óptimas, estas proteínas forman una red viscoelástica que retiene el aire, los gránulos de almidón y otros materiales, como el salvado. El óptimo desarrollo del gluten durante el amasado es vital para la formación de la estructura de la miga; 3) incorporación y retención del aire: durante el amasado debe incorporarse el aire que formará la fase gaseosa de la miga de pan, y el volumen final de aire será una función de la amasadora que se emplee.

El pan es un producto nutricionalmente balanceado ya que es fuente de energía, proteínas, vitaminas (en particular del complejo vitamínico B), minerales y fibra dietética. En Argentina, el 71,3% del trigo destinado al mercado interno en el 2006 se empleó para la fabricación de pan; y el consumo per cápita/año de este producto en el mismo período fue de 72,5 kg/habitante/año (Lezcano, 2006).

2.2. Pan libre de gluten

Como ya se expuso, el gluten en la harina de trigo es responsable de muchas de las características de los productos panificados, como la naturaleza viscosa y elástica

necesaria para el procesamiento de la masa, además de que provee la matriz proteica tridimensional que impide la difusión del gas, y permite la formación y estabilización de las paredes alveolares en el pan horneado.

Por este motivo, obtener un pan sin el aporte de las propiedades del gluten es un desafío considerable (Figura I.8).

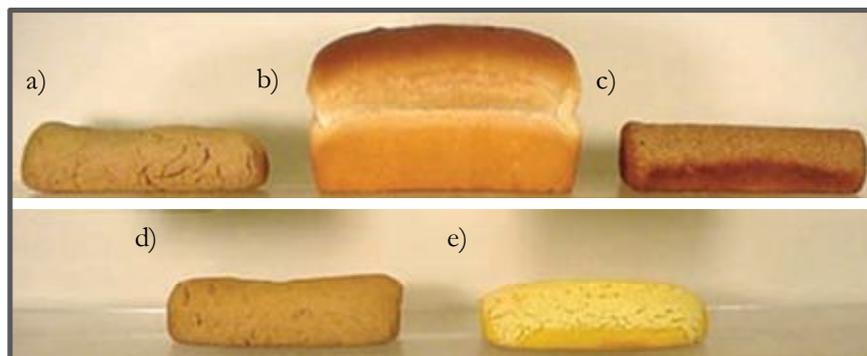


Figura I.8. Panes elaborados con harinas de distintos cereales: a) avena, b) trigo, c) centeno, d) cebada, y e) maíz. (Adaptado a partir de Engleson y Atwell, 2008).

Es intuitivo pensar que no existe un único ingrediente que sea capaz de reemplazar al gluten. La propuesta más común consiste en realizar una mezcla de almidones, hidrocoloides, fibras e ingredientes lácteos para que, todos juntos, otorguen la funcionalidad necesaria. Estas materias primas tienen una mayor capacidad de absorción de agua en relación a la harina de trigo, por lo que el contenido de agua de las masas libres de gluten es generalmente alto. Esto significa que la tecnología y la metodología empleadas a la hora de obtener panes libres de gluten son distintas que las utilizadas en el proceso de panificación convencional. Las amasadoras son, en general, reemplazadas por batidoras. La masa/batido resultante se coloca en moldes y se somete a una fermentación que oscila entre los 60 y 75 minutos, y luego son horneadas por tiempos relativamente más largos, debido a la presencia de altas proporciones de agua.

En la actualidad, se pueden encontrar en el mercado diversos panes libres de gluten; sin embargo, éstos suelen ser de una calidad pobre. Arendt y col. (2002) encontraron que la mayoría de los productos libres de gluten son de calidad inferior al ser comparados con los mismos productos a base de trigo, además de que en general

presentan una estructura densa y seca, con un volumen bajo y una alta dureza de la miga (Gujral y col., 2003). Recientemente, en numerosos estudios se han investigado las propiedades de harinas de distintos cereales sin gluten (Gujral y col., 2003; Schober y col., 2005), derivados lácteos (Gallagher y col., 2003a,b), proteínas, hidrocoloides (Moore y col., 2004; Lazaridou y col., 2007) y enzimas para mejorar el volumen, la textura de la miga y la calidad global y la aceptabilidad de los panes libres de gluten.

2.3. Harinas libres de gluten

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios que muestran los resultados de la utilización de diferentes materias primas en la calidad de panes libres de gluten. Los ingredientes más comúnmente usados son la harina de arroz, ya sea refinada o integral; la harina y/o almidón de maíz, las harinas de sorgo y mijo, el almidón de papa, la harina de granos andinos y legumbres. Almidones de distinto origen botánico pueden emplearse para mejorar la calidad de estos productos (Schober, 2009), ya que la mayor disponibilidad de este polímero significa una mayor gelatinización, y este fenómeno favorece el desarrollo de una red cohesiva que atrapa el gas y previene la pérdida de CO₂ y el colapso de la corteza (Onyango y col., 2011). La harina de soja ha sido reconocida desde hace muchos años como un excelente medio para fortificar los productos a base de cereales, tales como el pan, las galletitas y la pasta. Se caracteriza por un alto contenido en proteínas ricas en aminoácidos esenciales que son fácilmente digeribles. Sin embargo, en panes de trigo, las propiedades viscoelásticas únicas del gluten se ven afectadas por la incorporación de soja, reduciendo el volumen de las piezas (Fleming y Sosulski, 1978; Ribotta y col., 2005). Contrariamente, se han informado efectos beneficiosos sobre la calidad tecnológica de productos panificados libres de gluten mediante la incorporación de harina de soja (Ribotta y col., 2004). No obstante, debe tenerse en cuenta que numerosos tipos de harinas son elaboradas a partir de las semillas de la soja, con propiedades muy disímiles. Dos tipos principales son: harina entera, donde las legumbres son lavadas, sometidas a un tratamiento térmico, pasadas por rodillos para remover los tegumentos y finalmente molidas; y harina deslipidizada, donde los

componentes grasos son removidos en general, por extracción con solventes. A su vez, la harina entera varía de acuerdo al grado del tratamiento térmico. Cuando éste se encuentra ausente, se obtiene la harina entera activa, donde las proteínas no sufren una desnaturalización, y poseen una solubilidad mínima del 70% en agua fría. Esta harina posee toda la actividad enzimática presente en la legumbre; es una buena fuente de amilasas, lipasas, proteinasas, ureasas y lipoxigenasa. Por otro lado, el tratamiento térmico se realiza para optimizar el valor nutritivo de la soja, para inactivar los factores antinutricionales como el inhibidor de tripsina y reducir, además, el leve sabor amargo de la harina de soja.

2.4. Componentes de las harinas

2.4.1. Almidón

Las semillas de los cereales almacenan energía en forma de almidón. La cantidad de almidón presente en el grano es variable, pero por lo general oscila entre el 60 y el 75% del peso del grano. De esta manera, gran parte de los alimentos que consume el hombre está constituida por almidón, que es una excelente fuente de energía. Además de su importancia energética, el almidón es utilizado en la industria alimentaria por el efecto que éste ejerce sobre las propiedades físicas de los alimentos.

En las plantas, el almidón se encuentra empacado en forma de gránulos, en general formados dentro de amiloplastos. En cereales como trigo, maíz, cebada, centeno, sorgo y mijo, cada amiloplasto contiene un único gránulo (gránulos simples). El arroz y la avena, por el contrario, poseen varios gránulos por cada amiloplasto (gránulos compuestos).

El almidón es una macromolécula compuesta por dos polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina. La amilosa se describe como una molécula esencialmente lineal, compuesta por 500-6 000 unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1-4), con escasas ramificaciones dadas por enlaces α -(1-6) (Shibanuma y col., 1994); mientras que la amilopectina está formada por una cadena central similar a la de amilosa, pero posee ramificaciones con enlaces α -(1-6) cada 9 a 20 unidades de glucosa (Whistler y Daniel, 1984). El enlace α -(1-4) imparte a la molécula un giro, por lo que la

conformación de las cadenas es helicoidal (Greenwood, 1976). La molécula posee poblaciones distintas de cadenas poliméricas que se agrupan, según su grado de polimerización (DP), en cadenas cortas ($12 < DP < 20$), cadenas largas ($30 < DP < 60$), y cadenas muy largas ($DP > 60$). Además, las cadenas se clasifican también en A, B o C. Las cadenas A se enlazan al resto de la molécula a través de su extremo reductor, las cadenas B se enlazan con una cadena A pero transportan otras A y/o B en uno o más de los grupos oxidrilos, y la cadena C no está sustituida en el extremo reductor, y existe sólo una por molécula (Figura I.9).

El interior de los gránulos está formado por regiones cristalinas y amorfas alternadas, por lo que el almidón se describe como un polímero semicristalino (Eliasson y Gudmundsson, 1996). Las zonas cristalinas se deben a las regiones ordenadas de cadenas de amilopectina, mientras que las regiones amorfas están compuestas principalmente por las regiones ramificadas de la amilopectina y las cadenas de amilosa (Figura I.9).

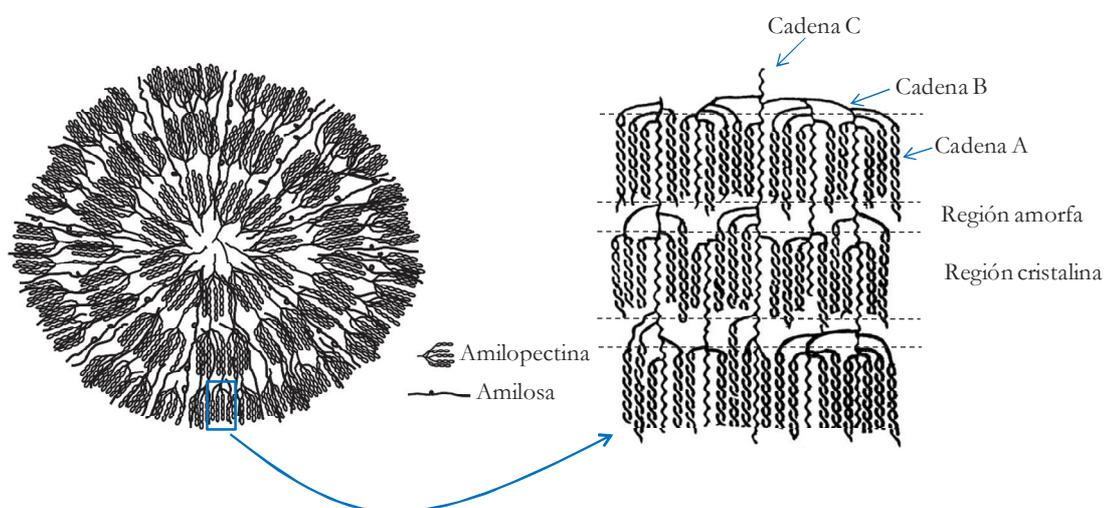


Figura I.9. Estructura semicristalina del almidón, mostrando las regiones amorfas y cristalinas alternadas.

Cuando los gránulos de almidón son calentados en presencia de agua sufren una transición de fase orden-desorden llamada *gelatinización*, en un rango de temperaturas característico para cada tipo de almidón (Hoover, 2001), que lleva a la destrucción irreversible del orden molecular de los gránulos de almidón (Atwell y col., 1988). La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica muy difundida para estudiar este fenómeno. De acuerdo a Jenkins y Donald (1998), la gelatinización que ocurre en

un exceso de agua, es un proceso conducido por la absorción de agua principalmente por las regiones amorfas del almidón, con el concomitante hinchamiento de los gránulos, donde el hinchamiento actúa desestabilizando los cristales de amilopectina; en este caso, se observa una única endoterma correspondiente al proceso de gelatinización (pico G) (Figura I.10). En condiciones de agua limitante, esto también es cierto, aunque el agua no es suficiente para que la gelatinización ocurra por completo. Bajo estas condiciones, los cristales remanentes simplemente funden cuando se alcanzan temperaturas mayores (pico M). De esta manera, tanto el pico G como el M se ven afectados por la cantidad de agua disponible en el sistema: para suspensiones de almidón en 60% (p/p) de agua, se distingue, en general, una única endoterma; mientras que el área de G disminuye a medida que disminuye la cantidad de agua y, simultáneamente, aumenta el área de M (Donovan, 1979; Biliaderis y col., 1980).

La temperatura de transición y la entalpía de gelatinización determinadas por DSC pueden relacionarse con características de los gránulos de almidón, como por ejemplo el grado de cristalinidad (Krueger y col., 1987). Altas temperaturas de transición se han relacionado con un alto grado de cristalinidad, indicando estabilidad estructural y resistencia de los gránulos a la gelatinización (Barichelo y col., 1990).

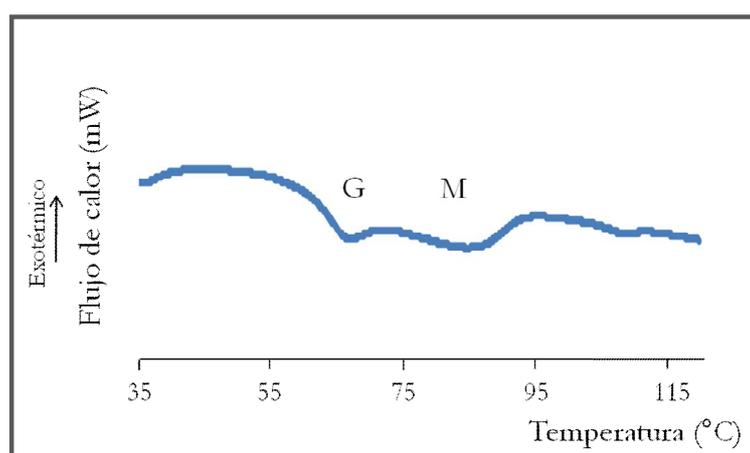


Figura I.10. Endoterma modelo obtenida para el almidón de mandioca con un 40% de agua (p/p).

Durante el horneado de la masa de pan, el almidón sufre una gelatinización (Figura I.11), y una pequeña cantidad de almidón, principalmente amilosa, es liberada a la

región intergranular, lo que conduce a un aumento de la viscosidad del sistema (Figura I.11b). Parte de la amilosa solubilizada forma complejos de inclusión con los lípidos polares de la harina. Además, se produce el desorden de las regiones cristalinas dentro de los gránulos.

Durante el enfriamiento y el almacenamiento del pan, las moléculas de almidón se re-asocian dando lugar a un estado más ordenado o cristalino, proceso llamado *retrogradación* (Atwell y col., 1988). La estructura y la dureza del pan durante las primeras horas después del horneado están dadas por la retrogradación o gelificación de la amilosa solubilizada, lo que implica la formación de dobles hélices en varios segmentos de las cadenas. La amilosa gelificada forma una red continua que rodea los gránulos de almidón hinchados y deformes (Figura I.11c) (Eliasson y Larsson, 1993). La retrogradación de la amilopectina ocurre a una velocidad mucho menor que la de la amilosa por lo que se postula como uno de los fenómenos responsables del endurecimiento del pan durante su almacenamiento.

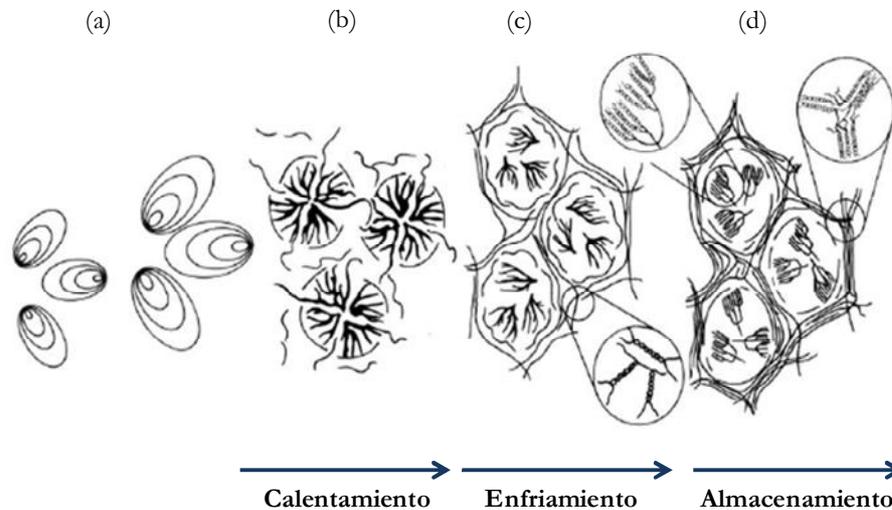


Figura I.11. (a) Hinchamiento de los gránulos de almidón a medida que absorben agua; (b) gelatinización, ruptura de los gránulos de almidón y liberación de moléculas de amilosa; (c) retrogradación de la amilosa durante el enfriamiento, formación de la red de amilosa; (d) retrogradación (ordenamiento) de la amilopectina durante el almacenamiento. (Adaptado a partir de Goesart y col., 2005).

El envejecimiento de los productos panificados está definido como la disminución de la aceptación por parte del consumidor a causa de cambios que no resultan de la

acción de microorganismos dañinos (Betchel, 1955). Durante el almacenamiento, el pan pierde gradualmente su frescura, y las alteraciones más notorias incluyen la pérdida de la crujibilidad de la corteza, el aumento de la dureza y la disminución de la elasticidad de la miga, y los cambios en su aroma y sabor (Cauvain, 1998). La corteza pierde su textura crocante por la transferencia de humedad desde la miga, y el sabor y el aroma se debilitan por la merma en las sustancias volátiles. El desarrollo de la dureza de la miga con el tiempo es un fenómeno en el que influyen diversos factores. La pérdida de humedad de la miga junto con la recristalización de la amilopectina (asociaciones entre las cadenas) son dos de los mecanismos más aceptados (Figura I.11d) (Kulp y Ponte, 1981; Gray y BeMiller, 2003).

2.4.2. Proteínas

Tradicionalmente, las proteínas de los cereales se han clasificado en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad. Esta clasificación fue establecida por primera vez por Osborne (1907). Así, definió: *albúminas*, como las proteínas solubles en agua; *globulinas*, solubles en soluciones salinas diluidas; *prolaminas*, proteínas solubles en etanol 70% v/v, y las *glutelinas*, que se solubilizan en soluciones ácidas o básicas diluidas.

La mayoría de las enzimas del grano se encuentran incluidas en el grupo de las albúminas y globulinas. Ambos grupos están concentrados en las células de la aleurona, en el germen y el salvado, mientras que su concentración es relativamente baja en el endosperma.

Las prolaminas y glutelinas son las proteínas de reserva de los cereales. Se encuentran limitadas al endosperma, y su presencia es casi nula en el pericarpio o el germen. Nutricionalmente, las prolaminas son pobres en lisina, metionina y triptófano; mientras que las glutelinas presentan mayor variabilidad en la composición aminoacídica.

En el **trigo**, las prolaminas (que reciben el nombre particular de *gliadinas*) y las glutelinas (particularmente, *gluteninas*) conforman el gluten. La composición de aminoácidos de las proteínas del gluten muestra que aproximadamente la mitad de los

constituyentes son glutamina y prolina, además, el 35% de los aminoácidos poseen cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica (Hoseney, 1994). Sin embargo, no sólo su estructura química sino también los enlaces e interacciones que se establecen entre sus proteínas, juegan un papel fundamental en la funcionalidad del gluten a la hora del desarrollo de la masa. Entre las proteínas se establecen uniones covalentes y no covalentes que contribuyen a la formación y estructuración de la masa (Hoseney, 1994). Las uniones no covalentes incluyen puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos e interacciones de van der Waals (Hoseney, 1994). Aunque los puentes de hidrógeno son individualmente débiles, otorgan una gran estabilidad durante el amasado debido al gran número que se establece. En cuanto a las interacciones hidrofóbicas e iónicas, aunque se encuentran en pequeña cantidad, su importancia es significativa en la interacción entre los biopolímeros de la masa, promoviendo una mayor estabilidad. Además, los enlaces covalentes (enlaces peptídicos y puentes disulfuro) se establecen principalmente durante el proceso de amasado y relajación (Aït Kaddour y col., 2008). Los puentes disulfuro se generan en la masa entre dos residuos de cisteína, ya sean de la misma proteína o de proteínas diferentes.

Los polímeros de glutenina están compuestos por subunidades de alto peso molecular (HMW), de entre 60 y 90 kD; y de bajo peso molecular (LMW), entre 10 y 70 kDa (Belton y col., 1995; Wellner y col., 2005; Anjum y col., 2007). Las subunidades de alto peso molecular, que suman entre el 5 y el 10% del total de las proteínas de gluten, se encuentran estabilizadas principalmente por puentes disulfuro (Lefebvre y Mahmoudi, 2007). Forman un esqueleto elástico con puentes disulfuro intercatenarios, y este esqueleto es la base para el ensamblaje de las subunidades de bajo peso molecular a través, también, de puentes disulfuro (Shewry y col., 2001) (Figura I.12). Incluso, las gliadinas pueden interaccionar con las gluteninas a través de interacciones hidrofóbicas, y con la glutamina a través de puentes hidrógeno (Wellner y col., 2003). Durante el amasado, se forma así una red tridimensional, con propiedades elástica y

viscosa, que es capaz de retener el CO₂ durante la fermentación, y que es bastante estable durante todo el proceso de la panificación.

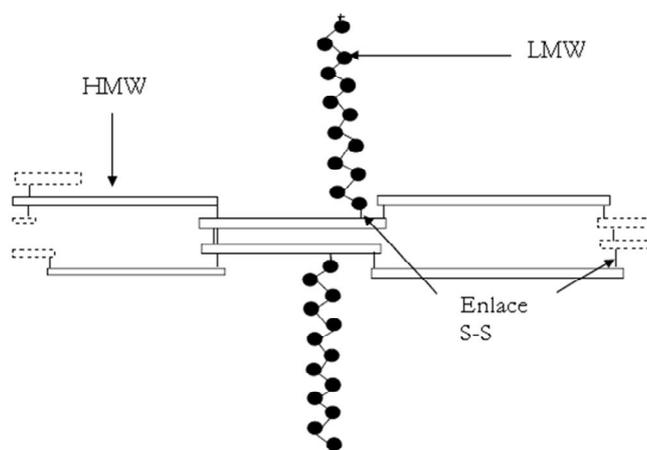


Figura I.12. Modelo que muestra el esqueleto principal formado por subunidades de glutenina de alto peso molecular (HMW) unidas por puentes disulfuro (S-S), y las subunidades de bajo peso molecular (LMW) unidas al esqueleto, y estabilizadas también por puentes S-S. (Adaptado a partir de Wieser, 2007).

Por otro lado, las proteínas que se encuentran en los cereales distintos al trigo no poseen la capacidad de formar esta red tridimensional. En el **maíz**, el endosperma contiene aproximadamente un 5% de albúminas y globulinas, 44% de prolaminas (que reciben el nombre de *zeínas*), y un 28% de glutelinas. El 17% restante está constituido por una fracción que no se extrae por el clásico procedimiento de Osborne. Es una fracción de zeínas entrecruzada por puentes disulfuro, que es soluble en alcohol y β -mercaptoetanol, con un peso molecular de aproximadamente 44 kDa (Mossé, 1961; Pomes, 1971). Las proteínas de maíz tienen un alto contenido de ácido glutámico y de leucina. Tanto las albúminas, como las globulinas y glutelinas tienen un balance aminoacídico relativamente bueno, mientras que las zeínas y las zeínas entrecruzadas son pobres en lisina y triptófano, y ricas en leucina, ácido glutámico y prolina.

Las zeínas se encuentran en *cuerpos de zeína* de aproximadamente 1 mm, distribuidos uniformemente en el citoplasma de las células del endosperma (Duvick, 1961). La alta proporción de aminoácidos no polares y la deficiencia en aminoácidos ácidos o básicos son responsables de las propiedades de solubilidad de estas proteínas. Las

zeínas son una mezcla de diferentes péptidos que varían en su peso molecular, solubilidad y carga. Las dos fracciones principales α y β fueron descritas por primera vez por McKinney (1958). Las α -zeínas fueron definidas como las prolaminas solubles en etanol 95%. Cuando las zeínas fueron analizadas por electroforesis en gel de almidón, se encontró que cuatro bandas diferentes migraban en el gel, mientras que una fracción importante quedaba en el origen. Las bandas que migraron fueron agrupadas dentro de las α -zeínas, mientras que la fracción que permaneció en el origen se clasificó como β -zeínas (Pomes, 1971). Las β -zeínas son solubles en etanol 60%, e insolubles en etanol 95%; son relativamente inestables, ya que frecuentemente precipitan y coagulan.

Argos y col. (1982) propusieron un modelo helicoidal para la estructura de las zeínas, donde nueve unidades se repiten y arreglan de forma anti-paralela, estructura estabilizada por puentes de hidrógeno. Por dicroísmo circular y dispersión óptica se estableció que el contenido helicoidal de las zeínas varía entre 33,6 y 60% en etanol 50-80% (Gortner y MacDonald, 1944; Danzer y col., 1975; Argos y col., 1982; Matsushima y col., 1993); además, las α - y β -zeínas mostraron una proporción similar. Este contenido helicoidal sugiere que las zeínas poseen una estructura globular en soluciones no acuosas (Danzer y col., 1975). Se observaron cambios conformacionales a medida que se reducía la concentración de etanol desde 80 a 50%. Sin embargo, en estos estudios no pudo establecerse la presencia de láminas plegadas β , como había sido hipotetizado mediante estudios de espectroscopía de infrarrojo.

Por su parte, el **arroz** tiene un contenido de proteínas por lo general más bajo que en el resto de los cereales, aunque su balance aminoacídico es relativamente bueno. La lisina es también el aminoácido limitante, seguido por la treonina. La extracción de Osborne muestra que las proteínas del endosperma del arroz están constituidas por aproximadamente 3,8-8,8% de albúminas, 9,6-10,8% de globulinas, 2,6-3,3 % de prolaminas y 66-78% de glutelinas (que reciben el nombre de *orizéninas*) (Cagampang y col., 1966). Las albúminas de arroz poseen un amplio rango de peso molecular (Juliano, 1972), aunque la fracción mayoritaria se encuentra entre 18-20 kDa (Houston

y Mohammed, 1970). Las globulinas consisten en α -, β - y δ - globulinas, con pesos moleculares de 25,5, 15, 200 kDa y más, respectivamente (Morita y Yoshida, 1968). Las prolaminas están constituidas por subunidades peptídicas de peso molecular de 10, 13 y 16 kDa (Ogawa y col., 1987). El péptido de 13 kDa es fácilmente solubilizado en soluciones alcohólicas, mientras que los péptidos de 10 y 16 kDa, con mayor contenido de puentes disulfuro, requieren de un agente reductor para su solubilización en soluciones alcohólicas (Ogawa y col., 1987; Hibino y col., 1989). Las glutelinas nativas son extremadamente insolubles en agua (Juliano, 1985; Hamada, 1996). Además, son de alto peso molecular, y muy heterogéneas (Juliano, 1985). Esta fracción es soluble en soluciones ácidas (pH por debajo de 3) o básicas (pH por encima de 10) (Shih, 2004). Están compuestas por dos unidades polipeptídicas que reciben el nombre de α -glutelinas (ácidas) y β -glutelinas (básicas), con pesos moleculares de 30-39 y 19-25 kDa, respectivamente (Juliano, 1985; Kagawa y col., 1988; Kishimoto y col., 1999; Shih, 2004). Las glutelinas de arroz polimerizan mediante puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas para formar complejos macromoleculares de gran tamaño (Utsumi, 1992). Esta formación de estructuras muy ordenadas explicaría la falta de funcionalidad de estas proteínas (Katsube-Tanaka y col., 2004).

En cuanto a las proteínas distintas a la de los cereales que se incorporan a los productos panificados, se destacan las proteínas de **soja**. La proteína proveniente de la soja es una de las proteínas vegetales de mayor importancia en la industria alimenticia debido a sus propiedades funcionales y su alto valor nutricional. La ultracentrifugación del aislado proteico de soja resulta en cuatro fracciones denominadas 2S, 7S, 11S y 15S, de acuerdo a sus velocidades de sedimentación (Utsumi y col., 1997). Las dos fracciones más abundantes son la 7S (β -conglucina) y la 11S (glicina), que suman el 70% del total de proteínas, por lo que dominan el comportamiento del aislado. Ambas, β -conglucina y glicina, son proteínas complejas, con múltiples subunidades. La globulina 7S es una proteína trimérica (141-170 kDa) compuesta por las subunidades α (57 kDa), α' (58 kDa) y β (42 kDa)

asociadas por interacciones hidrofóbicas (Thanh y Shibasaki, 1977). La fracción 11S consiste en dos anillos hexagonales, y cada uno contiene tres subunidades asociadas por interacciones hidrofóbicas que consisten en pares de polipéptidos ácidos y básicos unidos por enlaces disulfuro (Moreira y col., 1979). La glicinina y la β -conglucina tienen una temperatura de desnaturalización de 90 y 72 °C, respectivamente. Para proceder a la extracción de estas fracciones proteicas, se solubilizan en soluciones acuosas a un pH aproximado de 8 y se precipitan en soluciones ácidas, cercanas al pI de las proteínas ($\approx 4,5$) (Kinsella, 1979).

2.4.3. Polisacáridos no almidonosos

Los polisacáridos no almidonosos, que provienen de la pared celular, de la aleurona y del endosperma del grano, incluyen distintas moléculas construidas a partir de hexosas y pentosas (pentosanós), y son estos últimos los que constituyen la mayor fracción de este grupo de polisacáridos. Generalmente, los pentosanós, constituidos principalmente por arabinosilanos y arabinogalactanos, se clasifican en solubles e insolubles en agua, que representan el 25 y el 75% de los pentosanós totales, respectivamente (Wang y col., 2003). Aunque ambos grupos son bastante heterogéneos, existe una estructura en común. La estructura general de los arabinosilanos es un esqueleto central de xilas unidas por enlaces β -(1-4) que llevan un residuo simple de arabinosa en el C-3 o en los C-2 y C-3 (Wang y col., 2005). Algunas arabinosas se encuentran esterificadas con ácido ferúlico. Se ha informado que el peso molecular de los arabinosilanos se encuentra entre 22 y 5 000 kDa (Izydorczyk y col., 1990).

La diferencia estructural entre arabinosilanos solubles e insolubles en agua radica principalmente en el peso molecular (Meuser y Suckow, 1986) y en la relación arabinosa/xilosa (Gruppen y col., 1993). La capacidad de los pentosanós para retener agua y formar soluciones viscosas o geles por uniones covalentes afecta la distribución de la humedad entre los constituyentes de la masa. Se conoce que los pentosanós insolubles en agua ejercen un impacto negativo en la calidad de los panes con trigo (van Oort y col., 1995; Courtin y col., 1999; Courtin y Delcour, 2002); mientras que un

efecto beneficioso fue asignado a los pentosanos solubles en agua (Hoseney, 1984; Gan y col., 1995). Sin embargo, poco se ha investigado sobre el efecto que éstos tienen sobre las masas elaboradas con harinas distintas a la de trigo.

2.4.4. Lípidos

El grano de los cereales contiene una cantidad relativamente pequeña de lípidos, variando entre 1,5 y 8% de acuerdo al cereal del que se trate, con valores mínimos para el centeno y máximos para la avena. Los lípidos se almacenan preferentemente en el embrión (germen) y, en menor medida, en la capa de aleurona. Los lípidos de los distintos cereales no difieren significativamente en la composición de los ácidos grasos, y se sabe que es el ácido linoleico el que predomina en proporción. Se ha descrito que los lípidos presentes en el trigo tienen una gran influencia en la calidad panadera de la harina (Belitz y Grosch, 1999a). Los triglicéridos se almacenan principalmente en el germen y la capa de aleurona, en esferosomas, mientras que los fosfolípidos y glucolípidos se encuentran en el endosperma. Parte de los lípidos presentes en la harina se encuentra asociada al almidón, y otra parte se encuentra libre, no asociada. Esta última fracción es extraíble con un solvente polar a temperatura ambiente, y suma alrededor del 75% de los lípidos de la harina, mientras que la fracción asociada al almidón corresponde al 25% restante. Una disminución en el contenido de amilosa conlleva a una disminución en la proporción de los lípidos asociados al almidón.

El aceite que se obtiene de la soja mediante una extracción con solvente, contiene, en valores aproximados, un 95-97% de triglicéridos, 2,5% de fosfátidos y 0,3-0,7% de ácidos grasos libres. Los triglicéridos están compuestos por distintos ácidos grasos, y en su mayoría se tratan de ácidos grasos insaturados. La fracción de ácidos grasos saturados comprende entre un 10% y un 20% del total de ácidos grasos, y está dominada por el ácido palmítico y, en menor medida, por el ácido esteárico. Por otro lado, la fracción de ácidos grasos insaturados suma entre un 80% y un 90% de la fracción total, y está representada principalmente por el ácido linoleico y el ácido oleico y, en menor proporción, el ácido linolénico.

2.5. Aditivos

A fin de obtener panes libres de gluten de buena calidad tecnológica y con una vida de anaquel aceptable, se han incorporado numerosos ingredientes como aditivos en formulaciones establecidas a partir de harinas y almidones seguros para los pacientes celíacos.

2.5.1. Hidrocoloides

Los hidrocoloides comprenden un número de moléculas altamente hidrofílicas. Químicamente, pueden ser polisacáridos como la goma xántica, los galactomananos, los derivados del almidón, entre otros; o proteínas, como la gelatina. Proveen numerosas propiedades funcionales que los tornan adecuados para diferentes aplicaciones en la industria alimenticia (Rosell y col., 2007).

En la industria panadera, además de ser utilizados como reemplazantes del gluten, los hidrocoloides han sido empleados para mejorar la textura del pan, disminuir la velocidad de retrogradación de la amilopectina, aumentar la retención de agua y mantener la calidad general del producto durante más tiempo (Rojas y col., 1999).

Todos los hidrocoloides interactúan con el agua, reduciendo su difusión. En general, los hidrocoloides neutros muestran una menor solubilidad, mientras que los polielectrolitos son altamente solubles en agua, aunque la cinética de hidratación depende de varios factores; las gomas xántica y guar y la carboximetilcelulosa (CMC) son solubles en agua fría; mientras que los carragenanos, la goma garrofín y muchos alginatos requieren de agua caliente para su completa hidratación (Anton y Artfield, 2008). El agua puede ser retenida directamente por la formación de puentes de hidrógeno, o puede ser contenida en los espacios que se forman inter o intramolecularmente.

Acs y col. (1997) probaron el uso de diferentes hidrocoloides como sustitutos del gluten en pan elaborado a partir de almidón de maíz. Los autores evaluaron el efecto de las gomas xántica, guar, garrofín y tragacanto sobre el volumen y la textura de estos panes. Todos los hidrocoloides aumentaron significativamente el volumen y disminuyeron la dureza de los panes, obteniendo los mejores resultados con la

incorporación de la goma xántica; mientras que Gan y col. (2001) encontraron que la HPMC y la CMC funcionan mejor que la goma guar como reemplazantes parciales del gluten en panes hechos a partir de harina de trigo y harina de arroz (50:50).

La goma xántica es un metabolito secundario producido durante la fermentación aeróbica de carbohidratos simples por parte de *Xanthomonas* spp. Se trata de un polisacárido formado por una estructura primaria de unidades repetidas, constituidas por dos glucosas, dos manosas y un ácido glucurónico. Unidos a las manosas se encuentran ácido pirúvico y grupos acetilos, que le otorgan a la molécula un carácter aniónico (García-Ochoa y col., 2000). En soluciones acuosas, la molécula adopta una conformación helicoidal, que le otorga a la molécula una estructura más rígida. Se ha demostrado que esta característica influye el comportamiento de sus soluciones, incluyendo altas viscosidades y pseudoplasticidad (Millane y Wang, 1990). La cadena central de glucanos está protegida por las cadenas laterales, que la tornan relativamente estable a ácidos, álcalis y enzimas (particularmente celulasa).

La carboximetilcelulosa (CMC) es una celulosa químicamente modificada. Su estructura consiste en un polímero de residuos de glucosa unidas por enlaces β -(1-4), al que se le reemplazan los grupos hidroxilos por grupos carboximetilos. La incorporación de grupos metilo a la cadena de celulosa produce polímeros con una gran actividad superficial y características únicas de hidratación-deshidratación en solución y durante los cambios de temperatura. Las redes formadas por la metilcelulosa (MC, celulosa con grupos metilo), la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, celulosa con grupos hidroxipropil metilos) o la carboximetilcelulosa (CMC) durante el horneado aumentan la viscosidad de la masa y fortalecen los límites de las burbujas de aire en expansión mejorando la retención de gas y, por consiguiente, aumentando el volumen de las piezas (Bell, 1990).

Alginato es un término colectivo que se otorga a la familia de exopolisacáridos producidos principalmente por algunas especies de algas pardas. Se los ha utilizado ampliamente en la industria alimenticia; existe una mayor preferencia por el alginato de sodio, ya que posee mayor solubilidad en agua a temperatura ambiente. En

términos químicos, es un co-polímero lineal formado por ácido D-manurónico (M) y ácido L-gulurónico (G) como monómeros, formando estructuras en bloque -MMM- o -GGG- (Moe y col., 1995). El bloque G es más rígido que el M, debido al mayor impedimento en la rotación alrededor de los enlaces glucosídicos (Braccini y col., 1999). La aplicación de los alginatos en la industria se basa en su capacidad de formar geles por medio de la asociación con cationes. Los cationes divalentes se unen preferentemente a los bloques G.

Carragenato es el nombre genérico de una familia de polisacáridos extraídos de algunas algas rojas, con capacidad de formar geles y aumentar la viscosidad de los sistemas en los que se encuentran. Están compuestos de un esqueleto lineal de galactosa con un grado variable de sulfatación (entre el 15 y el 40%). Distintos tipos de carragenato varían en su composición y conformación, lo que resulta en un amplio rango de propiedades reológicas y funcionales. Los ι - y κ -carragenatos comparten una estructura similar: galactosa y 3,6-anhidrogalactosa, con el residuo de galactosa sulfatado en el C-4; además, el ι -carragenato está sulfatado también en el C-2 de la anhidrogalactosa. Estos dos tipos de carragenato son los principales formadores de geles. Conformacionalmente, tienden a ordenarse como doble hélices (Morris y col., 1980; Trius y Sebranek, 1996; Belitz y Grosch, 1999b). Por otro lado, el λ -carragenato está formado por galactosas unidas por enlace glucosídico (1,4), con un residuo sulfatado en la posición 2, y el siguiente en las posiciones 2 y 6 (Belitz y Grosch, 1999b). La conformación de este carragenato es de espiral simple, y no tienen capacidad gelificante aparente (Morris y col., 1980; Trius y Sebranek, 1996; Belitz y Grosch, 1999b).

Los carragenatos se emplean en una gran variedad de aplicaciones comerciales, como gelificantes, espesantes y agentes estabilizantes, especialmente en productos alimenticios como postres congelados, chocolate, cremas batidas y productos de panificación.

2.5.2. Proteínas

En la actualidad, las proteínas obtenidas a partir de la leche se emplean en productos de panadería debido tanto a su valor nutricional como a sus beneficios funcionales como el mejoramiento del sabor y la textura, y la disminución de la velocidad de endurecimiento de la miga (Kenny y col., 2001; Gallagher y col., 2003b). En numerosos estudios se ha evaluado la incorporación de proteínas de suero de leche en sistemas libres de gluten, donde se han incorporado por su capacidad de absorber agua y, así, mejorar las propiedades mecánicas de las masas durante su manipulación (Gallagher y col., 2003a). Recientemente se ha descrito un aumento en el volumen, un mejoramiento en la apariencia general y las propiedades sensoriales de panes libres de gluten al incorporarles proteínas de leche. En un estudio llevado a cabo por Moore y col. (2004), se probó el efecto de proteínas de leche sobre panes libres de gluten elaborados a partir de mezclas comerciales. El estudio mostró que el pan que contenía las proteínas de leche tuvo las mejores propiedades, y era el más parecido a un pan tradicional, elaborado con trigo. Estas mejores características fueron atribuidas a la capacidad de estas proteínas de formar una red similar a la del gluten.

Con los mismos propósitos, se ha incluido en las formulaciones libres de gluten huevo en polvo. Moore y col. (2006) informaron la formación de una red proteica al incorporar huevo en polvo en formulaciones libres de gluten, luego de adicionar transglutaminasa como enzima polimerizante. Sin embargo, estos autores encontraron la formación de una red proteica antes de la incorporación de la enzima, y atribuyeron esta capacidad a las propiedades espumantes y emulsionantes de las proteínas del huevo.

2.5.3. Emulsionantes

Los emulsionantes son ingredientes lipídicos que funcionan tanto como estabilizantes de la masa -cuando el emulsionante interactúa con la fracción proteica de la misma-, como suavizantes de la miga -cuando se acomplejan con el almidón gelatinizado durante el horneado- (Goesaert y col., 2005). Han sido utilizados en la industria de la

panificación desde hace más de 60 años con el objetivo de retardar el endurecimiento de la miga (Pisesookbunterng y D'Appolonia, 1983). Este efecto se relaciona con la habilidad de los emulsionantes para formar complejos insolubles con la amilosa durante el horneado. Este complejo no participaría en la recristalización del almidón. Además, los emulsionantes reducen la absorción de agua por parte del almidón y su solubilización durante la gelatinización (Eliasson y Gudmundsson, 1996; Roach y Hoseney, 1995). De esta manera, la movilidad de los polímeros que forman parte del almidón se ve restringida, así como también la lixiviación de la amilosa, resultando en un menor grado de recristalinización durante el almacenamiento (Gray y BeMiller, 2003). La capacidad de los emulsionantes para retardar el endurecimiento de la miga está dada mayormente por su balance hidrofílico-lipofílico (HLB), y su potencia de ionización (Stampfli y Nersten, 1995; Armero y Collar, 1998), que influyen en su interacción con las proteínas y los gránulos de almidón intactos, o los polímeros que lo constituyen (amilosa y amilopectina). Además, mediante su agregado, los emulsionantes logran que la masa tolere mejor el trabajo realizado sobre ella durante el batido y la fermentación (Goesaert y col., 2005), y mejoran la estructura de la miga, obteniéndose un alveolado más fino y uniforme (Stampfli y Nersten, 1995). Retienen también el dióxido de carbono incorporado durante el batido, y disminuyen su liberación durante el horneado (Daniels y Fisher, 1976).

Autores como Onyango y col. (2009) evaluaron el efecto de diferentes emulsionantes sobre el endurecimiento de la miga en panes libres de gluten elaborados a partir de almidón pregelatinizado de mandioca y harina de sorgo. Ellos encontraron que todos los emulsionantes disminuyeron el endurecimiento de la miga, y obtuvieron mejores resultados mediante la incorporación de DATEM (éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico) y SSL (estearoil 2-lactilato de sodio).

El SSL es una sal de sodio del éster del ácido esteárico con el ácido láctico, cuya estructura química se muestra en la Figura I.13a. Posee un balance hidrofílico-lipofílico de 8,3. Por otro lado, el DATEM consta de éster del ácido acetil tartárico y un monoglicérido, y tiene un BHL de entre 8,5 y 9 (Figura I.13b).

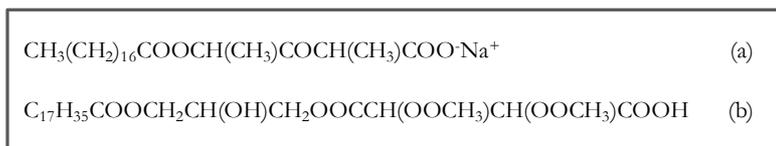


Figura I.13. (a) Estructura química del estearoil 2-lactilato de sodio (SSL), (b) estructura química del éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM).

2.5.4. Enzimas

Recientemente, la aplicación de enzimas en productos panificados ha sido estudiada como una herramienta para modificar la funcionalidad de las proteínas de las harinas libres de gluten y mejorar sus características panaderas al promover la formación de redes proteicas.

Moore y col. (2006) han demostrado que la incorporación de diferentes fuentes proteicas en combinación con la enzima transglutaminasa favorece la formación de una red continua capaz de mejorar la calidad tecnológica del pan. Sin embargo, se encuentra en la bibliografía cierta resistencia a la utilización de la transglutaminasa como aditivo alimentario, debido a que existe la posibilidad de que ésta genere los epitopes responsables de la celiaquía (Gerrard y Sutton, 2005), motivo por el cual su uso en el procesamiento de cereales no es seguro para pacientes celíacos (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca, 2008). Como alternativa, Gujral y Rosell (2004a) incorporaron glucosa oxidasa (GOX) como aditivo en un pan elaborado a base de arroz, obteniendo panes de mejor calidad que el pan control (sin glucosa oxidasa).

La glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) es una enzima que, en presencia de oxígeno, cataliza la oxidación de α -D-glucosa a α -D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura I.14a). La gluconolactona es hidrolizada a ácido glucónico por un mecanismo no enzimático. El mecanismo por el cual la glucosa oxidasa mejora la calidad del pan es aún controvertido. Diversos autores (Haarasilta y col., 1991, Primo-Martin y col., 2003, Rosell y col., 2003, Gujral y Rosell, 2004a) postularon que el H_2O_2 producido por la catálisis de la enzima causa la oxidación de los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas del gluten (Figura I.14b). Vemulapalli y Hosney (1998) encontraron que los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas solubles de trigo disminuían en presencia de

glucosa oxidasa; mientras que Gujral y Rosell (2004b) observaron el mismo efecto en las proteínas de arroz. Posteriormente, se describió que simultáneamente a la formación de puentes disulfuro, el H_2O_2 causaría la formación de enlaces ditirosina (Figura I.14c) entre las proteínas de la masa de trigo (Singh, 1991; Oudgenoeg y col., 2001; Tilley y col., 2001). Recientemente, Rasiah y col. (2005) informaron que el tratamiento de la harina de trigo con glucosa oxidasa resulta en el entrecruzamiento de la fracción de proteínas solubles en agua mediante enlaces disulfuro y no-disulfuro.

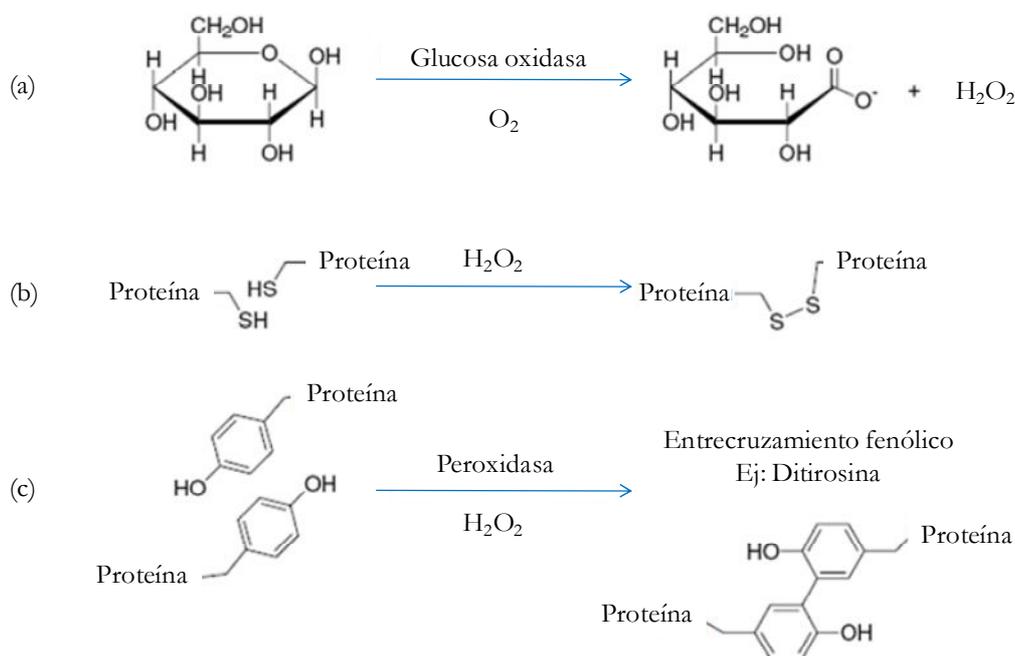


Figura I.14. (a) Reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa. (b) y (c) Dos posibles mecanismos propuestos para la acción polimerizante de la enzima glucosa oxidasa, vía puentes disulfuro (Vemulapalli y col., 1998) o uniones tipo fenólicas (Ameille y col., 2000), respectivamente.

Además de las enzimas polimerizantes, suelen utilizarse amilasas para mejorar las características del pan y para disminuir la velocidad de endurecimiento de la miga durante su almacenamiento.

La enzima α -amilasa (EC 3.2.1.1) hidroliza los enlaces α -(1-4) del almidón, produciendo α -dextrinas de bajo peso molecular (Bowles, 1996) (Figura I.15). Es sabido que su efecto positivo sobre la calidad del pan se debe a que incrementa el contenido de azúcares fermentables (Bowles, 1996) y de azúcares reductores. Los azúcares fermentables sirven de nutrientes para las levaduras aumentando la

producción de CO_2 , y esto lleva a un aumento en el volumen del pan; mientras que los azúcares reductores promueven la generación de los productos de la reacción de Maillard intensificando el sabor, el aroma y el color del pan (Drapron y Godon, 1987; Bowles, 1996).

Además, la acción de las amilasas, que causa modificaciones en la estructura del almidón, altera sus propiedades de reagrupamiento, ya que las dextrinas producidas por la hidrólisis enzimática dificultan la reorganización de las moléculas de amilopectina durante el almacenamiento (León y col., 1997a; Defloor y Delcour, 1999; Durán y col., 2001).

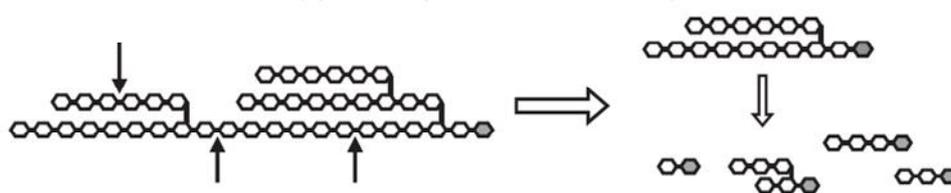


Figura I.15. Representación esquemática de la acción de la α -amilasa sobre los polímeros de almidón (amilopectina). El anillo gris representa el residuo de glucosa con extremo reductor libre. El resultado de la acción enzimática es la obtención de dextrinas lineales y/o ramificadas de bajo peso molecular. (Adaptado a partir de Goesaert y col., 2009).

La dificultad para la elaboración de panes sin gluten de buena calidad nos lleva a seguir investigando sobre la combinación de diferentes ingredientes y aditivos de distintas características, con el objeto de mejorar las propiedades organolépticas y tecnológicas de este producto. Al mismo tiempo, resulta prioritario lograr un mayor entendimiento sobre los mecanismos físico-químicos involucrados en estas matrices tan diversas.

Objetivo general

Estudiar el efecto de diferentes aditivos sobre la calidad y la conservación de panes libres de gluten, prestando fundamental atención a las interacciones que se establecen entre las diferentes moléculas que conforman las masas.

Objetivos específicos

- ❖ Evaluar el efecto de las diferentes mezclas de harinas para elaborar productos libres de gluten.
- ❖ Estudiar la interacción entre el almidón y las proteínas de las diferentes mezclas de harinas usadas en la elaboración de los productos.
- ❖ Evaluar el efecto de los aditivos sobre las interacciones físico-químicas que ocurren entre los componentes de las harinas usadas en la elaboración de panes libres de gluten.
- ❖ Determinar el efecto de los aditivos sobre las propiedades reológicas de la masa y la calidad del pan libre de gluten.
- ❖ Estudiar el efecto de los aditivos en el proceso de envejecimiento en productos libres de gluten con el fin de incrementar su vida útil.

Materiales y Métodos

1. Materiales

Harinas. Se utilizaron harina de arroz (Nora's Skills, Buenos Aires, Argentina), harina de maíz (ARCOR, San Pedro, Argentina), harina de soja micronizada inactiva deslipidizada (CPA, Hernando, Córdoba, Argentina), harina de soja micronizada activa entera (Argensoja, Bahía Blanca, Argentina), almidón de mandioca (Señor de Sipan, Buenos Aires, Argentina) y almidón de maíz (Señor de Sipan, Buenos Aires, Argentina).

Hidrocoloides. Se emplearon goma xántica, carragenato y alginato provistos por Saporiti S.A. (Buenos Aires, Argentina), y carboximetilcelulosa provista por Latinoquímica Amtex S.A. (Buenos Aires, Argentina). Todos los hidrocoloides fueron de grado alimenticio.

Proteínas. Se utilizó concentrado proteico de suero (Todo Droga, Córdoba, Argentina), con un contenido proteico total del 80%, y huevo pasteurizado en polvo (Ovoprot, Buenos Aires, Argentina).

Emulsionantes. Se utilizaron ésteres de monoglicéridos y del ácido diacetil tartárico (DATEM) y estearoil 2-lactilato de sodio (SSL) (Alpha emulsionantes, Río Tercero, Argentina), ambos de grado alimenticio.

Enzimas. Se trabajó con glucosa oxidasa (GOX, Gluzyme mono 10 000 U/g, de Novozyme, Dinamarca) y α -amilasa fúngica (AM, 10 000 skb, Novozyme, Dinamarca), ambas de grado analítico.

2. Métodos

2.1. Composición centesimal de las harinas

Proteínas. El contenido de nitrógeno de las muestras se determinó por medio del método de micro Kjeldahl modificado para ácido bórico. Se realizó una mineralización de 100 mg de muestra con H_2SO_4 a 400 °C en un bloque de digestión MB-6, Raypa (R. Espinar SL, Terrassa, España). El amonio resultante se destiló

(Destilador UDK 126, Velp Scientifica SRL, Usmate Velate, Italia) sobre ácido bórico y se tituló con HCl. El porcentaje de proteína total se calculó como $N \times 6,25$, a excepción de la harina de arroz, para la que se utilizó un factor de 5,9 (Método 46-13, AACC Internacional, 2000).

Humedad. El contenido de humedad se determinó por diferencia de peso en 2 g de harina exactamente medidos antes y después de calentar en estufa a 130 °C a presión atmosférica normal, durante 2 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje de agua perdida (Método 44-19, AACC Internacional, 2000).

Cenizas. El contenido de cenizas se determinó por diferencia de peso en 2 g de harina exactamente medidos, antes y después de calentar en mufla a 600 °C hasta peso constante (Método 08-03, AACC Internacional, 2000).

Fibra Cruda. Se determinó de acuerdo al método 32-10 (AACC Internacional, 2000), por medio de una digestión ácida (H_2SO_4 1,25%) seguida de una digestión alcalina (NaOH 1,25%).

2.2. Elaboración del pan

2.2.1. Formulación base

Los panes se elaboraron utilizando la siguiente formulación: 100 g de harina/almidón, 3 g de levadura prensada comercial (Calsa, Lanús, Argentina), 2 g de sal de mesa (Dos Anclas, Buenos Aires, Argentina) y 2 g de margarina (Dánica, Llavallol, Argentina). Se estudiaron dos sistemas diferentes: con alto contenido de agua (de 110 a 218% de agua, base harina), y con bajo contenido de agua (65% de agua, base harina). En el primer caso, la mezcla resultante fue un batido; mientras que en el segundo, se obtuvo una masa.

Se utilizaron las siguientes dosis de aditivos, en base harina:

Hidrocoloides (0,5%)

- Goma xántica (X)
- Carboximetilcelulosa (CMC)
- Alginato (Al)
- Carragenato (C)

Proteínas (5%)

- Concentrado proteico de lactosuero
- Huevo entero pasteurizado en polvo

Emulsionantes (1%)

- Ésteres de monoglicéridos y del ácido diacetil tartárico (DATEM)
- Estearoil 2-lactilato de sodio (SSL)

Enzimas

- GOX 0,003% (GOX 1) y 0,03% (GOX 2)
- α -Amilasa 0,0006% (Am1) y 0,001% (Am2)

Las dosis de aditivos utilizadas fueron seleccionadas a partir de una serie de ensayos previos.

2.2.2. Ensayos de Panificación

❖ Para obtener los panes con alto contenido de agua, se utilizaron harina de arroz, harina de maíz y harina de soja deslipidizada inactiva en diferentes proporciones. Se mezclaron los ingredientes sólidos, se incorporaron luego la margarina y la levadura dispersa en el agua. Se batió en una batidora planetaria (Arno, San Pablo, Brasil) por 1 min a 156 rpm y luego por 2 min más a 214 rpm. Luego, 75 g del batido resultante se vertieron en moldes de aluminio, se dejó fermentar por 60 min a 30 °C y 85% de humedad. Finalmente, se hornearon a 200 °C por 40 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Buenos Aires, Argentina), previa vaporización de agua en la superficie de las piezas de pan. Una vez horneados, los panes se dejaron enfriar por 2 h antes de llevar a cabo las determinaciones de calidad. Cada ensayo de panificación se realizó por duplicado.

❖ Para evaluar el efecto de diferentes aditivos sobre la calidad de panes con alto contenido de agua, se mezclaron los ingredientes sólidos incluidos los aditivos, luego se incorporaron la margarina y la levadura dispersa en el agua. Los ingredientes fueron mezclados 1 min a 130 rpm en una batidora planetaria (Kitchenaid, St Joseph, EUA), y luego 2 min a 200 rpm. Setenta y cinco g de la mezcla resultante se vertieron en moldes individuales de aluminio, se dejaron fermentar durante 1 h en un gabinete de fermentación a 30 °C y 80% de humedad (Hengel, Le Coteau, Francia). Luego se hornearon a 220 °C durante 40 min (horno MIWE, Arnstein, Alemania), previa vaporización de agua en la superficie de las piezas de pan. Una vez horneados, los panes se dejaron enfriar por 2 h antes de llevar a cabo las determinaciones de calidad. Cada ensayo de panificación se realizó por duplicado.

❖ Los panes con bajo contenido de agua se obtuvieron utilizando harina de arroz, almidón de mandioca y harina de soja activa entera. Se mezclaron todos los ingredientes y se batieron en una batidora planetaria (Arno, San Pablo, Brasil) por 1 min a 156 rpm y luego por 2 min más a 214 rpm. Se dejó fermentar por 30 min a 30 °C y 85% de humedad (primera fermentación, F1). Transcurrido este tiempo, se batió 1 min más a 156 rpm, y se pesaron 60 g de masa en moldes individuales de aluminio. Se dejaron fermentar por otros 30 min bajo las mismas condiciones (30 °C, 80% de humedad) (segunda fermentación, F2). Finalmente, se hornearon a 180 °C por 30 min en un horno rotatorio a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Buenos Aires, Argentina), previa vaporización de agua en la superficie de las piezas de pan. Una vez horneados, los panes se dejaron enfriar por 2 h antes de llevar a cabo las determinaciones de calidad. Cada ensayo de panificación se realizó por duplicado.

2.3. Evaluación de la calidad del pan

2.3.1. Volumen específico

El volumen de la pieza de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza. El volumen específico (VE) se obtuvo dividiendo el volumen de la muestra por su

peso. Se realizaron 3 determinaciones de cada lote de panificación, y se informó el valor promedio \pm desvío estándar de los dos ensayos de panificación.

2.3.2. Estructura de la miga

La estructura de la miga se evaluó a través de medidas de tamaño de alvéolo, mediante el análisis de imagen utilizando el software Image J 1,41o (National Health Institute, EUA). La imagen a color se convirtió en imagen de 8-bits (escala de grises) y se analizó en blanco y negro (0 negro, 255 blanco). Las imágenes de la miga están constituidas por píxeles que poseen información en escala de grises, donde los más oscuros corresponden a los alvéolos, y los más claros a las paredes alveolares. Se obtuvo un histograma de niveles de gris de cada imagen de 8-bits, utilizando el programa Image J. En general, una imagen en escala de grises compuesta por objetos oscuros y distintivos en un fondo claro, contiene regiones homogéneas con límites bien definidos que conducen a un histograma bimodal con dos picos de intensidad bien definidos. Los dos picos corresponden a los puntos que se encuentran dentro y fuera del objeto. La hendidura o intersección entre ambos picos corresponde al valor de gris de los puntos que se encuentran en el borde del objeto. Este valor de gris se toma como umbral, y los píxeles con un valor de gris mayor se asocian al fondo (claro), mientras que los píxeles con un valor menor al umbral corresponderán al objeto (oscuro) (Figura M.1). Sin embargo, en imágenes tomadas de la miga del pan, la transición alvéolo/fondo no es uniforme. Para obtener un umbral representativo en la escala de grises, el histograma obtenido fue deconvolucionado en dos picos Gaussianos, y luego ajustados (con un coeficiente de regresión $R^2 > 0,993$) utilizando el programa PeakFit v4 (Jandel Scientific, San Rafael, EUA). La intersección entre las dos curvas Gaussianas fue seleccionada como el valor umbral de gris. Se obtuvo un valor para cada imagen analizada, donde los píxeles con un valor de gris mayor al umbral fueron asociados a la pared de los alvéolos, mientras que aquellos con un valor menor se consideraron alvéolo.

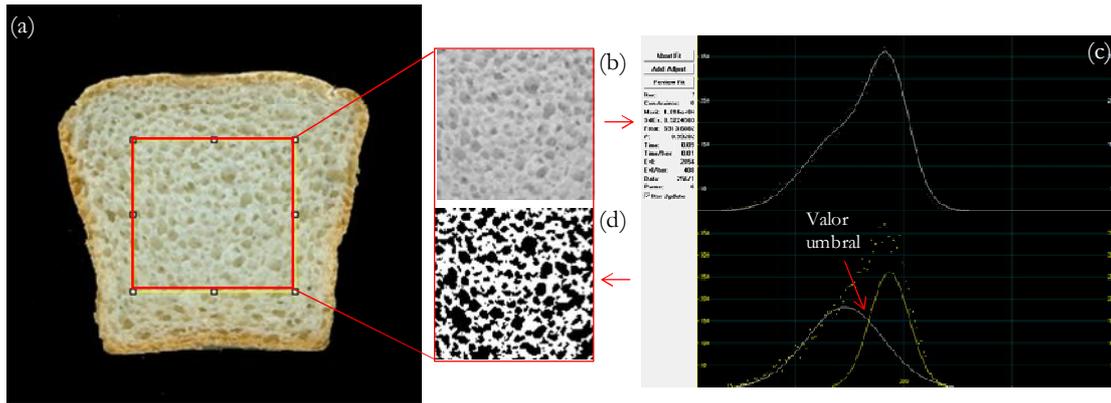


Figura M.1. Fotografía de un pan, mostrando el área seleccionada para el análisis de imagen (a). Esta selección es luego transformada en imagen de 8-bits (b). A partir de esta imagen se obtiene un histograma de los valores de gris, que es deconvolucionado para obtener dos curvas; el punto de intersección entre ambas se considera el valor de gris umbral. Todos los píxeles con un nivel de gris por encima de este valor de umbral son convertidos en blanco (miga de pan), y por debajo del umbral en negro (alvéolos) (c). Tras la aplicación de este umbral, se binariza la imagen de 8-bits, obteniéndose la imagen mostrada en (d).

Para analizar la estructura de la miga se obtuvieron dos rodajas (1,5 cm de espesor) de la región central de cada pan y cada rodaja fue escaneada con un escáner fotográfico (HP Scanjet G3010, Palo Alto, EUA). La imagen en formato de archivo TIFF se analizó con el programa de análisis de imágenes Image J 1,41o (National Institutes of Health, EUA). Se seleccionó manualmente de la parte central de la rodaja un área de igual tamaño en todos los panes, que fue representativa de la miga total de cada rodaja. Del análisis de las imágenes se obtuvieron los siguientes parámetros:

- ❖ Tamaño promedio de alvéolo: área promedio de los alveolos. Área de un alvéolo = número de píxeles que forman al alvéolo multiplicado por el área de un pixel.
- ❖ Número total de alvéolos: cantidad de alvéolos por unidad de superficie de miga de pan.
- ❖ Área relativa de alvéolos: es el porcentaje del área total que corresponde al área ocupada por alvéolos. Relación entre el área total ocupada por alvéolos y el área total analizada.

❖ Uniformidad: es la relación entre el número de alvéolos pequeños ($0,15 < x < 2,00 \text{ mm}^2$) y el número de alvéolos mayores ($2,00 < x < 10,00 \text{ mm}^2$).

2.3.3. Textura de la miga

El análisis de la dureza de la miga se determinó de acuerdo al método 74-09 (AACC Internacional, 2000). El pan se cortó longitudinalmente con el objeto de extraer dos rodajas de 1,5 cm de espesor del centro de cada pieza. Se llevó a cabo un perfil de textura (TPA) usando un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) equipado con la celda de compresión de 25 kg y un émbolo de penetración de 25 mm de diámetro. El ensayo se realizó a una velocidad de 5 mm/s y una compresión máxima de 40%. El centro de cada rodaja de pan se sometió a dos ciclos de compresión - descompresión para obtener la curva de TPA característica a partir de la cual se obtuvo la dureza de la miga, calculada por el programa Texture Expert (versión 1,22, 1999). La *dureza* (Figura M.2) se definió como la fuerza máxima que tiene lugar en cualquier tiempo durante el primer ciclo de compresión (Bourne, 1978). En el caso de la miga, se obtuvo para el primer ciclo un solo pico cuya fuerza máxima coincidió con la dureza o firmeza de la misma. Para evaluar el perfil de endurecimiento de la miga, el TPA se realizó 2 horas luego de horneado el pan (día 0), también 24 h (día 1) y 72 h (día 3) después de horneado. Los panes fueron almacenados en bolsas plásticas selladas, en una sala con temperatura controlada (25 °C). La velocidad de endurecimiento se obtuvo calculando la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de los tres puntos de medición.

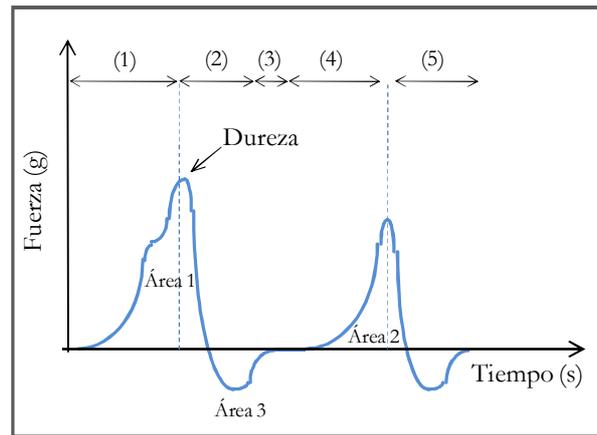


Figura M.2. Curva típica de un análisis de perfil de textura (TPA). (1) Primera compresión, (2) primera descompresión, (3) tiempo de espera entre ambos ciclos de compresión, (4) Segunda compresión, (5) segunda descompresión.

2.3.4. Color de la corteza

En las determinaciones de color se utilizó un espectrofotómetro CM-508d Minolta (Ramsey, Nueva Jersey, EUA) que provee un valor específico de color basado en la cantidad de luz reflejada fuera de la superficie del producto o transmitida a través del mismo. Las mediciones se realizaron según el método 14-22 (AACC Internacional, 2000) utilizando 8 mm de apertura de la medición y un iluminador D65. El espectrofotómetro fue calibrado antes de cada ensayo con un plato estándar blanco. De cada ensayo de panificación se tomaron 3 panes, a los que se les efectuaron 5 mediciones de color en la corteza informándose el valor promedio. Como medida objetiva del color se utilizó el sistema Cie-Lab (C.I.E., 1986), que define cada color a partir de tres coordenadas denominadas L^* , a^* y b^* . Las magnitudes L^* , a^* y b^* son adimensionales y se definen en función del tipo de estímulo y del blanco de referencia para tratar de simular a los observadores reales (Joshi y Brimelow, 2002). La coordenada L^* recibe el nombre de luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas colorimétricas que forman un plano perpendicular a la luminosidad, siendo, a su vez, perpendiculares entre sí (Figura M.3). El corte del eje L^* con el plano que forman a^* y b^* es el punto acromático. El valor a^* es una medida de la intensidad de color rojo, hacia valores positivos se observan los colores rojos y para valores negativos, los

verdes. El valor b^* es una medida de la intensidad de color amarillo, hacia valores positivos se observan los amarillos, y para valores negativos, los azules (Figura M.3).

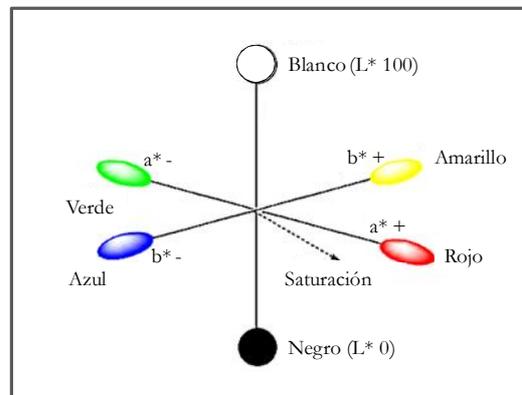


Figura M.3. Representación gráfica del espacio CIE Lab.

2.4. Propiedades de las masas/batidos

2.4.1. Resistencia de los batidos a la extrusión

Los batidos con alto contenido de agua se prepararon mezclando los ingredientes sólidos, a los que se les incorporó la margarina, los aditivos cuando correspondió, y finalmente el agua. Se batió por 3 min a 214 rpm. Luego, se colocó en los vasos de extrusión un volumen constante de batido, y las burbujas de aire fueron removidas con una cuchara. La fuerza de extrusión se determinó usando un texturómetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) equipado con una celda de 25 kg y un accesorio A/BE para extrusión inversa. El ensayo se llevó a cabo a una velocidad de 1 mm/s hasta una distancia de 25 mm. La fuerza medida al comienzo de la extrusión (Texture Expert, versión 1,22, 1999) fue considerada como una medida de la resistencia de los batidos (Figura M.4). La preparación del batido se llevó a cabo por duplicado, y se realizaron tres determinaciones por cada lote.

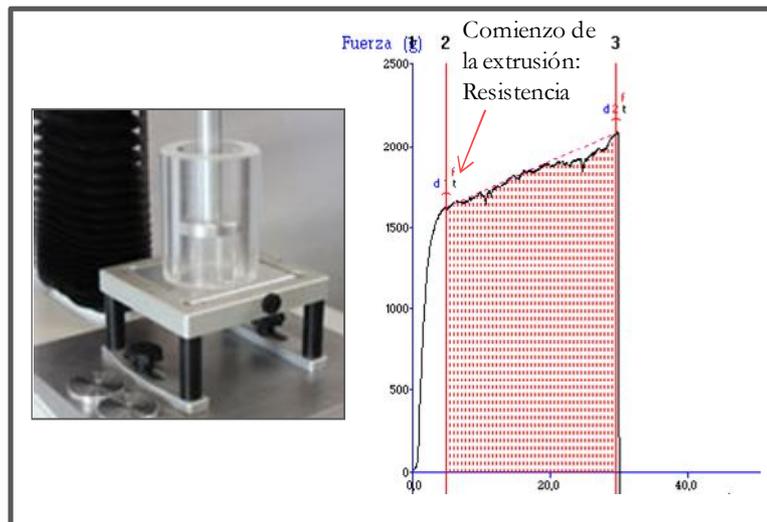


Figura M.4. Curva modelo de un ensayo de extrusión. La fuerza necesaria para que el batido comience a extrudirse se tomó como parámetro de la resistencia del mismo.

2.4.2. Resistencia de las masas a la penetración

La fuerza necesaria para penetrar las diferentes masas con bajo contenido de agua se determinó utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Las masas se elaboraron de la misma manera que para la obtención de panes, y se pesaron 40 g de masa en frascos plásticos. El ensayo se llevó a cabo tanto al final de la primera fermentación como al final de la segunda. Para las mediciones, se utilizó una sonda de 35 mm de diámetro, y se comprimió la masa hasta que la sonda penetró en las mismas. En la Figura M.5 se presenta una curva representativa del ensayo de penetración.

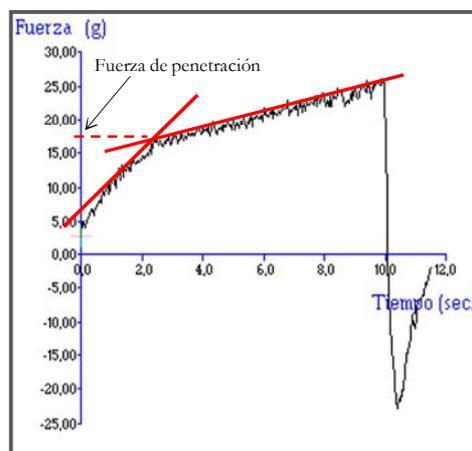


Figura M.5. Curva típica de un análisis de penetración. La intersección entre ambas rectas se consideró de fuerza necesaria para que el émbolo penetre en la masa.

En la primera porción de la curva, se considera que la sonda comprime la masa sin romperla, hasta que se llega a una fuerza umbral donde esa resistencia se quiebra, y la sonda comienza a penetrar en la muestra. Para obtener este valor umbral, se llevaron a cabo dos regresiones lineales en cada región de la curva, obteniendo dos rectas que representaron el comportamiento ideal de la masa. La intersección de ambas rectas se consideró como la resistencia de la masa a la penetración bajo condiciones ideales (Figura M.5). El porcentaje de reducción de la resistencia luego de la primera y la segunda fermentación fue considerado como una medida de la estabilidad de las masas frente a la fermentación (Ecuación 1).

$$\% \text{ de Reducción} = \frac{(\text{Fermentación 1} - \text{Fermentación 2})}{\text{Fermentación 1}} \times 100 \quad (1)$$

La preparación de la masa se llevó a cabo por duplicado, y se realizaron tres determinaciones por cada lote.

2.4.3. Reología

En los ensayos reométricos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante y se mide como respuesta la tensión generada dentro de la muestra, como el esfuerzo de corte. Los materiales responden a la deformación aplicada disipando energía en forma de calor (disipación viscosa); almacenando energía elástica; o a través de la combinación de ambos mecanismos. El análisis dinámico mecánico permite medir ambos tipos de propiedades.

El comportamiento elástico está representado por la ley de Hooke (2), mientras que el viscoso sigue la ley de Newton (3). Las leyes mencionadas describen dos extremos.

$$\tau_E = G \gamma_E \quad (2)$$

$$\tau_V = \eta \dot{\gamma}_V \quad (3)$$

Donde τ es el esfuerzo de corte, G es el módulo constante del resorte, γ_E es la deformación, η es la viscosidad y $\dot{\gamma}_V$ es la velocidad de corte.

La mayoría de los materiales muestran los dos tipos de comportamiento, y en consecuencia, son llamados viscoelásticos. Para caracterizar tales materiales deben considerarse los dos tipos de respuesta.

La ecuación para una deformación oscilatoria de una muestra puede escribirse como:

$$\gamma = \gamma_0 \text{ sen } \omega t \quad (4)$$

Donde γ_0 es la deformación máxima o amplitud y ω la velocidad angular.

Si se reemplaza la Ecuación 4 en la Ecuación 2, se obtiene una función seno (Ecuación 5) para el esfuerzo de corte resultante que actúa sobre el resorte, indicando que la deformación aplicada y el esfuerzo de corte elástico se encuentran en fase. Derivando la Ecuación 4 respecto del tiempo y reemplazando en la Ecuación 3 se obtiene una función coseno para el esfuerzo de corte viscoso (Ecuación 6) que se encuentra 90° fuera de fase con respecto a la deformación aplicada.

$$\tau_E = G \gamma_0 \text{ sen } \omega t \quad (5)$$

$$\tau_V = \eta \omega \gamma_0 \text{ cos } \omega t \quad (6)$$

La medida de la diferencia de fase entre la deformación aplicada y el esfuerzo de corte de la respuesta indica la viscoelasticidad de la muestra. Si la diferencia de la fase es 0° la sustancia es puramente elástica, por el contrario, si es 90° la muestra es puramente viscosa. Si la diferencia se encuentra entre estos dos valores es viscoelástica.

La relación entre la amplitud del esfuerzo de corte y la deformación máxima se denomina módulo complejo, G^* . Este es una medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada.

$$G^* = \tau_0 / \gamma_0 \quad (7)$$

La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo elástico o de almacenamiento, G' , y la energía disipada en el elemento viscoso por el módulo viscoso o de pérdida, G'' .

$$G' = G^* \text{ cos } \delta \quad (8)$$

$$G'' = G^* \text{ sen } \delta \quad (9)$$

Donde δ es el ángulo de desfase entre el esfuerzo de corte y la deformación. Si la muestra es puramente elástica, $\delta=0^\circ$, $G^*=G'$ y $G''=0$. Por el contrario, si es puramente viscosa, $\delta=90^\circ$, $G^*=G''$ y $G'=0$.

La viscosidad compleja (η^*) es una función alternativa al G^* , es una medida de la magnitud de la resistencia total de la muestra al corte dinámico, y se define como:

$$\eta^* = G^*/\omega = \tau_0/\gamma_0 \omega \quad (10)$$

Otra función que se utiliza habitualmente para describir el comportamiento viscoelástico de un material es la tangente del ángulo de desfase. Esta se define como:

$$\tan \delta = G''/G' \quad (11)$$

La mayoría de los reómetros poseen tres parámetros a controlar, frecuencia de oscilación, amplitud de la deformación y temperatura. Un análisis típico mantiene dos de estos parámetros constantes mientras varía el tercero.

❖ Para los batidos elaborados con alto contenido de agua en las que se ensayó el efecto de diferentes aditivos, las medidas oscilatorias dinámicas se realizaron en un reómetro dinámico AR 1000-N (TA Instruments, Crawley, Reino Unido).

Los batidos se prepararon de la misma manera que para la fabricación de panes, pero sin la incorporación de levadura. El batido se dejó reposar por 15 min y luego se colocó en el reómetro, removiéndose cuidadosamente el exceso de muestra. Para evitar la evaporación del agua durante el ensayo, los bordes expuestos fueron recubiertos con vaselina. Antes de comenzar con el ensayo, la muestra se dejó reposar por 5 min, para permitir la relajación de las fuerzas remanentes antes de la medición. La temperatura durante el ensayo fue controlada utilizando un baño termostatzado (Tempette Junior TE-8J, Techné, Scientrier, Francia).

Los ensayos realizados fueron:

Barrido de frecuencia. Se realizó un barrido de frecuencia de 0,1 a 10 Hz y a una deformación de 0,1%. Este valor de deformación correspondió al rango de

comportamiento viscoelástico lineal de las muestras, determinado previamente mediante un barrido de deformación desde 0,01 a 100%, a una frecuencia de 1 Hz. Los barridos de frecuencia se llevaron a cabo a 30 °C, con una geometría cono-plato (60 mm de diámetro y un ángulo de 4°). La preparación de los batidos se realizó por triplicado, y se realizaron tres determinaciones por cada lote.

Viscosidad aparente. La viscosidad aparente fue calculada a partir de una curva de velocidad de corte *vs* esfuerzo de corte. El ensayo se llevó a cabo a una temperatura de 30 °C, y la velocidad de corte varió desde 0,02 a 100 1/s. Se utilizó a tal fin una geometría de plato rugoso de 40 mm de diámetro, a 1 mm de distancia del plato. La preparación de los batidos se realizó por triplicado, y se realizaron tres determinaciones por cada lote.

❖ Para las masas elaboradas con bajo contenido de agua, se utilizó un reómetro dinámico (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania).

Las masas se prepararon de la misma manera que para la fabricación de panes, pero sin la incorporación de levadura. Para determinar el rango de viscoelasticidad lineal de las masas se realizaron barridos de deformación (0,1-100%) a una frecuencia constante de 1 Hz. Determinado el rango lineal, se realizaron barridos de frecuencia, de 0,1 a 10 Hz para analizar el comportamiento viscoelástico de las masas, a una temperatura de 30 °C y una deformación constante de 0,05%; se utilizó una geometría plato-plato de 25 mm de diámetro y una distancia de 2 mm entre ambos platos. La colocación de las masas en el reómetro se llevó a cabo de la misma manera que para los batidos con alto contenido de agua. La preparación de las masas se realizó por triplicado, y se realizaron tres determinaciones por cada lote.

2.4.4. Seguimiento de la fermentación de las masas con bajo contenido de agua

Para las masas con bajo contenido de agua se realizó el seguimiento de la fermentación tomando fotos digitales con una cámara MOTICAM 2000 adosada a una lupa MOTIC SMZ-168 (Motic, Xiamen, China) con un aumento de 7,5x. Para

ello, las masas se elaboraron de la misma manera que para la fabricación de pan. Brevemente, se mezclaron los ingredientes sólidos, se agregó el agua y se batió por 3 min. Una fracción de masa se colocó entre dos placas de acrílico separadas por una distancia de 1 mm. Las placas se colocaron bajo la lupa y se tomaron fotografías cada 5 min (Figura M.6). Este proceso simuló la primera fermentación. Mientras tanto, el remanente de la masa fue colocada en una cámara de fermentación (30 °C, 85% de humedad) por 30 min. Luego de este tiempo, se batió nuevamente por 1 min y se colocó una nueva fracción de masa entre las dos placas acrílicas, que fueron nuevamente colocadas bajo la lupa para tomar las fotografías. Este proceso simuló la segunda fermentación.

Las imágenes de las masas al finalizar ambas fermentaciones (30 min) fueron analizadas con el programa Image J 1,41o. La imagen de color se convirtió a imagen en escala de grises (8-bits) y se analizó en blanco y negro (0 negro, 255 blanco). La segmentación de la imagen (conversión a imagen binaria) la realizó el programa por selección automática del valor del umbral. Este método de selección del valor umbral representó satisfactoriamente los rasgos fundamentales de las imágenes.

Se determinaron: tamaño promedio de alvéolos (mm^2), número de alvéolos por mm^2 y fracción de la imagen ocupada por aire (%).

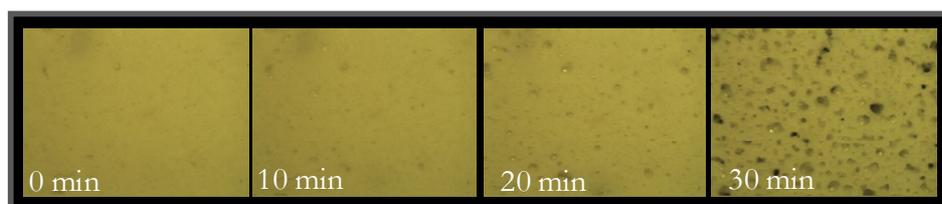


Figura M.6. Imágenes de la masa durante la fermentación (7,5x). Las imágenes obtenidas a los 30 min fueron analizadas con el programa ImageJ 1,41o.

2.4.5. Caracterización de la fracción proteica de las masas

Las masas con bajo contenido de agua se elaboraron de la misma manera que para la fabricación de pan. Se llevaron a cabo extracciones de proteínas a partir de la masa inmediatamente luego del batido. Se pesaron 100 mg de masa en tubos de centrífuga de 1,5 mL de capacidad. Se utilizaron dos soluciones de extracción: solución tampón

TRIS/HCl 0,5 M, pH 8,8; y solución tampón de TRIS/HCl + 2% SDS. La relación masa:solvente fue de 1:10 (p/v). Los tubos se agitaron por 30 min y se centrifugaron 20 min a 3000x g. El sobrenadante fue mezclado con solución tampón de muestra (0,063 M Tris/HCl, pH 6,8; 1,5% p/v SDS, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromofenol) y las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras. Las electroforesis se realizaron en placa (70 x 80 mm) en geles de 75 mm de espesor, de acuerdo al sistema de tampón discontinuo de Laemmli (1970). Las subunidades proteicas se analizaron mediante un procedimiento de electroforesis en gel con un concentrador (*stacking*) y un separador, con 4% y 12% de acrilamida, respectivamente.

Se utilizó un equipo Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad laboratories, Filadelfia, EUA). Las corridas se hicieron con voltaje constante (150 V), hasta que el marcador del frente alcanzó el final del gel (aproximadamente 90 min).

Se utilizaron como marcadores de masa molecular una mezcla constituida por miosina (200 000), β -galactosidasa (116 250), fosforilasa- β (97 400), albúmina sérica (66 200), ovoalbúmina (45 000), anhidrasa carbónica (31 000), inhibidor de tripsina (21 500) y lisozima (14 400) (Bio-Rad laboratories, Filadelfia, EUA).

Los geles fueron teñidos con 0,25% p/v azul brillante de *coomassie* en una solución de metanol:agua:ácido acético (4:5:1 v/v) y fueron desteñidos en el mismo solvente.

2.4.6. Caracterización del almidón

❖ **Calorimetría diferencial de barrido (DSC).** La calorimetría diferencial de barrido es una técnica en la cual la muestra en estudio y el material de referencia se someten a un programa controlado de temperatura y se mide la diferencia de energía entre ambos, en función de la temperatura alcanzada. En este trabajo, luego de cada corrida se obtuvieron el cambio de entalpía (ΔH) y las temperaturas de transición. La calibración de equipo se realizó utilizando indio y la referencia utilizada fue una cápsula vacía con tapa de aluminio. Se realizaron un mínimo de dos determinaciones de cada lote, que se informaron como valor promedio \pm desvío estándar.

Gelatinización del almidón

Las harinas, almidones y las mezclas empleadas para la elaboración de panes libres de gluten fueron caracterizados con un calorímetro DSC 823 (Mettler-Toledo, Zurich, Suiza). Para evaluar el perfil de gelatinización de los distintos batidos con alto contenido de agua, se prepararon las mezclas de harina con la misma cantidad de agua utilizada en cada caso para la elaboración de los panes, y se realizó un barrido de temperatura de 30 °C a 110 °C a una velocidad de 5 °C/min. Para las determinaciones calorimétricas de las masas con bajo contenido de agua, se elaboró la masa según el procedimiento para la fabricación de pan, pero eliminando la margarina. Se dejó fermentar (30 °C, 85% de humedad) por 60 min. Se pesaron aproximadamente 30 mg de masa en cápsulas de aluminio de 100 µl de capacidad que fueron selladas herméticamente. Se calentaron en el calorímetro a temperaturas similares a las medidas en el centro de la miga durante el proceso de horneado, con el objetivo de “hornear” la masa en el calorímetro. Para simular el perfil de temperatura en el centro de la miga de pan durante el horneado, los experimentos se llevaron a cabo mediante el siguiente programa de temperatura: estabilización por 2 min a 30 °C, calentamiento desde 30 °C hasta 110 °C a una velocidad de 11,7 °C/min, y por último estabilización por 5 min a 110 °C (León y col., 1997a).

Retrogradación de la amilopectina

Para analizar la retrogradación de la amilopectina, las masas con bajo contenido de agua gelatinizadas en el calorímetro se dejaron enfriar, y se almacenaron por 7 días a 4 ± 1 °C. Las muestras fueron calentadas nuevamente en el DSC desde 30 °C a 120 °C, a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min.

❖ **Propiedades de *pasting* (RVA)**

El cambio de viscosidad durante el calentamiento de 30 a 95 °C refleja la capacidad del almidón de retener agua e hincharse en este proceso, provocando un concomitante aumento en la viscosidad. La viscosidad de la pasta aumenta hasta el punto donde el número de gránulos hinchados es máximo, alcanzando la viscosidad

de pico (VP), que es indicativa de la capacidad de retener agua (Thomas y Atwell, 1999). A medida que la temperatura aumenta y los gránulos absorben suficiente agua como para romperse, se observa una disminución en la viscosidad. Esta disminución recibe el nombre de *breakdown* (BD). Cuando el almidón gelatinizado se enfría, la amilosa retrograda produciendo un nuevo aumento en la viscosidad, llamado *setback* (SB) (Figura M.7).

Las propiedades de *pasting* de las harinas y sus mezclas, para la obtención de panes con alto contenido de agua, fueron llevadas a cabo en un viscoanalizador (RVA-4; Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia). Se colocaron 3 g de muestra (base seca) en el recipiente y se agregaron $25 \pm 0,1$ mL de agua destilada. La mezcla se calentó hasta $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, luego se calentó hasta $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $9,4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mientras se mezclaba a una velocidad de 960 rpm. Se mantuvo a esta temperatura por 2,5 min y finalmente se dejó enfriar a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $11,8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A partir de la curva de *pasting* se obtuvieron la temperatura de pasta (T_p), la viscosidad de pico (PV), la viscosidad final (FV), el *breakdown* (BD) y el *setback* (SB).

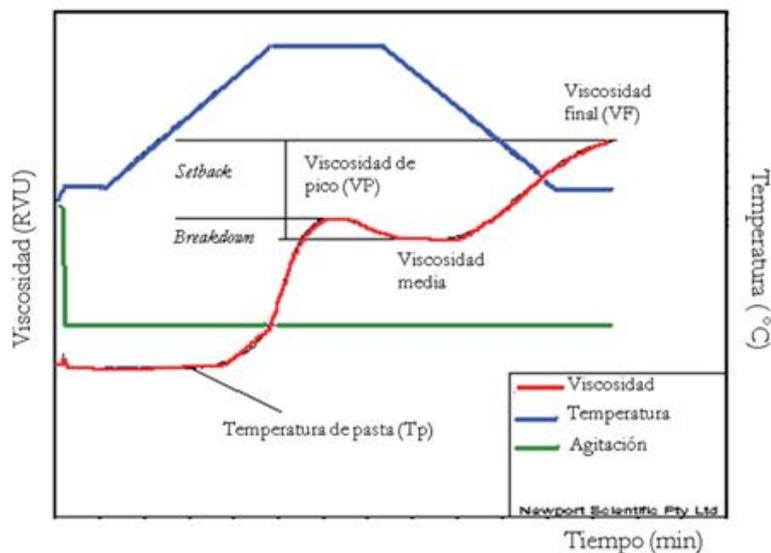


Figura M.7. Curva modelo representando las propiedades de *pasting* de una suspensión de harina en función del tiempo y la temperatura.

2.4.7. Agua congelable

Para determinar la fracción de agua congelable de los batidos elaborados con alto contenido de agua se utilizó un calorímetro DSC 823 (Mettler-Toledo, Zurich, Suiza). Las muestras se prepararon mezclando las harinas a evaluar con la cantidad correspondiente de agua. Se tomó una pequeña porción de muestra (≈ 30 mg) y se colocó en la cápsula de aluminio previamente pesada y se selló herméticamente. Luego, se calentó desde -50 °C a 130 °C a una velocidad de 10 °C/min. La fracción de agua congelable fue obtenida a partir del pico de endoterma alrededor de los 0 °C, correspondiente a la fusión del hielo. La relación entre la entalpía de la fusión del hielo y el calor latente de la fusión del hielo (334 J/g) fue calculada para determinar la fracción de agua congelable de las masas (Hamdami y col., 2004).

2.5. Caracterización del sistema almidón/harina de soja

Para estudiar las interacciones que se establecen en las masas con bajo contenido de agua, se seleccionaron cuatro sistemas:

- ❖ Almidón de mandioca/harina de soja activa (Md/HSA)
- ❖ Almidón de mandioca/harina de soja inactiva (Md/HSI)
- ❖ Almidón de maíz/harina de soja activa (Maíz/HSA)
- ❖ Almidón de maíz/harina de soja inactiva (Maíz/HSI)

Las mezclas se realizaron con un 90% de almidón y un 10% de harina de soja, de modo tal que se respeten las proporciones de las masas elaboradas con bajo contenido de agua.

2.5.1. Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua se realizó siguiendo el método 88-04 (AACC Internacional, 2000). Se consideraron las harinas de soja y los almidones de maíz y de mandioca por separado como controles, y las diferentes mezclas almidón/harina de soja. Aproximadamente $0,5$ g de los sólidos se mezclaron con 1 mL de agua destilada. Luego, las muestras fueron centrifugadas ($1000xg$, 20 min), y el sobrenadante se

descartó. La cantidad de agua absorbida (g) se calculó por diferencia. Las determinaciones se llevaron a cabo al menos por duplicado.

2.5.2. Sinéresis

La capacidad de las distintas harinas y mezclas de ligar agua fue evaluada mediante el ensayo de sinéresis. Se consideraron las harinas de soja y los almidones de maíz y de mandioca por separado como controles, y las diferentes mezclas almidón/harina de soja. Las muestras se prepararon mezclando 50 g de harina/almidón con 40 mL de agua destilada. Se batieron 3 min con una batidora Philips a velocidad 3. Luego, las masas se dejaron reposar durante 15 min. Se colocaron aproximadamente 0,5 g de la masa resultante en tubos de centrífuga de 1,5 mL de capacidad, y se centrifugaron a 16 000 xg por 20 min a temperatura ambiente. Se tomó el peso de la muestra antes y después de centrifugar y descartar el agua separada. El agua separada se expresó como porcentaje del agua total en la mezcla. La determinación se realizó por triplicado.

2.5.3. Reología

Para la evaluación reométrica de las mezclas almidón/harina de soja, se elaboraron las muestras de acuerdo al punto 2.5.2 y se dejaron reposar 15 min antes de comenzar el ensayo; para tal fin se utilizó un reómetro dinámico (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania). Se realizaron barridos de frecuencia para analizar el comportamiento viscoelástico de las mezclas. Para ello se utilizó una geometría plato-plato, con un diámetro de 25 mm. La muestra se colocó entre los platos que se situaron a 2 mm uno de otro, y el exceso fue cuidadosamente removido. Los bordes expuestos fueron cubiertos con vaselina para evitar la deshidratación de la muestra. Antes de comenzar con el barrido de frecuencia, la masa se dejó reposar por 5 min para permitir la relajación de los esfuerzos residuales. El ensayo se realizó en un rango de frecuencias de 0,1 a 10 Hz, a una deformación constante (0,05%) que corresponde al rango viscoelástico lineal de las muestras, y una temperatura de 30 °C. Los barridos de frecuencia se determinaron por duplicado, sobre masas diferentes.

2.5.4. Extracción de proteínas

Para analizar la interacción almidón-proteínas, las masas se prepararon de la misma manera que se describió en el ítem 2.5.1. Se liofilizaron y los lípidos fueron removidos antes de la extracción de proteínas. La extracción de proteínas se llevó a cabo con una solución tampón de fosfato (0,05 M, pH 6,9); se utilizó una relación de 1,5 g de muestra:10 mL de solución tampón para las muestras que consistían en mezclas de almidón-soja; y 0,15 g de muestra:10 mL de solución tampón para las muestras que consistían sólo en harina de soja. Estas relaciones fueron seleccionadas de manera tal de obtener una concentración final de 4 mg de proteína/mL de solución. Luego, las muestras se agitaron por 2 h y se centrifugaron por 10 min (1000 xg). El sobrenadante se transfirió a un tubo de centrífuga de 10 mL de capacidad, y se almacenaron a 4 °C hasta ser analizados por HPLC.

2.5.5. Cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión molecular (HPLC-SE)

La cromatografía se llevó a cabo utilizando un sistema HPLC LC 10 A Shimadzu (corporación Shimadzu, Kyoto, Japón) y una columna Bio-Sil SEC-400-5 (BioRad Inc., Hercules, EUA), de 300 x 7,8 mm.

Las muestras se analizaron un día después de haberse realizado la extracción de proteínas. Todas las muestras y solventes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm (Millipore, Massachusetts, EUA). Se inyectaron 20 µL de cada muestra en la columna, y las proteínas se detectaron a 214 nm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo (50%) conteniendo 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en agua milli Q. El flujo fue mantenido a 1 mL/min, y la temperatura de corrida fue mantenida en 26 °C. Todas las muestras se analizaron al menos por triplicado.

2.5.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Gelatificación del almidón

Para las determinaciones en el calorímetro, se mezclaron manualmente 4,5 g de almidón y 0,5 g de harina de soja, y se agregaron 3,25 mL de agua. La masa se dejó reposar 30 min para permitir la hidratación de los componentes. Luego se pesaron

40,0 ± 0,5 mg en cápsulas de aluminio de 100 µL de capacidad y se dejaron reposar por otros 30 min. Transcurrido ese tiempo, las cápsulas fueron calentadas en el calorímetro de 30 a 110 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Se obtuvieron las temperaturas de la transición, así como el ΔH de la misma. Las masas se realizaron por duplicado, y se prepararon tres cápsulas por cada lote.

Retrogradación de la amilopectina

Para analizar la retrogradación de la amilopectina, las muestras gelatinizadas en el calorímetro, se dejaron enfriar y se almacenaron durante 7 días a 4 ± 1 °C. Transcurrido ese tiempo, las cápsulas fueron llevadas a temperatura ambiente y finalmente calentadas en el calorímetro, de 30 a 120 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min.

2.5.7. Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una de las herramientas más importantes para la caracterización de sólidos. Los rayos X son radiaciones electromagnéticas de una longitud de onda (λ) cercana a 0,1 nm, longitud comparable a los espaciamientos moleculares en un cristal y cercana a la longitud de un átomo. Estas radiaciones se encuentran en la zona del espectro electromagnético entre los rayos gama y los ultravioleta. Los sólidos cristalinos presentan patrones únicos de difracción de rayos X que pueden ser utilizados para su identificación. Esta técnica se utiliza también para determinar la estructura cristalina de los materiales, es decir, para establecer cómo están empaquetados los átomos y las distancias interatómicas que los separan.

En este caso, se estudió el patrón de cristales de almidón de mezclas almidón/harina de soja previamente gelatinizadas y retrogradadas. Las masas se elaboraron a partir de 50 g de mezcla almidón/harina de soja y 50 mL de agua destilada. Se batió por 3 min, y se pesaron 30 ± 1 g de la masa resultante en frascos de vidrio con tapa. Inmediatamente, los frascos se colocaron en un baño a 100 °C por 1 h (bajo estas condiciones se aseguró la gelatinización completa del almidón); se agitó con una varilla de vidrio cada 5 min durante la primera media hora, y cada 15 min durante la

segunda media hora. El gel resultante se almacenó a 4 ± 1 °C por 7 días. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas, molidas y sometidas al estudio de difracción.

Los patrones de difracción de rayos X fueron obtenidos utilizando un difractómetro Philips PW3020 (Eindhoven, Holanda) con una radiación de Cu ($\lambda=1,5406$ Å), a 40 kV y 30 mA. El barrido de ángulo de difracción (2θ) fue realizado de 2° a 40° , a una velocidad de $0,005^\circ/\text{s}$. Para la cuantificación de la cristalinidad, se realizó una deconvolución del difractograma (Peakfit, Jandel Scientific, San Rafael, EUA) (Figura M.8). Las curvas de la fase cristalina y la fase amorfa así obtenidas, fueron integradas, y se calculó el área relativa de ambas fases.

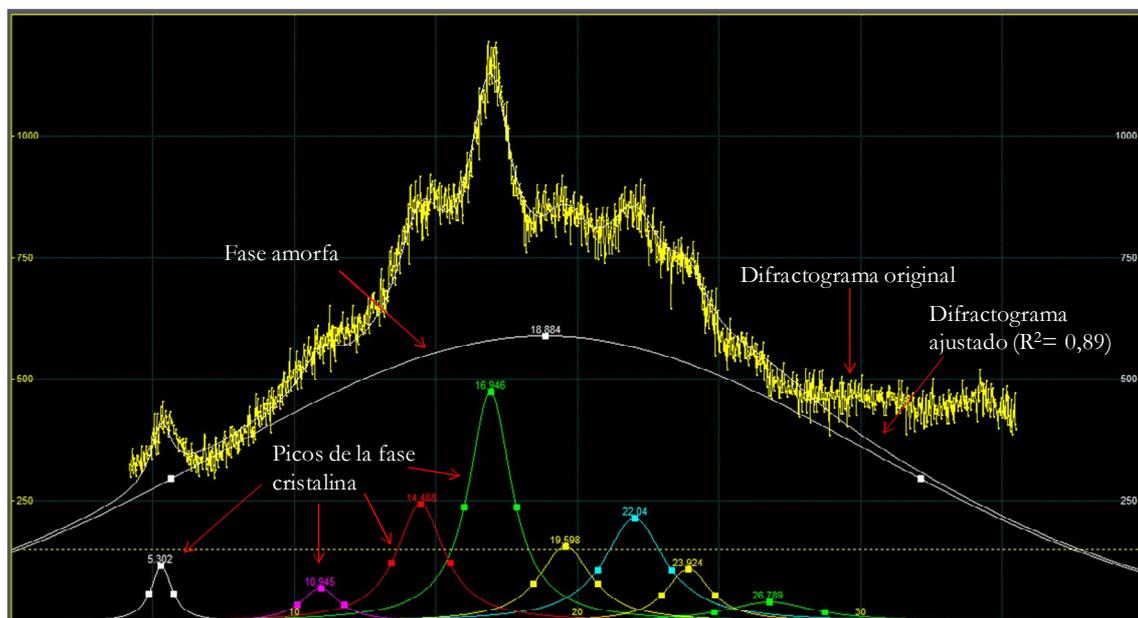


Figura M.8. Curva característica obtenida por difracción de rayos X. La curva original (líneas punteadas amarillas) es deconvolucionada a fin de obtener la fase amorfa y la fase cristalina de la muestra en estudio. Las curvas así obtenidas (trazo continuo) son integradas, y las áreas son comparadas.

2.5.8. Propiedades de *pasting* (RVA)

Las propiedades de *pasting* de los almidones y las mezclas almidón/harina de soja fueron llevadas a cabo en un viscoanalizador (RVA-4; Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia). Se colocaron 3 g de muestra (base seca) en el recipiente y se agregaron $25,0 \pm 0,1$ mL de agua destilada. La mezcla se calentó hasta 50 °C por 1 min, luego calentado hasta 95 °C a una velocidad de calentamiento de $9,4$ °C/min,

mientras se mezclaba a una velocidad de 960 rpm. Se mantuvo a esta temperatura por 2,5 min y finalmente enfriada a 50 °C a una velocidad de 11,8 °C/min. A partir de la curva de pasting se obtuvieron la temperatura de pasta (T_p), la viscosidad de pico (PV), la viscosidad final (FV), el *breakdown* (BD) y el *setback* (SB).

2.5.9. Microscopía confocal de barrido (CLSM)

Las masas fueron elaboradas según el punto 2.5.1. Se agregó una solución de rodamina B y fluoresceína isotiocianato (FITC) (0,1 y 1% p/v, respectivamente) en dimetilformamida, para permitir la observación simultánea de las proteínas (en rojo) y almidón (verde). Las muestras fueron observadas con un microscopio invertido confocal espectral Nikon Eclipse C1si (Nikon Inc., Tokyo, Japón) en modo estándar. La excitación se realizó con la línea 488 del láser Argón y el láser He-Ne de 543 nm, ambos con una potencia del 10%. Los filtros de emisión fueron 515/30 y 605/75.

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y se informó el promedio \pm desvío estándar. Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANAVA). En el caso de presentar diferencias, la comparación de las medias se realizó mediante el test de Fisher (LSD) con un nivel de significancia de 0,05. La relación entre los distintos parámetros fue determinada mediante el coeficiente de correlación de Pearson con $p \leq 0,05$.

Resultados y Discusión

Primera Sección

Propiedades de los batidos y calidad de los panes libres de gluten con alto contenido de agua

Capítulo 1

Influencia de diferentes materias primas sobre las propiedades de los batidos y la calidad de panes libres de gluten

En los últimos años, gran parte de la investigación en ciencia y tecnología de los productos panificados se focalizó en la obtención de productos que sean seguros para el consumo por parte de los pacientes celíacos. El reemplazo del rol del gluten en la masa de pan es el desafío más importante al momento de desarrollar productos libres de gluten. Numerosos productos de estas características se encuentran disponibles hoy en día en el mercado; sin embargo, la mayoría son de baja calidad, ya que presentan volumen, estructura y textura deficientes en comparación con los panes de trigo.

Así, obtener una masa panaria sin gluten pero con propiedades aptas para la elaboración de pan ha sido objeto de numerosas publicaciones científicas (Gallagher y col., 2003a; Gujral y Rosell, 2004a; Moore y col., 2004; McCarthy y col., 2005; Ribotta y col., 2005; Moore y col., 2006; Lazaridou y col., 2007; Marco y Rosell, 2008a; Mariotti y col., 2009; Mezaize y col., 2009; Onyango y col., 2009; Peressini y col., 2011). A tal fin se han probado diferentes combinaciones de harinas libres de gluten, aditivos derivados de la leche, proteínas, hidrocoloides y enzimas, entre otros ingredientes.

Las harinas de cereales más comúnmente utilizadas son las harinas de arroz (Gujral y Rosell, 2004a,b; Marco y Rosell, 2008a,b; Renzetti y Arendt, 2009b), sorgo (Schober y col., 2005) y maíz (Renzetti y col., 2008). También se ha introducido el uso de cultivos andinos (Torbica y col., 2010) y tubérculos como la papa y la mandioca (Sánchez y col., 2002; Ballesteros López y col., 2004; Ribotta y col., 2004).

La harina de arroz es la más ampliamente utilizada, ya que posee un sabor suave, bajo nivel de sodio, es hipoalergénica y posee baja cantidad de prolaminas, cuyos metabolitos son los desencadenantes de la celiaquía (Neumann y Bruemmer, 1997). Por otro lado, las proteínas de arroz son incapaces de retener los gases producidos durante la fermentación, lo que resulta en panes densos, de bajo volumen específico y con una miga muy firme (He y Hosoney, 1991). También la harina de maíz y todos sus subproductos, como la sémola, se han empleado en numerosas ocasiones en la producción de alimentos libres de gluten (Román-Brito y col., 2007; Sandhu y col.,

2007). La harina de soja es un buen suplemento para los productos a base de cereales ya que aumenta el contenido de proteínas, complementando su valor nutritivo. Los cereales presentan una deficiencia en lisina, uno de los aminoácidos esenciales para la dieta humana, mientras que las legumbres como la soja son ricas en este aminoácido. De igual modo, las proteínas de los cereales complementan a las proteínas de las legumbres en otro aminoácido esencial, la metionina. Además, la incorporación de harina de soja se ha utilizado para mejorar las propiedades mecánicas de las masas (Ribotta y col., 2004).

En base a bibliografía y estudios previos, en este trabajo se utilizaron tres harinas diferentes como materia prima: harina de arroz, harina de maíz y harina de soja deslipidizada, micronizada e inactiva. Estas harinas se utilizaron en diferentes combinaciones y proporciones, y la cantidad de agua varió de acuerdo a la formulación, con el objetivo de obtener mezclas con las que sea posible trabajar y con las que se logre un producto final de buena calidad.

1. Composición centesimal de las harinas

En la Tabla 1.1 se presenta la composición centesimal de las harinas utilizadas en la formulación de panes libres de gluten con alto contenido de agua.

Tabla 1.1. Composición centesimal de las harinas utilizadas en la elaboración de panes libres de gluten.

	Harina de arroz	Harina de maíz	Harina de soja
Proteínas (%)	8,11	6,87	54,97
Cenizas (%)	0,23	0,49	7,09
Lípidos (%)	0,80	6,26	5,62
Fibra cruda (%)	0,25	0,22	1,77
Humedad (%)	11,16	10,13	7,99
Carbohidratos (%)	79,45	76,03	22,56

2. Formulaciones

En base a un conjunto de ensayos de panificación previo, se seleccionaron ocho formulaciones, que se presentan en la Tabla 1.2, y que llevaron a la obtención de

batidos con los que fue factible trabajar, y con los que se lograron panes de una calidad tecnológica aceptable.

Tabla 1.2. Formulaciones utilizadas para obtener batidos y panes libres de gluten.

Formulaciones	Ingredientes (g)			
	Harina arroz	Harina maíz	Harina soja	Agua
A	100	-	-	110
A:M (50:50)	50	50	-	170
A:S (90:10)	90	-	10	110
A:S (80:20)	80	-	20	110
M:S (90:10)	-	90	10	218
M:S (80:20)	-	80	20	206
A:M:S (45:45:10)	45	45	10	164
A:M:S (40:40:20)	40	40	20	158

3. Propiedades de los batidos

3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

3.1.1. Agua congelable

El estado físico del agua tiene un papel muy importante en las propiedades estructurales, físicas, químicas y organolépticas de los alimentos. Sin embargo, el comportamiento del agua durante el amasado, la panificación y el almacenamiento no se encuentra del todo esclarecido. La porción del agua que no se congela aun a temperaturas por debajo de 0 °C (denominada agua no congelable, ANC) no es fácilmente eliminada tampoco por medio del secado (Leung y Steinberg, 1979), por esto se propone que se encuentra íntimamente ligada en la matriz de la masa; en tanto que el agua congelable (AC) se define como el agua que forma cristales detectables por calorimetría diferencial de barrido.

En la Tabla 1.3 se presentan los parámetros de la endoterma de fusión del agua y el porcentaje de agua congelable y no congelable de las masas a base de harinas de arroz, de maíz y de arroz:maíz con y sin sustitución por harina de soja. La entalpía de fusión del agua fue mayor para la harina de maíz, seguida por la harina de arroz, y menor para la harina de soja ($p < 0,05$). Este resultado se condice con la mayor cantidad de

agua que contenían los batidos a base de harina de maíz: el ΔH de fusión del agua correlacionó positivamente con la cantidad de agua total presente en el sistema ($r=0,99$; $p<0,05$). La incorporación de soja disminuyó la entalpía de fusión, y la disminución fue mayor a medida que el nivel de sustitución aumentó; esta tendencia se observó tanto para las harinas de arroz y maíz por separado, como para la mezcla arroz:maíz 50:50. Además, el inicio de la endoterma se observó a temperaturas significativamente más bajas cuando se incorporó la harina de soja a los distintos sistemas. Una tendencia similar fue informada por Baek y col. (2004) que informaron que la presencia de solutos disminuía la temperatura de fusión del agua en geles de almidón.

Los valores de agua no congelable de las diferentes muestras variaron entre 18,9% para la harina de soja, y 3,6% para la mezcla maíz:soja 90:10 (Tabla 1.3). Considerando las tres harinas empleadas, la harina de maíz presentó la menor proporción de ANC. Esta diferencia puede deberse a dos hechos principales: primeramente, a la mayor fracción de agua presente en los sistemas a base de maíz, que torna difícil la comparación con las otras muestras; y, además, la mayor cantidad de lípidos presentes en esta harina puede disminuir la interacción de los polímeros más hidrofílicos con el agua, y una mayor proporción de ésta queda disponible para la formación de cristales. Otros autores encontraron un aumento en la fracción de agua congelable en panes tras la incorporación de almendras molidas, y asignaron este efecto a la mayor presencia de lípidos en la formulación (Lodi y Vodovotz, 2008). La fracción de ANC se vio afectada de diferente manera por la presencia de harina de soja dependiendo de la harina que se sustituya. Así, el porcentaje de ANC de la harina de arroz no se vio modificado por la presencia de la soja, ya que el comportamiento en relación al agua de ambas harinas por separado fue similar, es decir, no se evidenció una interacción entre los componentes de ambas harinas que provoque un cambio del comportamiento de la mezcla. Por otro lado, al incorporar un 10% de harina de soja a la harina de maíz, el porcentaje de ANC disminuyó, aunque con un 20% de sustitución se observó un leve aumento en relación a la harina de maíz sin sustitución.

La muestra arroz/maíz presentó un porcentaje de agua no congelable (9,7%) menor al que se esperaba según el valor promedio de ambas harinas por separado (11,4%). Seguramente, el agua se distribuye de manera distinta entre los componentes de ambas harinas cuando éstas se encuentran juntas en el mismo sistema. Además, es probable que se establezca una interacción entre los polímeros de ambas harinas que cause una menor relación con el agua, obteniéndose una menor fracción de ANC que la esperada, que significa que existe una mayor fracción de agua libre en el sistema. La incorporación de harina de soja a esta mezcla provocó un aumento en el agua no congelable, y el aumento fue similar a ambos niveles de sustitución. Este aumento se debería a la relación entre la harina de soja y la harina de maíz, ya que no se ha observado un efecto de la harina de soja sobre la harina de arroz.

Tabla 1.3. Parámetros de fusión del agua para las diferentes formulaciones de batido estudiadas.

Formulación	To (°C)	ΔH (J/g)	AT (g agua/ g sólido)	AC (g agua/ g sólido)	% AC	% ANC
A	-9,08 ^{g*}	386,2 ^c	1,40 ^b	1,16 ^c	82,9	17,1
M	-9,35 ^g	882,6 ^h	2,80 ^g	2,64 ^h	94,3	5,7
S	-22,96 ^a	342,4 ^a	1,27 ^a	1,03 ^a	81,1	18,9
A:M (50:50)	-8,03 ^h	621,2 ^e	2,06 ^d	1,86 ^e	90,3	9,7
A:S (90:10)	-9,99 ^d	372,3 ^{bc}	1,35 ^a	1,11 ^{bc}	82,2	17,8
A:S (80:20)	-14,67 ^b	356,8 ^{ab}	1,29 ^a	1,07 ^{ab}	82,9	17,1
M:S (90:10)	-12,06 ^{ef}	810,9 ^g	2,52 ^f	2,43 ^g	96,4	3,6
M:S (80:20)	-12,98 ^c	743,2 ^f	2,42 ^e	2,23 ^f	92,1	7,9
A:M:S (45:45:10)	-10,32 ^e	550,5 ^d	1,87 ^c	1,65 ^d	88,2	11,8
A:M:S (40:40:20)	-12,73 ^{cd}	560,3 ^d	1,90 ^c	1,68 ^d	88,4	11,6

To: temperatura de inicio de fusión del agua; ΔH , entalpía de fusión del agua (en valor absoluto); AT: agua total; AC: agua congelable; ANC: agua no congelable.

*Letras distintas en la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3.1.2. Gelatinización

En la Tabla 1.4 se informan los valores de los cambios entálpicos presentados por las diferentes harinas y mezclas estudiadas. Estos cambios entálpicos se deben, en general, a la gelatinización del almidón (en el caso de las harinas de arroz y de maíz) y

a la desnaturalización de las proteínas. Sin embargo, la harina de soja no presentó endoterma alguna, ya que el proceso industrial al que es sometida durante su manufactura incluye un tratamiento térmico que provoca la desnaturalización de las proteínas (Figura 1.1). Las diferencias observadas en los parámetros de gelatinización de las distintas harinas se deben principalmente a las diferentes propiedades de las materias primas, como la cantidad y las características del almidón presente, así como su grado de cristalinidad; a las interacciones proteínas-almidón que se establecen, y a la cantidad de agua presente en cada sistema.

Tabla 1.4. Parámetros de gelatinización para las diferentes formulaciones estudiadas.

Formulación	Agua (%) ¹	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	ΔH (J/g sólidos)
A	110	49,58 ^{a*}	64,85 ^a	86,55 ^c	4,98 ^d
M	230	60,07 ^d	70,39 ^{de}	80,66 ^a	4,40 ^c
A:M (50:50)	170	52,76 ^{bc}	66,67 ^b	80,73 ^a	5,99 ^e
A:S (90:10)	110	52,13 ^b	67,35 ^b	86,22 ^c	4,31 ^c
A:S (80:20)	110	53,12 ^c	69,03 ^{cd}	87,70 ^c	3,43 ^a
M:S (90:10)	218	61,37 ^e	71,16 ^{ef}	81,39 ^a	3,86 ^b
M:S (80:20)	206	62,88 ^f	72,42 ^f	80,88 ^a	3,12 ^a
A:M:S (45:45:10)	164	60,47 ^{de}	68,80 ^c	81,89 ^a	4,03 ^{bc}
A:M:S (40:40:20)	158	60,05 ^{de}	69,10 ^{cd}	83,74 ^b	4,02 ^{bc}

To: temperatura de inicio de gelatinización; Tp: temperatura de pico de gelatinización; Tc: temperatura de conclusión de gelatinización; ΔH : entalpía de gelatinización (expresada en valor absoluto).

*Letras diferentes en una misma columna corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

¹ % en base harina.

Los termogramas de todas las formulaciones presentaron una endoterma en un rango de temperatura de 50 a 100 °C, que correspondió a la gelatinización del almidón (Figura 1.1). Para las mezclas a base de arroz, luego del pico de gelatinización (pico G), se presentó un hombro que se atribuyó a la fusión del almidón (pico M), ya que estas muestras presentaron menor proporción de agua ($\approx 52\%$ p/p).

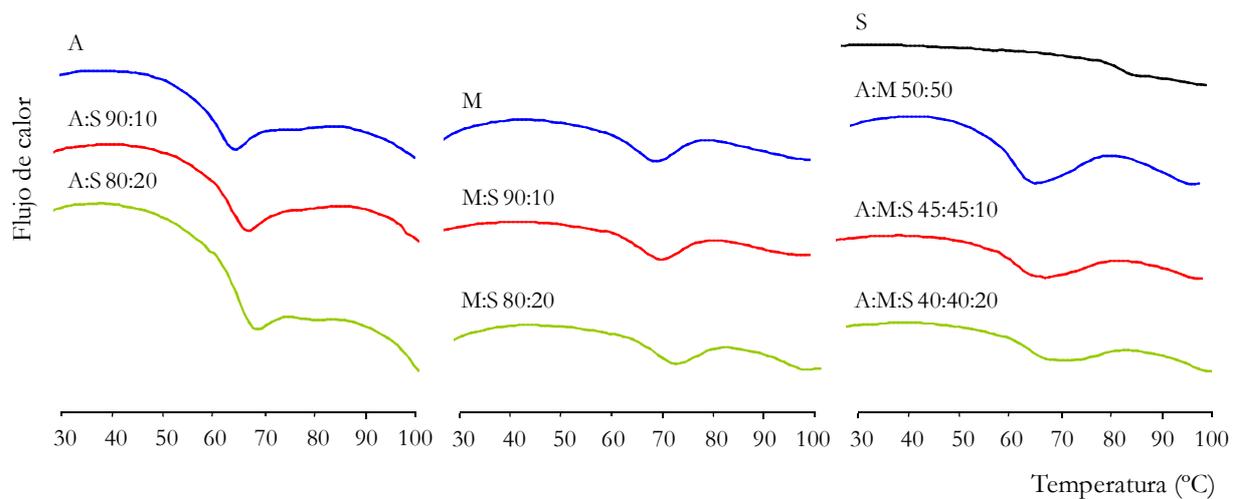


Figura 1.1. Termogramas de las harinas empleadas y sus mezclas. A: arroz; M: maíz; S: soja.

La harina de maíz, y las mezclas a base de harina maíz, presentaron mayor temperatura de gelatinización que la harina de arroz y sus mezclas. Autores como Li y Yeh (2001), Iturriaga y col. (2004), Sandhu y col. (2007) y Xue y Ngadi (2007) encontraron temperaturas de gelatinización de las harinas de arroz y maíz similares a las presentadas en la Tabla 1.4. Además, los valores de ΔH para las harinas de arroz y maíz se encuentran de acuerdo a los reportados por Xue y Ngadi (2007) trabajando con una cantidad similar de agua que la presentada en la Tabla 1.4. Sin embargo, mayores valores de entalpía fueron informados para harinas de diferentes cultivares de maíz (Sandhu y col., 2007), y de arroz (Lin y col., 2010) trabajando con mayor proporción de agua (entre 5,5 y 8,5; y 6,7 y 9,7 J/g, respectivamente). La mezcla arroz:maíz presentó un valor de ΔH (5,99 J/g sólidos) mayor al que se esperaba según el promedio de las entalpías obtenidas para ambas harinas por separado (4,69 J/g sólidos). Este hecho puede atribuirse a la diferente cantidad y distribución del agua presente en los distintos sistemas. Además, el mayor valor de entalpía representa el resultado neto de varias reacciones, donde a la gelatinización del almidón se suma la interrupción de las interacciones que se establecen entre los polímeros de ambas harinas.

Cuando se incorporó la harina de soja a las harinas de arroz y maíz, la temperatura de gelatinización de estas últimas aumentó significativamente, efecto que podría

atribuirse al alto contenido de proteínas de la harina de soja (Tabla 1.1). Numerosos estudios demuestran que la presencia de solutos aumenta la temperatura de gelatinización del almidón, debido principalmente a la reducción en la actividad de agua en el sistema, y a una interacción almidón-soluto (Baker y Rayas-Duarte, 1998). Evidentemente, la magnitud de este efecto depende del tipo y la cantidad del soluto presente (Maaurf y col., 2001, Li y col., 2007). Según afirmaron Lamsal y col. (2007), las proteínas de soja tienen una alta afinidad por el agua, y casi el 60% se encuentra solubilizado a pH neutro. La entalpía de gelatinización disminuyó a medida que aumentó la concentración de harina de soja debido también a un efecto de dilución del almidón. Sin embargo, al calcularse la entalpía en función del contenido total de almidón en la formulación, sólo se produjo la disminución de la entalpía en las mezclas que contenían harina de maíz (5,79 J/g de almidón para la harina de maíz, y 4,56 J/g de almidón para la mezcla maíz:soja 80:20), lo que evidenciaría una interacción entre el almidón de maíz y las proteínas de soja.

3.2. Propiedades de *pasting*

Para determinar las propiedades de *pasting* de las diferentes harinas y sus mezclas, se utilizó un viscoanalizador (RVA). El principio de medición consiste en calentar una suspensión de harina en agua en un recipiente giratorio y permitirle luego enfriarse bajo condiciones controladas. La geometría especial del agitador asegura una buena homogeneización de la muestra, para evitar sedimentación de las partículas de harina. La medición de temperatura directamente dentro de la muestra facilita asignar la viscosidad a la temperatura real de la muestra.

Los cambios de viscosidad durante el calentamiento de 30 a 95 °C de la muestra refleja la capacidad que posee el almidón para retener agua e hincharse a medida que la mezcla es calentada. La temperatura de pasta de las diferentes harinas varió entre 79,0 y 90,1 °C (Tabla 1.5). La harina de arroz mostró mayores viscosidades final y de pico, y *setback* con respecto a la harina de maíz. La incorporación de harina de soja a la harina de arroz disminuyó notoriamente los parámetros de viscosidad, y el efecto fue dependiente del grado de sustitución. La viscosidad de pico disminuyó en un 56 y

68% con una sustitución de 10 y 20%, respectivamente; mientras que la viscosidad final lo hizo en un 58 y 69%, y el *setback* en 62 y 71%. La incorporación de harina de soja a la harina de maíz tuvo un menor impacto: la viscosidad de pico disminuyó en un 11 y un 36%, la viscosidad final lo hizo en un 10 y 34%, y el *setback* en un 8 y 27%, con el 10 y el 20% de incorporación de soja, respectivamente. El porcentaje de disminución de estos parámetros para la harina de maíz con el 10% de soja se corresponde prácticamente al efecto de dilución que sufre el almidón tras la sustitución de la harina de maíz. A mayores niveles de sustitución, sin embargo, el efecto no se correspondió únicamente con un efecto de dilución; la alta absorción de agua de la harina de soja y la relación que se establece entre los componentes de ambas harinas explicaría el porqué del cambio en el comportamiento de la harina de maíz durante el calentamiento luego de la incorporación de 20% de soja.

Se encontró una correlación negativa ($r=-0,87$; $p<0,05$) entre la viscosidad de pico y el contenido de proteínas en la mezcla de harinas. Esta asociación, que se debe en parte a un efecto de dilución del almidón, y en parte a un probable impedimento en el hinchamiento del mismo debido a la presencia de las proteínas, también fue observada por otros autores (Goel y col., 1999; Tan y Corke, 2002). La disminución del *setback* está posiblemente asociada a una menor capacidad de asociación entre las moléculas de amilosa y amilopectina debido a un impedimento estérico ejercido por las proteínas de la harina de soja en las mezclas.

Tabla 1.5. Propiedades de *pasting* de las diferentes formulaciones analizadas.

Formulación	T _p (°C)	VP (BU)	VF(BU)	SB (BU)
A	81,2	85	133	48
M	78,1	69	107	38
A:M (50:50)	82,7	70	106	36
A:S (90:10)	89,0	37	55	18
A:S (80:20)	90,1	27	41	14
M:S (90:10)	79,0	61	96	35
M:S (80:20)	80,8	44	71	28
A:M:S (45:45:10)	84,6	46	73	27
A:M:S (40:40:20)	84,6	36	55	19

T_p: temperatura de pasta; VP: viscosidad de pico; VF: viscosidad final; SB: *setback*.

3.3. Resistencia de los batidos a la extrusión

Un modo de evaluar la resistencia de los batidos es a través de un ensayo de extrusión. Este consiste en aplicar una fuerza de compresión, utilizando un émbolo, a un material que se encuentra en un vaso contenedor hasta que comience a fluir, ya sea por un orificio que se encuentra en el extremo posterior del vaso, o por el espacio remanente entre la superficie externa del émbolo y la pared interna del contenedor. En el primer caso, la muestra fluye en el mismo sentido en el que se mueve el émbolo, denominándose ensayo de extrusión *directo*. En el segundo caso, la muestra se desplaza en el sentido contrario al movimiento del émbolo, llamándose ensayo de extrusión *inverso*. Se realiza entonces una curva de fuerza en función del tiempo. La fuerza requerida para lograr la extrusión fue utilizada como un indicador de la resistencia del batido.

Los batidos analizados mediante este ensayo fueron aquellos con los que se elaboraron los panes. La incorporación de soja modificó la estructura de la masa de arroz; las mezclas de arroz-soja requirieron la aplicación de la mayor fuerza para extrudir (Tabla 1.6). Cuando se incorporó soja al 10 y al 20% la fuerza necesaria para extrudir aumentó al doble y al cuádruple, respectivamente, al compararlas con los batidos elaborados sólo con arroz. Una tendencia similar se observó para los batidos a base de maíz. Cuando la soja se incorporó en un 20%, la fuerza de extrusión fue el doble en comparación con el batido de harina de maíz sustituida en un 10% con soja. En concordancia, los batidos de arroz/maíz/soja presentaron mayor resistencia que las mezclas de arroz/maíz. Moore y col. (2004) informaron una mayor fuerza de extrusión para masas libres de gluten con alto contenido proteico. Este comportamiento se debe, a priori, a dos factores principales: 1) el elevado contenido de proteínas de la harina de soja, que tienen una alta capacidad de absorción de agua, resulta en una disminución del agua libre del sistema; y 2) las interacciones almidón-proteína o proteína-proteína que influyen sobre el comportamiento de los batidos. Sin embargo, no se encontró correlación entre la cantidad de agua del batido y la fuerza

de extrusión, por lo que las interacciones entre los componentes de las harinas parecen jugar un papel fundamental a la hora de determinar la resistencia del sistema.

Tabla 1.6. Fuerza de extrusión de los diferentes batidos analizados.

Formulación	Fuerza de extrusión (g)
A	225,2 [*]
A:M (50:50)	62,9 ^a
A:S (90:10)	494,7 ^e
A:S (80:20)	1014,0 ^f
M:S (90:10)	48,3 ^a
M:S (80:20)	113,1 ^b
A:M:S (45:45:10)	124,8 ^b
A:M:S (40:40:20)	285,4 ^d

A: arroz; M: maíz; S: soja.

* Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$).

4. Evaluación tecnológica de los panes

La incorporación de harina de soja produjo un aumento en el volumen específico (VE) de los panes a base de arroz, de maíz, y de arroz/maíz (Figura 1.2). La harina de soja ha sido utilizada en trabajos previos para reforzar el comportamiento mecánico de las masas y mejorar la calidad de los panes libres de gluten (Ribotta y col., 2004). Sin embargo, Sánchez y col. (2004) encontraron que cuando reducían de 10 a 3% el contenido de proteínas de soja en masas libres gluten, el volumen de pan aumentaba concomitantemente. Autores como Moore y col. (2006) utilizaron diferentes fuentes de proteína para fortificar panes a base de harinas de arroz, maíz y almidón de papa. Cuando agregaron harina de soja la calidad de los panes fue inferior al compararla con la de los panes que contenían huevo pasteurizado o leche entera en polvo.

Se observó que la incorporación de la harina de soja aumentó el VE de los panes al aumentar la fuerza de extrusión de los batidos (indicativa de una mayor resistencia). Esto fue así hasta que se alcanzó cierto límite de fuerza, al menos para las formulaciones a base de arroz. Cuando se incorporó un 10% de harina de soja al batido de arroz, los panes resultantes tuvieron mayor VE en comparación con los

panes elaborados únicamente con harina de arroz; sin embargo, con el agregado de un 20% de soja el batido resultó demasiado resistente, en detrimento del VE. Por otro lado, al ser incorporada a la harina de maíz, aumentó el VE a ambos niveles de sustitución (10 y 20%), que se corresponde con el menor valor de resistencia en comparación con las mezclas a base de arroz. El aumento considerable de la resistencia de los batidos de arroz (como el obtenido con una sustitución con 20% de harina de soja) resulta en batidos demasiado rígidos que no logran una buena expansión durante la fermentación y el horneado. Esto no ocurrió con los batidos a base de maíz, que, aun a los mayores niveles de sustitución con soja, el aumento en la resistencia no fue suficiente para ejercer un efecto negativo sobre la expansión del batido durante la fermentación.

No se observaron diferencias ($p < 0,05$) en el VE entre los distintos niveles de sustitución por harina de soja en los panes a base de arroz/maíz.

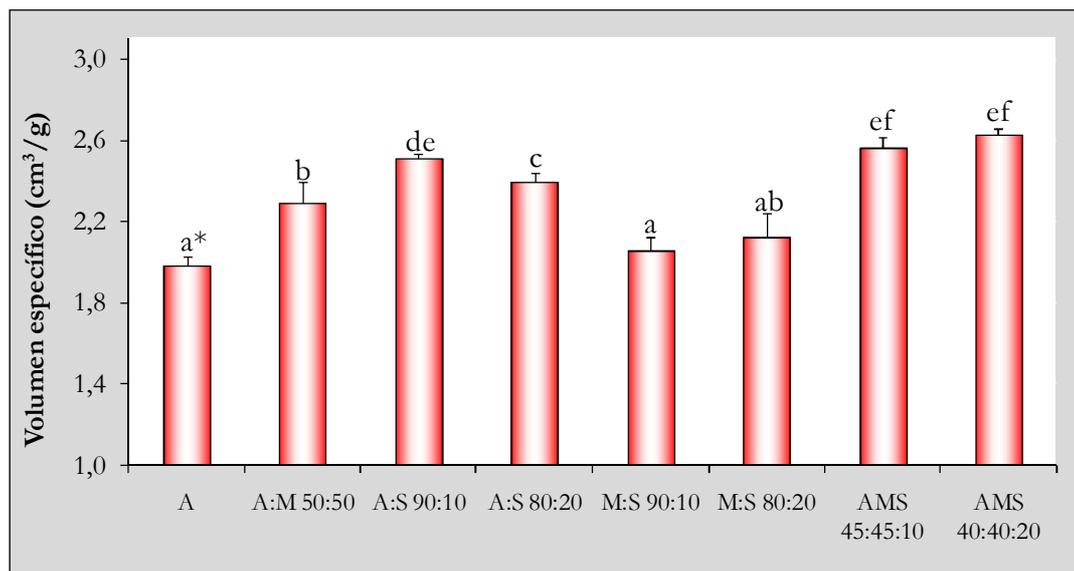


Figura 1.2. Volumen específico de los panes analizados. A: harina de arroz, M: harina de maíz, S: harina de soja.

* Letras distintas corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto a la textura de la miga, la incorporación de harina de soja produjo una miga más suave (Tabla 1.7). Considerando los panes a base de harina de arroz, la incorporación de soja tanto al 10 como al 20% disminuyó prácticamente a la mitad la

dureza inicial de la miga en comparación con los panes de arroz. Para los panes de harina de maíz se observó una tendencia similar, aunque la disminución en este parámetro no fue tan pronunciada como para los panes de arroz. La menor dureza de miga fue obtenida para la formulación que incluye arroz y maíz con un 20% de incorporación de soja. Esta tendencia se corresponde con aquella seguida por el volumen de pan, donde la incorporación de harina de soja llevó a panes de mayor volumen. Willhoft (1973) sugirió que es el aumento en el VE provocado por la alta concentración de proteínas el que lleva a migas con menor dureza, más que un efecto directo de las proteínas *per se*. Se ha demostrado (Elton, 1969; Eliasson, 1986) que a medida que el VE disminuye, la dureza inicial de la miga aumenta, probablemente a causa de la mayor cantidad de enlaces e interacciones que se establecen entre las moléculas que quedan así empacadas más densamente.

Tabla 1.7. Dureza inicial y luego de 24 y 72 h de almacenamiento (25 °C) de las migas de las diferentes formulaciones analizadas.

Formulación	Dureza (g)			Velocidad de endurecimiento (g/día)	R ²
	Día 0	Día 1	Día 3		
A	1424,4 ^{d*}	3276,6 ^e	4783,9 ^f	1131,0	0,962
A:M (50:50)	1004,9 ^c	1570,6 ^d	1668,1 ^c	270,2	0,785
A:S (90:10)	877,3 ^{abc}	1508,2 ^{cd}	2359,8 ^e	533,9	0,984
A:S (80:20)	841,5 ^{abc}	1328,3 ^c	1579,9 ^c	260,0	0,927
M:S (90:10)	959,6 ^{bc}	1497,2 ^{cd}	2010,8 ^d	276,2	0,992
M:S (80:20)	943,9 ^{bc}	1045,3 ^b	1275,7 ^b	260,0	0,927
A:M:S (45:45:10)	801,7 ^{ab}	790,8 ^a	1206,9 ^{ab}	124,0	0,930
A:M:S (40:40:20)	721,9 ^a	967,9 ^{ab}	950,0 ^a	63,9	0,506

*Letras diferentes es una misma columna corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

El aumento de la dureza de la miga con el tiempo es un fenómeno en el que influyen diversos factores. La pérdida de humedad de la miga junto con las interacciones almidón-almidón que se establecen con el tiempo son dos de los mecanismos admitidos como básicos. Como se esperaba, entonces, la dureza de la miga aumentó con el tiempo de almacenamiento para todas las formulaciones estudiadas (Tabla 1.7).

La velocidad de endurecimiento -dada por la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de las durezas medidas 0, 1 y 3 días luego de hornear los panes- fue mayor para los panes a base de arroz, aunque la incorporación de soja tuvo un efecto beneficioso demorando este fenómeno. Consistentemente, en la Tabla 1.5 puede observarse que las mezclas de arroz con soja presentaron un menor *setback* en relación a los batidos elaborados sólo con harina de arroz. La menor velocidad de endurecimiento fue obtenida para los panes que incluyeron las tres harinas (arroz, maíz y soja). Para conocer el efecto de las proteínas sobre el endurecimiento del pan, Gerrard y col. (2001) evaluaron la incorporación de distintos niveles de proteínas de soja, de leche, de carne y de gluten sobre panes elaborados a base de almidón de trigo pregelatinizado, de un volumen específico comparable; y encontraron que la velocidad de endurecimiento no se veía afectada por la concentración ni por el tipo de proteína incorporada. Así, concluyeron que el proceso de endurecimiento no es afectado de manera crítica por las proteínas. Las diferencias observadas en este trabajo pueden explicarse a través de las diferencias en otras propiedades del pan, como el volumen específico.

El color de la corteza de pan es un atributo importante a la hora de evaluar las preferencias del consumidor. En general, la corteza se caracteriza por tener baja humedad y un color oscuro. El color es producido principalmente a través de las reacciones de Maillard y de caramelización. Las reacciones de Maillard incluyen un grupo de reacciones bastante complejo en donde, en primera instancia, ocurre la condensación de los grupos amino libres, generalmente de los aminoácidos, con los grupos carbonilo de los azúcares reductores. Debido a que el agua es un producto de la reacción, ésta se ve favorecida por las condiciones de deshidratación durante el horneado. Luego de esta condensación, se llevan a cabo una serie de arreglos que conducen a la formación de los pigmentos oscuros. Los azúcares también pueden llevar al oscurecimiento en ausencia de aminoácidos, a través de las reacciones de caramelización. También se trata de un conjunto complejo de reacciones que dependen de la temperatura y que ocurren en un rango de pH bastante acotado.

El espacio CIELab permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional. El eje L* es el de luminosidad y puede presentar valores entre 0 (negro) y 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son a* y b*, y representan variación entre rojizo-verdoso, y amarillento-azulado, respectivamente. Los panes con harina de maíz presentaron, en general, menores valores de L* (Tabla 1.8), con una corteza más oscura que los panes con arroz. En ambos casos, la incorporación de harina de soja disminuyó el valor de L* debido al color mismo de la harina y a un cambio en las reacciones de Maillard y de caramelización, ambas influidas por la distribución del agua y las reacciones entre los aminoácidos y los azúcares presentes (Kent y Evers, 1994). Este oscurecimiento global como resultado de la incorporación de la harina de soja es un efecto deseable, ya que en general, los panes libres de gluten -ricos en arroz o almidones- tienen valores de L* mayores que los panes de trigo (L*=38) (Gallagher y col., 2003a). La presencia de las harinas de maíz y soja produjo cortezas con mayores valores de a* y b* debido, en parte, al color característico de estas harinas.

Tabla 1.8. Valores de L*a*b* de las cortezas de las diferentes formulaciones estudiadas.

Formulación	L*	a*	b*
A	79,33 ^{e*}	-0,73 ^a	16,88 ^a
A:M (50:50)	66,34 ^d	6,30 ^b	32,32 ^c
A:S (90:10)	69,21 ^d	10,57 ^c	37,72 ^d
A:S (80:20)	49,01 ^{ab}	17,91 ^f	44,74 ^f
M:S (90:10)	57,11 ^c	11,01 ^c	39,85 ^e
M:S (80:20)	51,29 ^b	12,23 ^d	35,94 ^d
A:M:S (45:45:10)	43,16 ^a	7,53 ^b	28,55 ^b
A:M:S (40:40:20)	53,97 ^{bc}	15,31 ^e	37,10 ^d

*Letras diferentes es una misma columna corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Los resultados del presente Capítulo muestran que la incorporación de harina de soja inactiva tuvo un efecto beneficioso sobre los panes a base de harinas de arroz y/o maíz, y que estos cambios tienen origen en la modificación de las propiedades de los batidos. Los parámetros de gelatinización de los almidones de arroz y maíz fueron afectados por la incorporación de harina de soja, como resultado de su alta afinidad

por el agua y también debido al establecimiento de interacciones proteína/almidón. La viscosidad final, medida por RVA, disminuyó, mientras que la resistencia de los batidos a la extrusión se vio aumentada por la incorporación de soja. Esto refleja un efecto diferente de la harina de soja sobre los fenómenos que gobiernan el comportamiento de estos sistemas con y sin calentamiento. Se obtuvo un pan con un alto contenido de proteínas, normalmente presentes en baja proporción en los panes libres de gluten. Los panes mostraron un volumen y dureza de miga aceptables; sin embargo, la estructura y la humedad de la miga, así como el aspecto de la corteza, fueron deficientes. A fin de paliar estas deficiencias y mejorar la calidad global del pan, se seleccionó la formulación a base de arroz, maíz y 20% de soja, a la cual se incorporaron distintos aditivos, cuyo efecto será evaluado en el siguiente Capítulo.

Capítulo 2

Efecto de la incorporación de diferentes aditivos sobre las propiedades de los batidos y la calidad de panes libres de gluten

La ausencia de una red de gluten acarrea serios problemas a la hora de obtener panes aptos para celíacos de buena calidad tecnológica. Con el objeto de sobrellevar la falta de esta red viscoelástica, se han empleados numerosos aditivos.

Los hidrocoloides se han agregado a las formulaciones de productos fermentados libres de gluten con buenos resultados sobre la estructura de la miga, el sabor, aceptabilidad y vida útil. Se ha informado que los hidrocoloides mejoran el desarrollo de la masa y la retención de gas al aumentar la viscosidad del sistema, y producen panes con un mayor volumen específico (Lazaridou y col., 2007; Marco y Rosell, 2008a; Peressini y col., 2011). Dentro de la amplia gama de hidrocoloides que se utiliza en la industria alimentaria, la goma xántica, los derivados de la celulosa -principalmente metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)-, la goma guar, la goma garrofín, los carragenatos y los alginatos, tal vez sean los más utilizados a la hora de formular panes libres de gluten. Sin embargo, el efecto de los hidrocoloides es altamente dependiente de las materias primas utilizadas, de la naturaleza del hidrocoloide empleado y la cantidad incorporada, y de la cantidad de agua presente en el sistema, por lo que es sumamente difícil prever qué hidrocoloide puede ejercer el efecto óptimo en cada formulación. En este Capítulo se estudió el efecto de cuatro hidrocoloides: goma xántica, carboximetilcelulosa, carragenato y alginato sobre los batidos y panes libres de gluten. En ensayos previos se probaron diferentes dosis de estos hidrocoloides y se evaluó la calidad del pan; el porcentaje seleccionado fue de 0,5% (en base harina).

También se han agregado a las formulaciones sin gluten proteínas de diverso origen (Moore y col., 2004; Marco y Rosell, 2008a). Así, se han utilizado proteínas de soja, albúmina de huevo y proteínas derivadas de la leche con el objeto de aumentar la calidad nutricional del pan. Además, Moore y col. (2004) concluyeron que la incorporación de cantidades suficientes de una fuente proteica adecuada ayuda a mantener por más tiempo la calidad del pan, al mismo tiempo que la formación de

una fase proteica continua sería un punto crítico al enmascarar los efectos de la retrogradación del almidón. En la bibliografía se encuentra una gran diversidad de trabajos donde se han obtenido productos libres de gluten mediante la incorporación de diferentes proteínas. En este trabajo se evaluó preliminarmente el efecto de la albúmina de huevo y el concentrado suero de leche, que son dos de las proteínas más utilizadas, y también de huevo pasteurizado en polvo, en distinto porcentaje de incorporación (1% y 5%, en base harina). En base a estos ensayos previos, se seleccionaron el concentrado de suero de leche y el huevo pasteurizado, agregados en un 5% (base harina), con los que se obtuvieron mejores resultados sobre la calidad tecnológica del pan.

Los emulsionantes son utilizados en la industria panadera por su capacidad de interactuar con los componentes de la harina y otros ingredientes de la masa para obtener migas más suaves (Demirkesen y col., 2010). Se caracterizan por poseer residuos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, que les permite interactuar con dos fases químicamente diferentes. Así, la tensión superficial entre dos fases normalmente inmiscibles se reduce mediante su incorporación, y se tornan entonces capaces de formar una emulsión (Krog, 1981; Flack, 1987; Dziezak, 1988). De esta manera, cuando son incorporados para la elaboración de pan, contribuyen a una mayor estabilidad de un sistema termodinámicamente inestable (Gómez y col., 2004). Su naturaleza anfifílica les provee la posibilidad de formar complejos con el almidón y las proteínas u otros lípidos presentes, y el agua. La interacción de un emulsionante con las proteínas puede mejorar la fuerza de la masa favoreciendo la retención de CO₂. Algunos emulsionantes se han incorporado en formulaciones libres de gluten. Onyango y col. (2009) elaboraron panes a base de almidón de mandioca gelatinizada, y encontraron que la incorporación de emulsionantes reforzó la estructura de la masa, así como también disminuyó la dureza de la miga. Esta misma tendencia fue informada por Demirkesen y col.

(2010). En este trabajo, se seleccionaron dos emulsionantes aniónicos, SSL y DATEM, en una dosis de 1%, base harina.

El uso de enzimas en sistemas libres de gluten comenzó a investigarse como un medio para modificar la funcionalidad de las proteínas, ya que se considera imprescindible la formación de una red para mejorar las propiedades panaderas de harinas sin gluten (Gujral y Rosell, 2004 a,b; Moore y col., 2006; Renzetti y col., 2008). Comenzó, entonces, a estudiarse el efecto de la glucosa oxidasa sobre harinas libres de gluten como agente polimerizante, encontrándose resultados variados, dependiendo del tipo de harina utilizado (Gujral y Rosell, 2004b; Renzetti y Arendt, 2009a). La dosis seleccionada, de acuerdo a ensayos previos, fue de 0,003%, base harina. La α -amilasa es una enzima que se ha empleado en productos panificados con el objeto de disminuir la retrogradación de la amilopectina. La dosis seleccionada fue 0,001% base harina.

1. Formulación

En la Tabla 2.1 se presenta la formulación base sobre la cual se evaluó el efecto de la incorporación de los aditivos seleccionados.

Tabla 2.1. Formulación base para la elaboración de batidos y panes libres de gluten.

Ingredientes	g (en base harina)
Harina de arroz	40
Harina de maíz	40
Harina de soja	20
Agua	158
Margarina	2
Sal	2
Levadura	3

En la Tabla 2.2 se presentan los aditivos utilizados, y las cantidades en las que fueron incorporados.

Tabla 2.2. Aditivos utilizados en la formulación de panes libres de gluten.

Grupo	Aditivo	Cantidad (g/100 g harina)
Hidrocoloides	Goma xántica (X)	0,5
	Carboximetilcelulosa (CMC)	
	Carragenatos (C)	
	Alginatos (Al)	
Proteínas	Huevo pasteurizado en polvo	5
	Concentrado de suero de leche	
Emulsionantes	Éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM)	1
	Estearoil 2-lactilato de sodio (SSL)	
Enzimas	Glucosa oxidasa (GOX)	0,003
	α -Amilasa (Am)	0,001

2. Hidrocoloides

2.1. Efecto de hidrocoloides sobre las propiedades de los batidos

La resistencia a la extrusión fue evaluada en las muestras con la incorporación de hidrocoloides. Los batidos que incluyeron hidrocoloide en su formulación presentaron mayor resistencia que el control (sin hidrocoloide) (Tabla 2.3). Escudier y col. (2001), al trabajar con soluciones de CMC y X a temperatura ambiente, encontraron que las soluciones de X presentaron mayor viscosidad (Pa.s) que las soluciones de CMC. Coincidentemente con este resultado, en este trabajo se encontró que la mayor resistencia del batido se obtuvo tras la incorporación de X. Por otro lado, los batidos con C y Al mostraron la menor resistencia entre los batidos con hidrocoloides. Tanto CMC como X son moléculas altamente solubles en agua fría, mientras que C y Al requieren de agua caliente para una hidratación completa (Anton y Artfield, 2008). Este hecho podría explicar las diferencias observadas en la resistencia de estos batidos.

El barrido de frecuencia muestra cómo el comportamiento viscoso y elástico de un material cambia con la aplicación de un esfuerzo o una deformación. En este ensayo la frecuencia es aumentada mientras la amplitud de entrada (esfuerzo o

deformación) se mantiene constante (Steffe, 1996). La región de linealidad viscoelástica para los batidos libres de gluten fue establecida hasta una deformación del 0,1%, mediante un barrido de deformación. A partir de deformaciones mayores se observó una caída en los módulos elástico y viscoso, que es indicativa de la ruptura de la estructura cuando es sometida a altas deformaciones. Los valores de rango viscoelástico lineal para los batidos libres de gluten con la incorporación de hidrocoloides fueron similares a los hallados en otros trabajos (Lazaridou y col., 2007; Mariotti y col., 2009).

En la Tabla 2.3 se presentan los valores medios de los módulos elástico y viscoso (G' y G'' , respectivamente), y $\tan \delta$ para las formulaciones analizadas, a una frecuencia de 1 Hz, mientras que la Figura 2.1 ilustra el cambio de los módulos elástico y viscoso de los diferentes batidos en función de la frecuencia a una deformación constante (0,1%).

Tabla 2.3. Valores de resistencia, de módulos elástico (G') y viscoso (G'') y de $\tan \delta$ a 1 Hz, para las formulaciones con hidrocoloides.

	Formulación				
	Control	X	CMC	C	Al
Resistencia (g)	285 ^{a*}	679 ^d	419 ^c	336 ^b	358 ^b
G' (kPa)	4,29 ^{cde}	5,57 ^g	3,48 ^{ab}	5,10 ^{fg}	3,08 ^a
G'' (kPa)	0,73 ^{bc}	1,07 ^f	0,67 ^{ab}	0,83 ^{cde}	0,53 ^a
$\tan \delta$	0,169 ^{ab}	0,193 ^c	0,192 ^c	0,165 ^a	0,172 ^b

X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato.

* Letras distintas en una misma fila representan diferencias significativas con $p < 0,05$.

Para todas las muestras, G' fue mayor que G'' en todo el rango de frecuencias analizado, lo que sugiere un comportamiento sólido-elástico de los batidos, mientras que ambos módulos mostraron un comportamiento dependiente de la frecuencia. Esta dependencia puede deberse a que, durante el ensayo, se establecen interacciones transitorias entre las macromoléculas, que, a altas frecuencias, no

pueden dissociarse durante el corto período de oscilación, y estos puntos de unión funcionan entonces como entrecruzamientos permanentes observándose un incremento en la componente elástica. A bajas frecuencias, hay suficiente tiempo para que estas uniones se formen y luego se rompan, entregando una respuesta similar a la de aquellas matrices no entrelazadas (Angioloni y Collar, 2009).

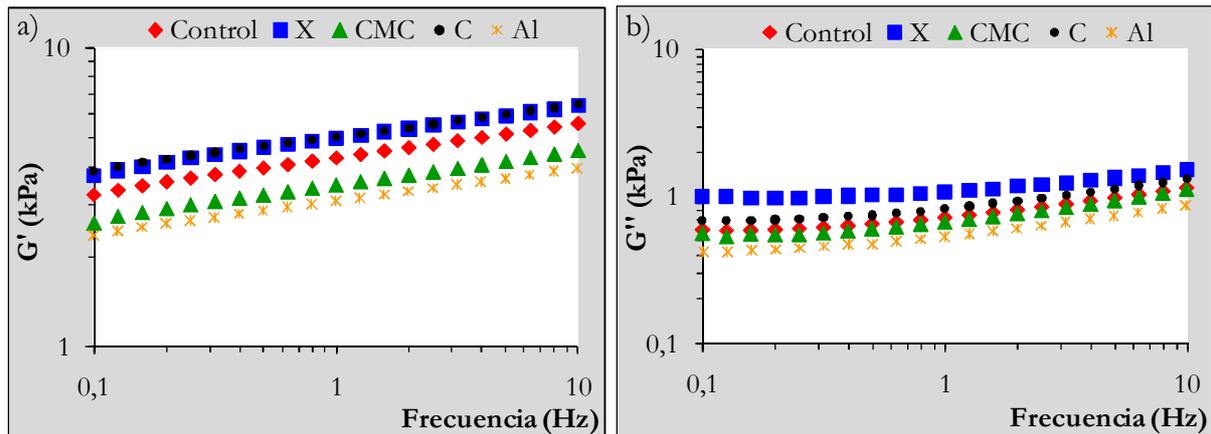


Figura 2.1. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de los batidos control (sin hidocoloide), con goma xántica (X), carboximetilcelulosa (CMC), carragenato (C) y alginato (Al). a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

Como se observa en la Tabla 2.3, la incorporación de X aumentó el módulo elástico del batido, mientras que CMC lo disminuyó. Otros autores (Lazaridou y col., 2007; Peressini y col., 2011; Demirkesen y col., 2010) también encontraron que la goma xántica aumentaba la elasticidad de los batidos, aunque el efecto de la CMC resulta más contradictorio. Los batidos con C mostraron un módulo elástico similar al de los batidos con X, aunque la $\tan \delta$ fue menor. Se ha informado que los hidocoloides, especialmente la goma xántica, disminuyen los valores de $\tan \delta$, relacionada con la viscoelasticidad del sistema (Cato y col., 2004; Sivaramakrishnan y col., 2004; Lazaridou y col., 2007), aunque aquí se encontró que la incorporación de hidocoloides resultó en mayores valores de $\tan \delta$ respecto al control ($p < 0,05$).

Las propiedades de las masas medidas bajo condiciones de baja deformación no necesariamente correlacionan con aquellas obtenidas a altas deformaciones, ya que

los factores que adquieren importancia a baja deformación (enlaces transitorios o interacciones moleculares débiles, como puentes de hidrógeno) no son los mismos que gobiernan el comportamiento a deformaciones mayores (enlaces y entrecruzamientos permanentes).

En la Figura 2.2 se presentan las curvas de flujo de los batidos con hidrocoloides. Se observa que todas las formulaciones mostraron un comportamiento pseudoplástico, con una disminución de la viscosidad a medida que aumentó la velocidad de corte. A mayores velocidades, el batido control presentó una fuerte caída en los valores de viscosidad. Los batidos con CMC y goma xántica presentaron mayor viscosidad en comparación con el control, en todo el rango de velocidad de corte, y no se observó la caída que sí se presentó en el control, lo que demuestra una mayor resistencia al flujo para estos batidos a altas velocidades, que puede indicar una mayor integridad de la estructura bajo estas condiciones. Estos resultados están de acuerdo a Demirkesen y col. (2010), quienes evaluaron el efecto de la incorporación de distintos hidrocoloides (gomas xántica, garrofín, guar y sus mezclas) en masas elaboradas a partir de harina de arroz, y encontraron la mayor viscosidad y consistencia para las muestras con goma xántica. Se sabe que las soluciones de goma xántica a baja concentración exhiben alta viscosidad a velocidades de corte relativamente bajas debido a los agregados complejos que forman estas moléculas semi-rígidas (Sworn, 2000; Mandala y col., 2004). Esta propiedad resultó en una viscosidad aparente relativamente alta de los batidos que contenían este hidrocoloide. Si bien los batidos con Al no mostraron una viscosidad diferente a la del control, no presentaron una caída significativa con el aumento de la velocidad de corte.

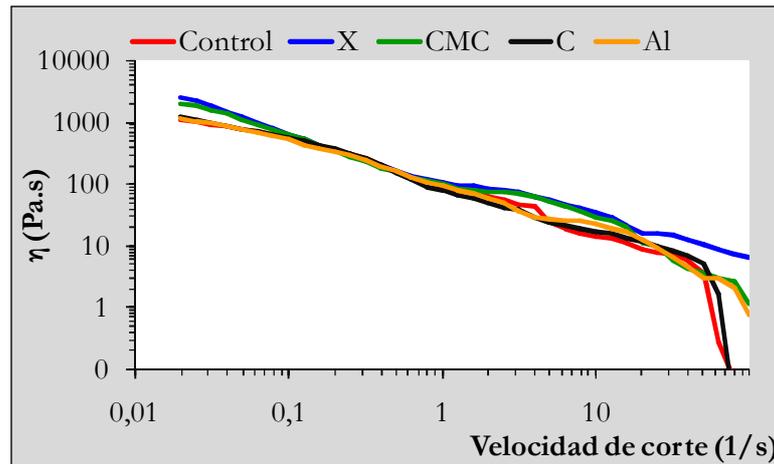


Figura 2.2. Viscosidad aparente en función de la velocidad de corte para los batidos control (sin hidrocoloide), con goma xántica (X), carboximetilcelulosa (CMC), carragenato (C) y alginato (Al).

2.2. Efecto de hidrocoloides sobre la calidad del pan

La incorporación de los hidrocoloides a la formulación control tuvo un efecto positivo sobre el volumen específico de los panes ($p < 0,05$) (Tabla 2.4). Este comportamiento ha sido reportado ya en numerosos trabajos (Haque y Morris, 1994; Gujral y Rosell, 2004a,b; Bárcenas y Rosell, 2005; McCarthy y col., 2005). La adición de goma xántica fue la que resultó en panes de mayor VE, seguida por la incorporación de CMC y C y, finalmente, por Al. Acs y col. (1997), agregando hidrocoloides como las gomas xántica, guar, garrofín y tragacanto a panes libres de gluten, encontraron los mejores resultados sobre la calidad del pan luego de la incorporación de X. Sin embargo, el efecto de los hidrocoloides sobre el volumen de pan es muy variable, dependiendo de la formulación que se utilice, la cantidad de agua presente en el sistema, la cantidad de hidrocoloide agregado, así como el origen del mismo. Otros investigadores como Lazaridou y col. (2007), trabajando con panes libres de gluten adicionados con CMC, pectina, agarosa, goma xántica y β -glucanos, obtuvieron el mayor VE para los panes con CMC, mientras que los panes con 1% de goma xántica no tuvieron mayor VE que el control, y éste incluso disminuyó al aumentar la dosis del hidrocoloide a 2%. Schober y col. (2005) encontraron un efecto negativo de la goma xántica sobre el VE de panes libres de

gluten elaborados a partir de harina de sorgo. Mezaize y col. (2009) no encontraron un efecto positivo de la CMC y la goma xántica sobre el VE de panes libres de gluten. Sin embargo, vale la pena destacar que todos estos autores trabajaron con mayores cantidades de hidrocoloide, con diferentes proporciones de agua y con materias primas distintas, variables todas que influyen sobre la calidad final del pan. En la literatura se ha establecido una discusión sobre el efecto de la consistencia de las masas sobre el VE del pan. Mientras que Renzetti y Arendt (2009b) sugirieron que una disminución en la consistencia mejora el desarrollo de las masas debido a una menor resistencia a la expansión durante la fermentación, otros autores informaron que mayores consistencias conllevan a panes con mayor VE, ya que un aumento en la viscosidad de la masa o batido aumenta la capacidad de retención de CO₂ (Marco y Rosell, 2008a). En este trabajo se encontró una correlación positiva ($r=0,94$; $p<0,05$) entre el VE de los panes y la resistencia de los batidos a la extrusión.

Tabla 2.4. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación de hidrocoloides.

	Formulación				
	Control	X	CMC	C	Al
VE (cm³/g)	2,19 ^{a*}	2,89 ^d	2,62 ^c	2,65 ^c	2,55 ^b
Nº alvéolos/mm²	1,48 ^b	1,11 ^a	1,02 ^a	1,50 ^b	1,42 ^b
Tamaño alvéolos (mm²)	3,64 ^b	3,94 ^b	3,37 ^b	2,38 ^a	2,35 ^a
% Área de alvéolos	36,6 ^a	43,2 ^b	33,5 ^a	34,9 ^a	32,3 ^a
Uniformidad	2,99 ^b	2,32 ^a	2,51 ^{ab}	4,08 ^{cd}	4,72 ^d
Dureza inicial (g)	720 ^c	403 ^a	639 ^b	818 ^d	723 ^c
Velocidad de endurecimiento (g/día)	62,2 ^{ab}	22,9 ^a	28,8 ^a	72,9 ^{abc}	138,6 ^c
L*	50,58 ^b	57,41 ^c	59,63 ^c	44,71 ^a	51,58 ^b
a*	12,51 ^b	11,55 ^a	13,90 ^c	12,37 ^{ab}	14,03 ^c
b*	33,33 ^a	33,52 ^a	38,19 ^b	32,15 ^a	37,79 ^b

X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

La elección del pan por parte de los consumidores está muy influida por la estructura de la miga que éste presente. Con respecto al pan convencional de trigo, se prefiere una estructura fina y homogénea. Sin embargo, los panes libres de gluten en general poseen paredes alveolares muy gruesas, una estructura densa e irregular, que resulta de la dificultad para incorporar gases durante el batido y/o retener el CO₂ formado durante la fermentación, causado por la ausencia de una red viscoelástica.

En la Figura 2.3 se observa que los panes que contienen goma xántica poseen una estructura más esponjosa que los demás. Los panes con CMC presentan una buena estructura aunque más densa que la de los panes con X por presentar numerosos alvéolos pequeños. Los panes con carragenato muestran una estructura muy cerrada, similar a la del pan control; mientras que los que tienen alginato poseen numerosos alvéolos pequeños, con unos pocos de mayor tamaño. Todas las muestras, excepto aquellas con X y CMC, presentan una depresión en su centro, que es el resultado de una rápida pérdida de agua durante el horneado, con el consecuente colapso de la estructura interna. La presencia de X y CMC evitó este fenómeno, ya sea través de la formación de una red que refuerce la estructura de la miga, o evitando la rápida evaporación de agua.

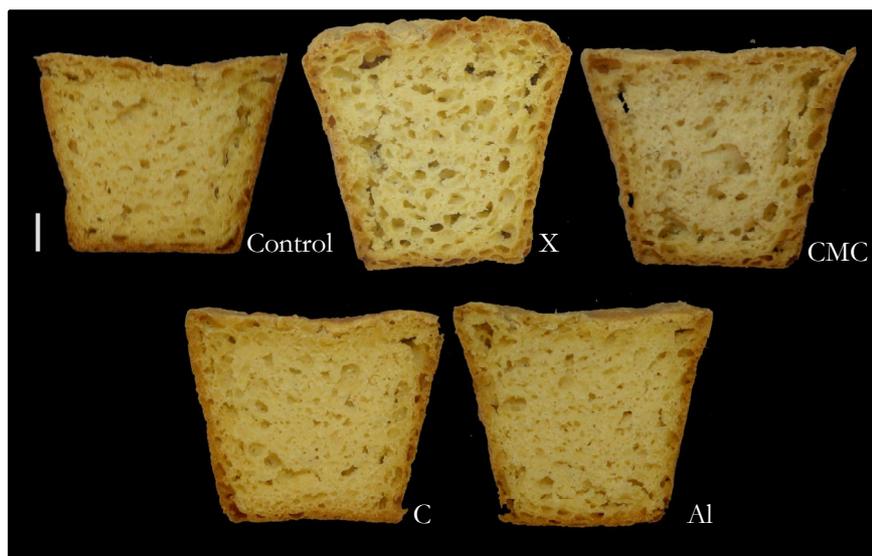


Figura 2.3. Fotografías de los panes control (sin hidrocólide), con goma xántica (X), carboximetilcelulosa (CMC), carragenato (C), y alginato (Al). Barra: 1 cm.

El porcentaje de área de miga ocupado por alvéolos fue mayor para los panes con goma xántica (Tabla 2.4). Como se esperaba, las migas con mayor cantidad de alvéolos por mm^2 presentaron alvéolos de menor tamaño. Los panes con X y CMC presentaron menor número de alvéolos por mm^2 en comparación con el pan control, mientras que los panes con C y Al mostraron mayor número de alvéolos (de menor tamaño) que el control. Autores como Mezaize y col. (2009) no observaron diferencias en estos parámetros entre panes con X o CMC y el control. En este trabajo, sin embargo, la incorporación de X y CMC condujo a panes con migas más aireadas: presentaron la menor uniformidad (relación de alvéolos pequeños/grandes), que indica que se están formando alvéolos de mayor tamaño. Se ha reportado que el uso de hidrocoloides como la goma xántica y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en panes libres de gluten produce la formación de una estructura en red similar a la estructura de la miga de panes con trigo (Ahlborn y col., 2005), aunque esto dependerá también de las materias primas que se utilicen.

Los hidrocoloides son también incorporados en los productos panificados con el fin de mejorar su vida útil, manteniendo su humedad y retardando el endurecimiento de la miga (Collar y col., 1999; Gray y BeMiller, 2003; Bárcenas y col., 2004). La goma xántica disminuyó la dureza inicial de la miga; el mismo efecto se observó con la incorporación de CMC, aunque en menor medida. El alginato no mostró diferencias en la dureza respecto al pan control, mientras que el C llevó a la formación de migas más duras. Como se esperaba, los panes con migas más blandas fueron los panes con mayor VE (Tabla 2.4).

La dureza inicial de la miga correlacionó negativamente con la resistencia del batido ($r=-0,94$; $p<0,05$). Este efecto puede estar relacionado con la mayor capacidad de los batidos más resistentes para retener el CO_2 durante la fermentación, produciendo migas más aireadas y, por consiguiente, con menor dureza. La pendiente de la recta de regresión de la curva resultante de la medición de la dureza

a distintos tiempos de almacenamiento (0, 24 y 72 h, 25 °C) indica que la presencia de X y CMC no sólo disminuyó la dureza inicial de la miga, sino también la velocidad de endurecimiento, respecto al control. Este efecto puede estar relacionado con la capacidad de retención de agua de los hidrocoloides durante el almacenamiento, ya que se ha informado una relación inversa entre el contenido de humedad de la miga y la velocidad de endurecimiento (Rogers y col., 1988). Además, Davidou y col. (1996) informaron que en panes con trigo tanto la dureza de la miga como la tasa de endurecimiento fueron reducidas mediante el agregado de hidrocoloides. Ellos propusieron que las gomas modifican la organización de la fase amorfa de la miga, inhibiendo la interacción entre las macromoléculas. Esto es válido también para los panes libres de gluten.

Respecto al color de la corteza, se observa en la Tabla 2.4 que la luminosidad de los panes con Al fue similar a la del control, mientras que los panes con X y CMC presentaron cortezas más claras. En general, se encuentra en la bibliografía que la incorporación de hidrocoloides conduce a cortezas más claras, tanto en panes de trigo (Sharadanant y Khan, 2003; Mandala y col., 2007; Shittu y col., 2009) como libres de gluten (Lazaridou y col., 2007; Mezaize y col., 2009). Esto se debería al efecto de los hidrocoloides sobre la distribución del agua, que impacta directamente sobre las reacciones de Maillard y de caramelización. Por el contrario, se encontró un oscurecimiento de la corteza en los panes con C, resultado que coincide con publicaciones previas, donde se observó el mismo comportamiento en panes con trigo (Mandala y col., 2009). No se encuentra elucidado si este efecto se debe a la interacción C-agua que modifica la cinética de las reacciones de Maillard o si el mismo C actúa como sustrato -como azúcar reductor- de las reacciones de Maillard o de caramelización, entre otras posibilidades.

Al y CMC aumentaron la componente amarilla y roja de la corteza.

3. Proteínas

3.1. Efecto de la incorporación de proteínas sobre las propiedades del batido

La Figura 2.4 ilustra el cambio de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de los batidos con el agregado de huevo en polvo y proteínas de suero en función de la frecuencia, a una deformación del 0,1%; y en la Tabla 2.5 se presentan los valores medios de G' , G'' y $\tan \delta$ para las formulaciones analizadas, a una frecuencia de 1 Hz.

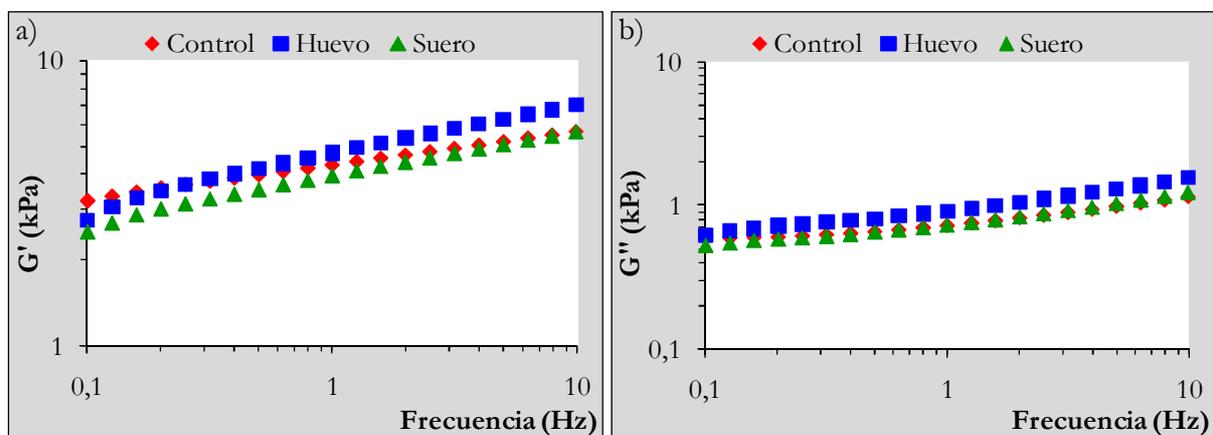


Figura 2.4. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de los batidos control (sin proteínas), con huevo en polvo y con proteínas de suero de leche elástico. a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

Para todas las muestras con proteínas, G' fue mayor que G'' en todo el rango de frecuencias analizado, que está relacionado con un comportamiento sólido-elástico de los batidos. No se observaron diferencias en el módulo elástico de los batidos con incorporación de proteínas en relación al control. Se ha informado que la incorporación de proteínas de lactosuero en panes a base de harina de trigo reduce el valor de los módulos G' y G'' , asociándose este efecto a la interrupción en la formación de la red de gluten (Mirsaeedghazi y col., 2008). Sin embargo, el mismo efecto no se observó en los panes libres de gluten, donde la red continua de proteína se encuentra ausente. Desde hace algunos años, en la literatura se asume

que las proteínas de leche no son apropiadas para reemplazar al gluten, y son agregadas en los productos de panificación por sus propiedades nutricionales, como la presencia de aminoácidos esenciales, o funcionales, como mejoradoras de las propiedades organolépticas o para retrasar el envejecimiento del pan (Stathopoulos, 2008). De esta manera, no se esperaba encontrar necesariamente un aumento significativo de la viscoelasticidad de estos batidos.

Tabla 2.5. Valores de módulos elástico (G') y viscoso (G'') y de $\tan \delta$ a 1 Hz, para las formulaciones con proteínas.

	Formulación		
	Control	Huevo	Suero
G' (kPa)	4,29 ^{a*}	4,71 ^a	3,95 ^a
G'' (kPa)	0,73 ^a	0,91 ^b	0,73 ^a
$\tan \delta$	0,169 ^a	0,193 ^b	0,185 ^b

*Letras distintas en una misma fila representan diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2. Efecto de la incorporación de proteínas sobre la calidad del pan

El volumen de pan se vio aumentado por la incorporación de proteínas (Tabla 2.6), y esto concuerda con la capacidad espumante que tienen estos aditivos; este aumento fue mayor para los panes con proteínas de suero. Moore y col. (2004, 2006) también obtuvieron panes de mayor volumen cuando incorporaron diferentes fuentes proteicas, como leche en polvo, huevo y harina de soja en panes elaborados a base de harinas de arroz, trigo sarraceno y almidones de maíz y papa. Otros autores, sin embargo, no encontraron diferencias en el VE en panes a base de harinas de arroz y maíz, y almidones de papa y maíz tras el agregado de huevo en polvo o proteínas de suero (Mezaize y col., 2009), mientras que Gallagher y col. (2003a) observaron una disminución del VE de panes elaborados con almidón de trigo y harina libre de gluten comercial mediante la incorporación de proteínas de suero.

Tabla 2.6. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación de proteínas.

	Formulación		
	Control	Huevo	Suero
VE (cm ³ /g)	1,93 ^a	2,10 ^{ab}	2,20 ^b
Nº alvéolos/mm ²	1,52 ^b	1,03 ^a	1,58 ^b
Tamaño alvéolos (mm ²)	3,58 ^b	3,04 ^b	2,57 ^a
% Área de alvéolos	36,1 ^b	31,8 ^a	38,6 ^b
Uniformidad	2,82 ^b	2,41 ^a	2,70 ^b
L*	50,48 ^a	52,21 ^a	49,81 ^a
a*	16,69 ^a	15,75 ^a	16,70 ^a
b*	26,88 ^a	26,98 ^a	26,57 ^a

*Letras distintas en la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En la Figura 2.5 se presentan imágenes representativas de los panes elaborados con proteínas. El análisis de las imágenes digitales (Tabla 2.6) muestra que el pan con suero presentó mayor área relativa de alvéolos, que coincide con su mayor VE; por otro lado, el pan con huevo presentó menor fracción de área ocupada por alvéolos, y menor uniformidad. Mezaize y col. (2009) no encontraron diferencias en la estructura de la miga mediante la incorporación de estas fuentes de proteínas.

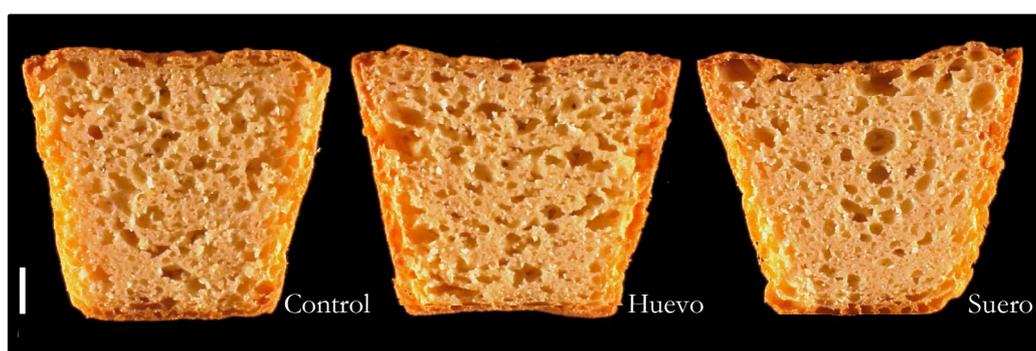


Figura 2.5. Fotografías de los panes control (sin proteínas), con incorporación de huevo en polvo y proteínas de suero. Barra: 1 cm.

Con respecto al color de la corteza, no se observaron diferencias respecto al control luego del agregado de las proteínas. Gallagher y col. (2003a) encontraron menores

valores de L^* luego de la incorporación de distintos grupos de proteínas obtenidas de la leche en panes libres de gluten. Sin embargo, aquí no se encontraron menores valores de L^* para los panes con huevo o suero, que por otra parte, era lo que se esperaba debido a la mayor presencia en estos panes de sustratos para que se lleven a cabo las reacciones de Maillard.

4. Emulsionantes

4.1. Efecto de la incorporación de emulsionantes sobre las propiedades de los batidos

Existen en la bibliografía numerosos trabajos de incorporación de DATEM y SSL a masas a base de trigo, aunque muy poco se ha llevado a cabo sobre masas libres de gluten. En la Figura 2.6 se presentan las curvas de G' y G'' en función de la frecuencia para los batidos con emulsionantes.

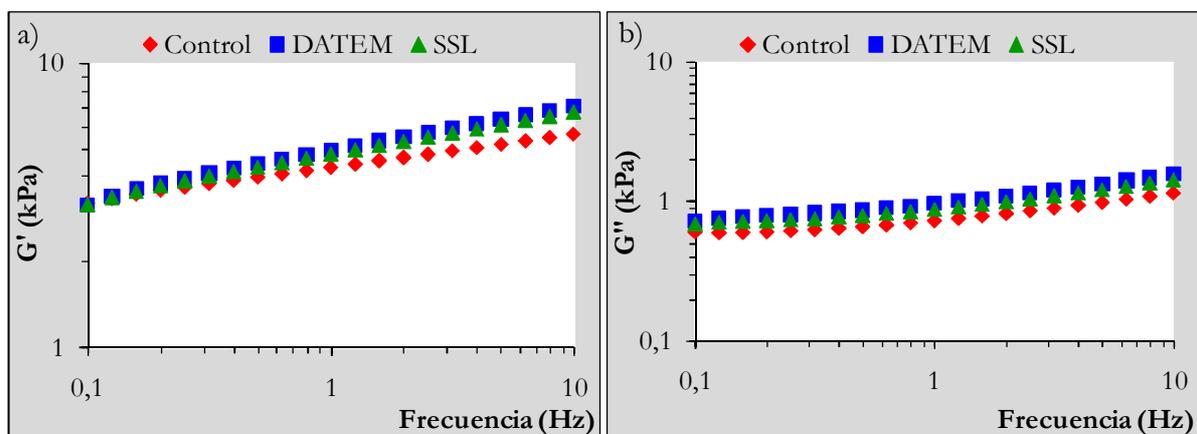


Figura 2.6. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de los batidos control (sin emulsionante), con éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM), y estearoil 2-lactilato de sodio (SSL). a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

Demirkesen y col. (2010) trabajando con masas a base de harina de arroz, encontraron un aumento en la elasticidad de las masas al incorporar 0,5% de DATEM y atribuyeron este comportamiento a la posible interacción entre el

emulsionante, favorecida por los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que posee, y otros componentes de la masa de arroz, como el agua o los lípidos.

Sin embargo, en este trabajo, la incorporación de emulsionantes aumentó los valores de $\tan \delta$ que es indicativo de una menor viscoelasticidad, aunque el SSL lo hizo en menor medida ($p < 0,05$) (Tabla 2.7). La incorporación de emulsionantes no modificó la componente elástica de los batidos con respecto al control (Figura 2.6).

Tabla 2.7. Valores de los módulos elástico (G') y viscoso (G''), y de $\tan \delta$ a 1 Hz, para las formulaciones con emulsionantes.

	Formulación		
	Control	DATEM	SSL
G' (kPa)	4,29 ^{a*}	4,94 ^a	4,78 ^a
G'' (kPa)	0,73 ^a	0,96 ^b	0,87 ^{ab}
$\tan \delta$	0,169 ^a	0,195 ^b	0,182 ^{ab}

DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio.

*Letras distintas en una misma fila representan diferencias significativas con $p < 0,05$.

4.2. Efecto de la incorporación de emulsionantes sobre la calidad del pan

El agregado de emulsionantes tuvo un efecto positivo aumentando el VE de los panes en relación al control. Los valores de VE fueron de 1,93; 2,19 y 2,17 cm^3/g para el pan control, con DATEM y con SSL, respectivamente (Tabla 2.8). Las diferencias entre los panes con DATEM y SSL no fueron significativas. Los emulsionantes se utilizan en la panificación con múltiples propósitos, entre los cuales se destaca mejorar la retención de gas, que resulta en mayores volúmenes específicos (Stampfli y Nersten, 1995).

En la Figura 2.7 se muestran imágenes representativas de los panes control y con emulsionantes. Los parámetros que caracterizan la estructura de la miga se resumen en la Tabla 2.8. El área de la rodaja ocupada por aire osciló entre 36,6 y 39,9% para los panes control y con DATEM ($p > 0,05$), respectivamente, y 43,7% para los panes con SSL, que mostró diferencias significativas respecto a las otras dos muestras. El

aire en la miga se distribuyó entre mayor cantidad de alvéolos de menor tamaño para los panes con SSL, mostrando mayor valor de uniformidad que el pan control y con DATEM.

Tabla 2.8. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación de emulsionantes.

	Formulación		
	Control	DATEM	SSL
VE (cm ³ /g)	1,93 ^{a*}	2,19 ^b	2,17 ^b
Nº alvéolos/mm ²	1,52 ^a	1,71 ^b	1,78 ^b
Tamaño alvéolos (mm ²)	3,58 ^a	3,25 ^a	3,14 ^a
% Área de alvéolos	36,1 ^a	39,9 ^a	43,7 ^b
Uniformidad	2,82 ^a	3,18 ^a	3,45 ^b
L*	50,48 ^a	54,76 ^b	49,15 ^a
a*	16,69 ^b	12,53 ^a	17,09 ^b
b*	26,88 ^a	23,56 ^a	25,51 ^a

DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio.

*Letras distintas en la misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

La corteza de los panes con DATEM fue diferente respecto al control, presentando mayores valores de L*, relacionado con una corteza más clara, y menores valores de a*, que corresponden a una menor componente roja (Tabla 2.8).

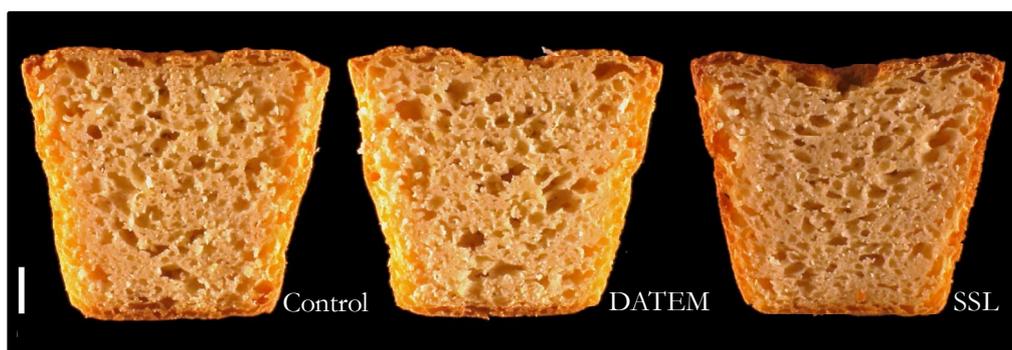


Figura 2.7. Fotografías de los panes control (sin emulsionante) y con incorporación éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM) y estearoil 2-lactilato de sodio (SSL). Barra: 1 cm.

5. Enzimas

5.1. Efecto de la incorporación de enzimas sobre las propiedades de los batidos

El comportamiento de los módulos elástico y viscoso en función de la frecuencia para los batidos con el agregado de glucosa oxidasa y α -amilasa se presentan en la Figura 2.8. Autores como Gujral y Rosell (2004a) evaluaron el efecto de la incorporación de distintas dosis de glucosa oxidasa en batidos a base de harina de arroz, y encontraron que tanto el módulo elástico como el módulo viscoso aumentaban respecto al control, y este cambio era mayor a medida que la concentración de GOX se incrementaba. Sin embargo, en la Figura 2.9 se observa que no hubo diferencias en la elasticidad de los batidos con GOX respecto al control. En la Tabla 2.9 se muestran los valores de G' , G'' y $\tan \delta$ a una frecuencia de 1 Hz.

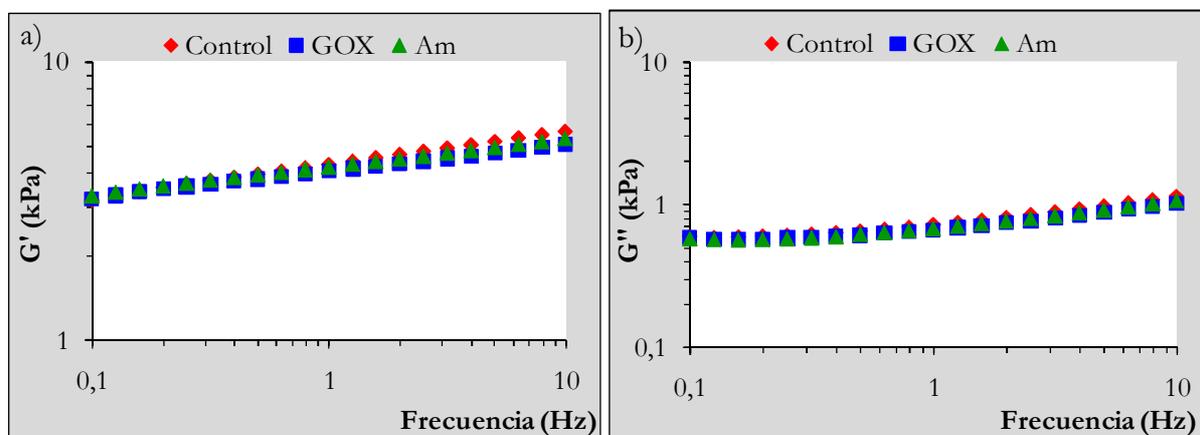


Figura 2.8. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de los batidos control (sin enzimas), con glucosa oxidasa (GOX) y α -amilasa (Am). a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

El propósito de la incorporación de α -amilasa es lograr la depolimerización parcial del almidón presente en la formulación, en parte durante la fermentación y en parte durante el horneado, de modo tal que el proceso de retrogradación de la amilopectina durante el almacenamiento del pan se vea reducido. En este trabajo

no se observaron diferencias significativas en los módulos G' y G'' ni en la $\tan \delta$ de los batidos con α -amilasa respecto al control ($p < 0,05$).

Tabla 2.9. Valores de módulos elástico (G') y viscoso (G'') y de $\tan \delta$ a 1 Hz, para las formulaciones con enzimas.

	Formulación		
	Control	GOX	Am
G' (kPa)	4,29 ^{a*}	4,06 ^a	4,21 ^a
G'' (kPa)	0,73 ^a	0,67 ^a	0,68 ^a
$\tan \delta$	0,169 ^a	0,164 ^a	0,162 ^a

GOX: glucosa oxidasa, Am: α -amilasa.

*Letras distintas en la misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2. Efecto de la incorporación de enzimas sobre la calidad del pan

Gujral y Rosell (2004a) informaron un aumento en el volumen específico de panes a base de harina de arroz tras la incorporación de glucosa oxidasa. Sin embargo, en la Tabla 2.10 se muestra que el VE de los panes con GOX no fue diferente al del pan control. Los panes con α -amilasa, por el contrario, sí mostraron un mayor VE ($p < 0,05$). Este efecto puede deberse a la hidrólisis del almidón accesible durante la fermentación y la primera etapa del horneado (antes que se produzca la inactivación de la enzima y la muerte de las levaduras por las altas temperaturas), que libera azúcares fermentables, disponibles para las levaduras. Resultados similares fueron informados por Cauvain y Chamberlain (1988) que, trabajando con panes elaborados a partir de 84 harinas de trigo diferentes, en todos los casos encontraron un mayor VE mediante el agregado de α -amilasa fúngica.

En la Figura 2.9 se muestran las imágenes de los panes control, con glucosa oxidasa y con α -amilasa. El análisis de imagen arrojó mayor área relativa de alvéolos para los panes con α -amilasa, y los alvéolos fueron en general pequeños, ya que el valor de uniformidad (alvéolos pequeños/alvéolos grandes) fue mayor. Estos resultados se condicen con el mayor VE encontrado para estos panes. La estructura de la miga

de los panes con GOX no mostró diferencias significativas con respecto al pan control ($p>0,05$).

Tabla 2.10. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación de enzimas.

	Formulación		
	Control	GOX	Am
VE (cm ³ /g)	1,93 ^{a*}	2,08 ^{ab}	2,11 ^b
Nº alvéolos/mm ²	1,52 ^a	1,57 ^a	1,68 ^b
Tamaño alvéolos (mm ²)	3,58 ^a	4,16 ^b	3,75 ^a
% Área de alvéolos	36,1 ^a	40,4 ^a	45,3 ^b
Uniformidad	2,82 ^a	3,20 ^a	3,79 ^b
L*	50,48 ^a	50,13 ^a	49,56 ^a
a*	16,69 ^c	14,41 ^b	13,36 ^a
b*	26,88 ^b	22,42 ^a	21,48 ^a

GOX: glucosa oxidasa, Am: α -amilasa.

*Letras distintas en la misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p<0,05$).

La luminosidad de la corteza, dada por el valor de L*, no se vio modificada mediante la incorporación de las enzimas (Tabla 2.10). La presencia de GOX llevó a cortezas con una menor componente roja, y esta disminuyó aun más tras la incorporación de α -amilasa. Ambas enzimas provocaron un menor valor de b*, que se corresponde con una caída en la componente amarilla.

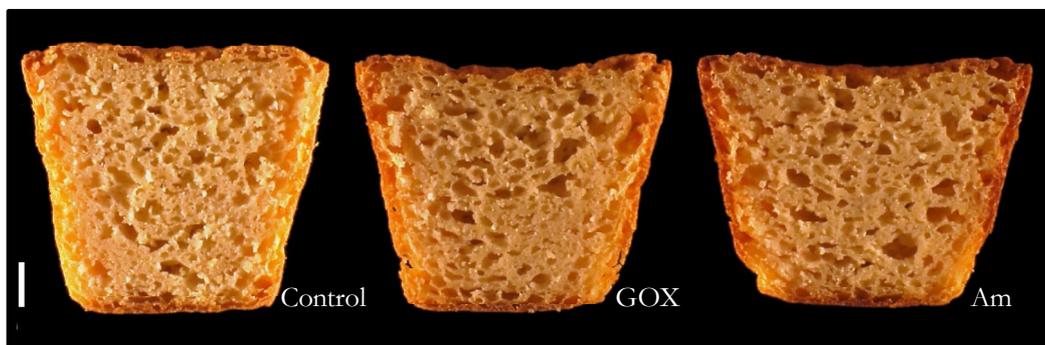


Figura 2.9. Fotografías de los panes control (sin enzimas) y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y α -amilasa (Am). Barra: 1 cm.

Los resultados del presente Capítulo muestran que la incorporación de hidrocoloides llevó a la obtención de panes con mejores propiedades tecnológicas que el pan control, y que estas diferencias se debieron en parte a la modificación de la consistencia del batido, dada por una mayor resistencia a la extrusión. Aunque se obtuvieron diferencias respecto al pan control mediante el agregado de proteínas, emulsionantes y enzimas, el efecto logrado no fue suficiente de acuerdo a lo que se esperaba; además, el comportamiento de los batidos no se vio alterado.

En lo que concierne a panes libres de gluten, ya se mencionó que se ha estudiado intensivamente la incorporación de aditivos, y se puede analizar una vasta bibliografía al respecto. En general, las materias primas comúnmente utilizadas en la elaboración de estos panes tienen una mayor absorción de agua en relación a la harina de trigo, que lleva a la incorporación de altas cantidades de agua en su formulación. Por este hecho, es muy conveniente la incorporación de algún hidrocoloide que controle las propiedades reológicas de las masas. De esta manera, cuando en la bibliografía se informa la evaluación de la calidad de panes libres de gluten con alto contenido de agua (generalmente mayores a 120%, base harina), y en estos sistemas se evalúa el efecto de distintos aditivos, la formulación base siempre incluye algún hidrocoloide (Moore y col., 2004; Lazaridou y col., 2007; Mezaize y col., 2009; Demirkesen y col., 2010). Otros investigadores que estudiaron el efecto de aditivos (distintos a los hidrocoloides) como la glucosa oxidasa (Gujral y Rosell, 2004a), transglutaminasa (Marco y Rosell, 2008b), proteínas de leche (Gallagher y col., 2003a,b), proteasas (Renzetti y Arendt, 2009a,b), y no incluyeron hidrocoloides en la formulación base, utilizaron cantidades de agua notablemente menores (menores a 95%). En el presente Capítulo se utilizó una elevada cantidad de agua (158%), que podría enmascarar el efecto de los aditivos evaluados, ya que, como se mencionó, los objetivos que se perseguían con su incorporación no fueron alcanzados, a excepción de las formulaciones que contenían hidrocoloides.

Por esto, se procedió al desarrollo de una nueva formulación donde la incorporación de agua fuera menor, a fin de reevaluar el efecto de estos aditivos. Este tema se abordará en la siguiente Sección.

Segunda Sección

*Propiedades de las masas y calidad de los
panes libres de gluten con bajo contenido de
agua*

Para seguir con este estudio, se optimizó una nueva formulación con materias primas diferentes que permitieron el desarrollo de un pan con un volumen y una estructura de miga aceptables agregando una cantidad de agua notablemente menor.

En primera instancia, se disminuyó la cantidad de harina de maíz incorporada -ya que esta presentaba una alta capacidad de absorción de agua- y se sustituyó en parte por harina de arroz, agregándose un 60% de agua (base harina). Al mismo tiempo, la harina de soja inactiva fue reemplazada por harina activa, ya que en trabajos previos se había reportado que el uso de harina sin calentar en el desarrollo de panes libres de gluten otorgaba mejores características en relación a la harina inactiva (Ribotta y col., 2004). Así se obtuvo el pan ilustrado en la Figura 1a, que mostró un volumen bajo y una miga muy compacta. Se incorporó entonces como nuevo ingrediente el almidón de mandioca, siguiendo la línea de trabajos previos (Ribotta y col., 2004). Se trabajó con harina de arroz, almidón de mandioca, harina de maíz, harina de soja activa y 80% de agua. Como se observa en la Figura 1b, se obtuvo un pan de mejores propiedades, aunque su alveolado resultó muy abierto. Al suprimirse por completo la harina de maíz se logró obtener un pan con sólo 65% de agua (Figura 1c) con buenas características. En la Figura 2 se presentan las imágenes del mismo pan obtenido con harina de arroz, almidón de mandioca y harina de soja activa, con un 65% de agua (Figura 1c), donde se incorporó leudante químico, y se probaron dos métodos de fermentación diferentes: fermentación directa (60 min de fermentación en molde) (Figura 2a), y fermentación doble (dos procesos de fermentación de 30 min, el segundo en molde) (Figura 2b). Se obtuvieron mejores resultados con el proceso de doble fermentación, como se evidencia en la Figura 2. Este pan se seleccionó como pan base, y sobre él se probó el efecto de los diferentes aditivos (Capítulo 4).

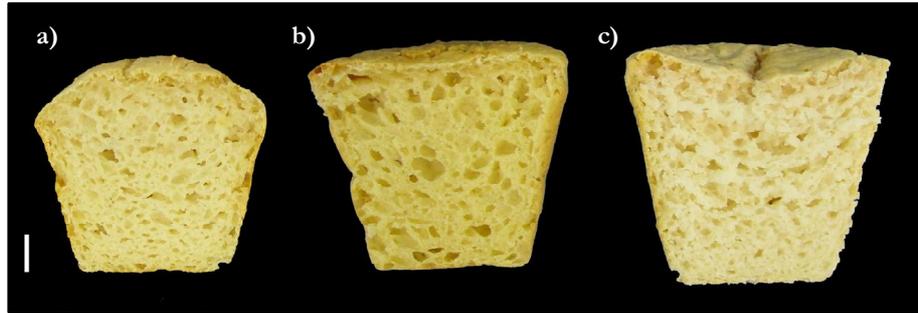


Figura 1. Sustitución de la harina de maíz por almidón de mandioca y la concomitante reducción de la cantidad de agua utilizada (Véase texto). Barra: 1 cm.

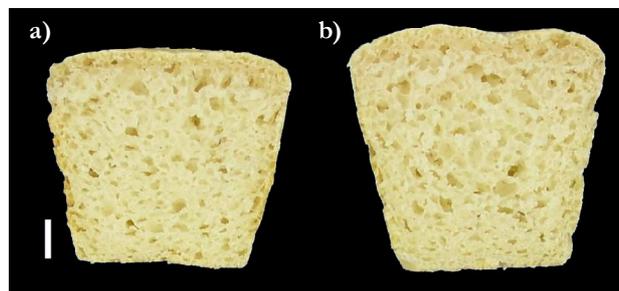


Figura 2. El pan obtenido en la Figura 1c fue sometido a dos procesos diferentes de fermentación. a) Fermentación simple; b) fermentación doble. Barra: 1 cm.

De la Figura 1 se desprende que la harina de soja activa no ejerció un efecto beneficioso neto sobre la calidad de panes a base de harina de arroz, resultado que coincide con los obtenidos por Ribotta y col. (2004). El efecto positivo de la harina de soja activa fue evidente recién cuando se incorporó el almidón de mandioca. A partir de estos resultados, se probaron preliminarmente tanto la harina de soja activa como inactiva para la panificación, junto a dos almidones distintos: almidón de mandioca y almidón de maíz. Se obtuvieron mejores resultados con la mezcla almidón de mandioca-harina de soja activa, por lo que se presumió que existe alguna interacción diferencial entre ambos componentes. Este estudio será expuesto en el Capítulo 3.

Capítulo 3

*Estudio del sistema
almidón-harina de soja*

Para la evaluación de las interacciones entre los almidones de mandioca y de maíz con la harina de soja, se utilizaron, en términos generales, 4 sistemas: almidón de mandioca/harina de soja activa (Md/HSA), almidón de mandioca/harina de soja inactiva (Md/HSI), almidón de maíz/harina de soja activa (Maíz/HSA), y almidón de maíz/harina de soja inactiva (Maíz/HSI).

1. Composición centesimal de las materias primas empleadas

En la Tabla 3.1 se resume la composición centesimal de las materias primas utilizadas en el estudio del sistema almidón/harina de soja.

Tabla 3.1. Composición centesimal de las materias primas empleadas en la elaboración de sistemas almidón/harina de soja.

	Almidón de mandioca	Almidón de maíz	HSA	HSI
Proteínas (%)	0,24	0,45	36,41	36,70
Cenizas (%)	0,09	0,01	4,72	4,50
Lípidos (%)	0,01	0,02	19,80	22,10
Fibra cruda (%)	0,21	0,41	2,83	2,30
Humedad (%)	12,87	10,41	5,98	4,50
Carbohidratos (%)	86,59	88,69	30,26	29,90

HSA: harina de soja activa; HSI: harina de soja inactiva.

2. Efecto de la harina de soja sobre la interacción de los almidones con el agua

En primera instancia, se evaluó la capacidad de las mezclas almidón/soja para interaccionar con el agua. Para ello, se determinó la capacidad de absorber agua y la sinéresis de los almidones y/o harinas y sus mezclas con un 65% de agua (Figura 3.1).

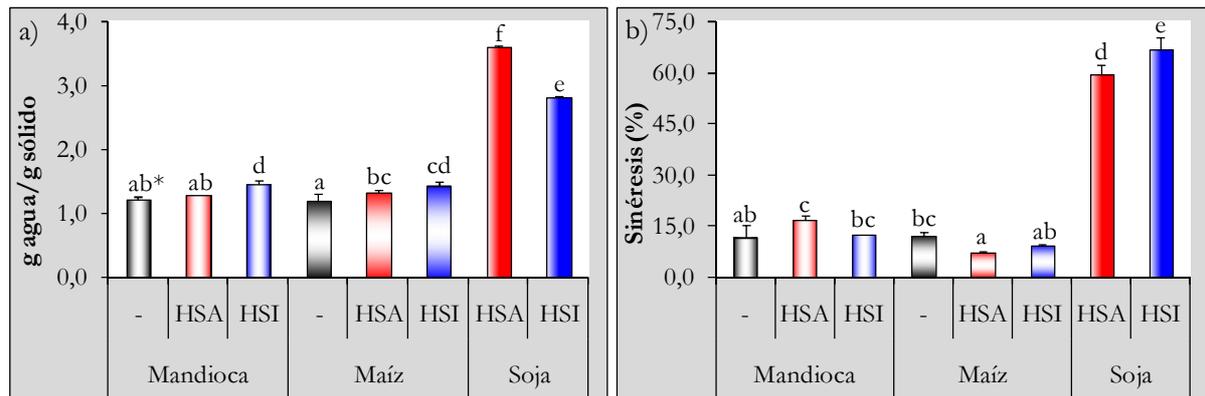


Figura 3.1. Valores absorción de agua (a) y sinéresis (b) para las muestras en estudio.

HSA: harina de soja activa, HSI: harina de soja inactiva.

*Letras distintas corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

La diferencia en la capacidad de absorción de agua de ambos almidones (mandioca y maíz) fue despreciable. Las harinas de soja, por otra parte, absorbieron mayor cantidad de agua que los almidones, y la HSA absorbió cantidades significativamente mayores que la HSI. El proceso de inactivación de la harina de soja conlleva la desnaturalización y el consecuente desplegamiento de las proteínas, mientras que se asume que las proteínas de la harina activa se encuentran principalmente en estado nativo. Los polipéptidos desplegados expondrían grupos hidrofóbicos que, de otra manera, estarían empacados en el interior de la proteína. En un medio acuoso, estas proteínas forman agregados y absorben menor cantidad de agua que las que se encuentran en estado nativo, que presentan alta afinidad por el agua.

La incorporación de harina de soja activa a los almidones tuvo un impacto diferente de acuerdo al almidón del que se tratara. Así, la absorción de agua se vio aumentada cuando se incorporó al almidón de maíz, y no se modificó cuando se agregó al de mandioca. La incorporación de HSI aumentó la absorción de agua de ambos almidones. Se sabe que los almidones poseen moléculas asociadas a su superficie, como lípidos y proteínas, y que éstas le otorgan mayor o menor hidrofobicidad, dependiendo de su naturaleza química. Las proteínas de la soja activa, que se

encuentran mayormente plegadas, exponen en su superficie grupos hidroxilo que se atraen con los componentes hidrofílicos de la superficie del gránulo de almidón. Así, parte de la proteína de soja formará puentes de hidrógeno con el agua, y parte con el almidón. En los resultados expuestos en la Figura 3.1 se observa que la mezcla mandioca/HSA no absorbió más agua con respecto al almidón de mandioca cuando se encuentra solo. Esto podría indicar que los componentes de superficie del gránulo de mandioca son predominantemente de carácter hidrofílico, estableciéndose una interacción proteína-almidón, que dificulte la absorción de agua por parte del almidón y de la proteína de soja.

La sinéresis fue mayor para las harinas de soja que para los almidones, y fue mayor para la harina de soja inactiva. A su vez, la menor sinéresis fue mostrada por las mezclas almidón de maíz/harina de soja activa, seguida por el almidón de maíz/harina de soja inactiva y el almidón de mandioca, sin encontrarse diferencias significativas entre las dos últimas (Figura 3.1). El almidón de maíz y la mandioca/harina activa presentaron valores intermedios.

Se encontró una correlación positiva entre la sinéresis y la capacidad de absorción de agua ($r=0,94$; $p<0,05$), lo que indica que mientras mayor cantidad de agua es absorbida por la muestra, hay más agua disponible para ser potencialmente liberada durante la centrifugación.

3. Calorimetría diferencial de barrido

A fin de evaluar el comportamiento térmico de las mezclas almidón/harina de soja, se utilizaron en total 4 harinas de soja: harina de soja activa entera, harina de soja activa deslipidizada, harina de soja inactiva entera y harina de soja inactiva deslipidizada. Cada harina fue combinada con los dos almidones, quedando definidas así 8 muestras. El objetivo fue evaluar si los lípidos -que constituyen alrededor del 20% de la harina de soja- ejercían algún efecto sobre las propiedades calorimétricas de las mezclas almidón/harina de soja.

3.1. Gelatinización

El proceso de gelatinización del almidón es afectado por numerosos factores, como el contenido de agua, la presencia de lípidos, azúcares, sales y otras moléculas, la temperatura, las condiciones de procesamiento de la materia prima, entre otros. En la Tabla 3.2 se presentan los parámetros de gelatinización para los almidones y las mezclas almidón/harina de soja. Los parámetros de gelatinización del almidón de mandioca estuvieron de acuerdo a los encontrados por otros autores (Moorthy, 2002; Nwokocha y col., 2009), y lo mismo ocurrió para el almidón de maíz (Li y col., 2007; Ribotta y col., 2007).

La presencia de la harina de soja produjo un corrimiento de la endoterma de ambos almidones hacia temperaturas más altas. Este cambio se debería a la interacción entre las proteínas y el material lixiviado del gránulo durante la gelatinización y/o entre las proteínas y los componentes de la superficie del gránulo (Ribotta y col., 2007), así como a una menor disponibilidad de agua para el proceso de gelatinización. La harina de soja deslipidizada produjo un corrimiento del pico de gelatinización del almidón de mandioca hacia mayores temperaturas en comparación con la harina entera. Como se verá más adelante, los gránulos del almidón de mandioca pierden en mayor grado su estructura durante la gelatinización en comparación con los gránulos del maíz. De esta manera, las cadenas de almidón desplegadas se encuentran disponibles en mayor medida para su interacción con el material exógeno. Sumado a este hecho, la harina deslipidizada tiene en proporción mayor cantidad de proteínas que pueden interaccionar con el gránulo o con el agua (hidrofílicas). Estas interacciones pueden ser las responsables del aumento de la temperatura de gelatinización del almidón.

La entalpía de gelatinización del almidón de mandioca fue disminuida por la incorporación de harina de soja activa e inactiva; mientras que el almidón de maíz fue afectado únicamente por la harina de soja inactiva. En la literatura existen opiniones contrapuestas acerca del efecto de la disponibilidad de agua sobre la

entalpía de gelatinización del almidón. Así, Li y col. (2007) argumentaron que el agregado de concentrado proteico de soja restringía el hinchamiento y gelatinización del almidón de maíz tal vez debido a la reducción de la cantidad de agua disponible, aumentando la energía necesaria para la transición (mayores valores de ΔH). Siguiendo la misma línea, Garcia y col. (1996), informaron que mayores cantidades de agua llevan a menores entalpías de gelatinización, y fundamentaron que la entalpía medida representa el balance entre la fusión endotérmica (desorganización de las doble hélices y de los arreglos que éstas forman) y efectos exotérmicos, como la hidratación. No obstante, Donovan (1979); Biliaderis y col. (1980); Eliasson (1980); Münzing (1991); Rolée y Le Meste (1999) sugirieron que la entalpía de transición disminuye a medida que se reduce la disponibilidad de agua, de acuerdo a los resultados aquí expuestos. Esto podría deberse a restricciones en el grado de desordenamiento molecular de las cadenas de almidón, que lleva a menores valores de entalpía.

3.2. Retrogradación

La presencia de harina de soja tuvo diferentes efectos sobre la retrogradación de la amilopectina, de acuerdo al tipo de harina y de almidón. Así, la harina de soja activa disminuyó significativamente (en un 80%) la entalpía de retrogradación del almidón de mandioca y, en menor medida, la del maíz (en un 50%). Por el contrario, la harina inactiva aumentó este parámetro para el almidón de mandioca, y no lo modificó para el almidón de maíz. Mediante el uso de microscopía de fluorescencia, Ribotta y Rosell (2010) mostraron que durante la gelatinización el almidón de mandioca pierde casi completamente su estructura granular, y que presenta una fase dispersa formada por una dispersión de polímeros (amilosa/amilopectina); mientras que el almidón de maíz consta de una matriz constituida por gránulos hinchados comprimidos unos contra otros. Por este motivo, las proteínas de la HSA pueden interactuar con mayor facilidad con el almidón de mandioca durante el proceso de

gelatinización, que ocurre a temperaturas inferiores a la de desnaturalización de las proteínas de soja (≈ 85 °C, datos no mostrados). Esta interacción explicaría la menor retrogradación de la amilopectina durante el almacenamiento a 4 °C. Por otro lado, las proteínas presentes en la harina de soja inactiva interactúan íntimamente entre sí, lo que dificulta la interacción proteína-almidón. Bajo estas condiciones, su efecto sobre la recristalinización de la amilopectina sería menor en comparación con el de la HSA. Estas observaciones están de acuerdo con los valores de *setback* encontrados en los ensayos de RVA.

Tabla 3.2. Parámetros de gelatinización y retrogradación para las diferentes mezclas almidón/harina de soja estudiadas.

Muestra	Gelatinización			Retrogradación		
	ΔH (J/g almidón)	To (°C)	Tp (°C)	ΔH (J/g almidón)	To (°C)	Tp (°C)
Mandioca	11,72 ^{e*}	58,37 ^a	64,81 ^a	3,46 ^c	40,64 ^a	58,27 ^d
Mandioca/HSA	10,18 ^{cd}	59,91 ^{ab}	66,83 ^b	0,69 ^a	45,20 ^c	57,51 ^{cd}
Mandioca/HSA-d	10,29 ^{cd}	60,46 ^b	68,29 ^{cd}	0,56 ^a	46,24 ^c	59,15 ^d
Mandioca/HSI	10,64 ^d	60,27 ^b	67,19 ^{bc}	4,58 ^d	42,49 ^{ab}	54,16 ^a
Mandioca/HSI-d	10,51 ^{cd}	62,46 ^c	69,17 ^{de}	4,53 ^d	42,58 ^b	54,49 ^{ab}
Maíz	9,66 ^{bc}	64,19 ^c	69,89 ^e	4,34 ^d	42,52 ^{ab}	57,58 ^{cd}
Maíz/HSA	8,98 ^b	66,66 ^d	71,84 ^f	2,54 ^b	42,99 ^b	56,84 ^{bcd}
Maíz/HSA-d	9,11 ^b	67,62 ^d	72,82 ^f	2,97 ^{bc}	43,23 ^b	57,26 ^{cd}
Maíz/HSI	7,90 ^a	66,90 ^d	72,04 ^f	4,61 ^d	42,83 ^b	53,73 ^a
Maíz/HSI-d	7,99 ^a	67,94 ^d	73,00 ^f	4,45 ^d	43,78 ^b	55,06 ^{abc}

To: temperatura de inicio de gelatinización; Tp: temperatura de pico de gelatinización; ΔH : entalpía de gelatinización.

HSA: harina de soja activa, HSA-d: harina de soja activa deslipidizada, HSI: harina de soja inactiva, HSI-d: harina de soja inactiva deslipidizada.

* Letras distintas en una misma columna corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A partir de la Tabla 3.2 se deduce que la presencia de lípidos no afectó la retrogradación de la amilopectina. De acuerdo con estos resultados, Eliasson y Ljunger (1988) encontraron que, al estudiar el efecto de distintos lípidos como el bromuro de cetiltrimetilamonio, monoglicéridos saturados e insaturados, la lecitina y el aceite de soja, sobre la retrogradación de la amilopectina, el mayor efecto a la hora de disminuir la retrogradación fue logrado mediante la incorporación del bromuro de cetiltrimetilamonio seguido por la lecitina, mientras que el aceite de soja no presentó diferencias significativas respecto al control.

4. Propiedades de *pasting*

A partir de la curva de viscosidad en función del tiempo registrada mediante el uso del RVA (*Rapid Visco Analyser*), aplicando un programa de calentamiento, se obtienen una serie de parámetros (temperatura de pasta, viscosidad de pico, *breakdown*, *setback* y viscosidad final) que son indicativos de las propiedades físicas del almidón, y que están íntimamente asociados con sus características químicas (relación amilosa/amilopectina y componentes asociados al gránulo -lípidos y proteínas-, entre otros).

Wickramasinghe y col. (2009) hallaron temperaturas de pasta para el almidón de mandioca similares a las que se presentan en este trabajo (Tabla 3.3), aunque encontraron menor viscosidad de pico. Sriroth y col. (1999) informaron diferencias en las propiedades de *pasting* de los almidones de mandioca al comparar diferentes cultivares y tiempos de cosecha. Esto podría explicar las diferencias que se encuentran en la bibliografía en las propiedades de *pasting* del almidón de mandioca (Creda y Wosiacki, 1985; Nwokocha y col., 2009).

Los parámetros de *pasting* del almidón de maíz están de acuerdo con los informados por otros autores (Sandhu y Singh, 2007; Sandhu y col., 2008), aunque estos parámetros son muy variables dependiendo de las condiciones de ensayo y la variedad de maíz utilizada.

Como se resume en la Tabla 3.3, el almidón de mandioca presentó mayor viscosidad de pico que el almidón de maíz, mientras que este último presentó mayor temperatura de pasta y viscosidad final. La mayor viscosidad de pico está relacionada con la capacidad de absorber agua que, a su vez, depende del empaquetamiento de los cristales de amilopectina y/o de las interacciones entre los componentes de la fase amorfa. La baja temperatura de pasta y el rápido aumento de la viscosidad durante el calentamiento de la mandioca son el resultado de una estructura más débil del gránulo y mejores propiedades para absorber agua en comparación con el almidón de maíz. Existe una correlación aparente entre el patrón de hinchamiento de los gránulos de almidón, la resistencia a la cizalla (corte) y al contenido de lípidos y proteínas del almidón. Así, los almidones que se hinchan rápidamente durante el calentamiento tienden a ser más sensibles a la cizalla y contienen menos lípidos y proteínas que los almidones que muestran un hinchamiento más controlado (Debet y Gidley, 2006).

El *breakdown* está relacionado con la capacidad del almidón para soportar el calentamiento y el esfuerzo de corte, por lo que se trata de un factor importante en numerosos procesos industriales. Usualmente, altos valores de *breakdown* están asociados a altas viscosidades de pico (Ragae y Abdel-Aal, 2006). Así, en este trabajo se encontró una correlación significativa entre el *breakdown* y la viscosidad de pico ($r=0,96$; $p<0,05$) y la temperatura de pico ($r= -0,83$; $p<0,05$), lo que corrobora que el almidón que se hincha más rápidamente, se rompe con mayor facilidad, y mayor viscosidad imparte al sistema.

Las proteínas exógenas al almidón pueden afectar el proceso de gelatinización de diferentes maneras dependiendo de su capacidad de retener agua o de interactuar con el almidón o la superficie de los gránulos (Ribotta y Rosell, 2010). La incorporación de harina de soja tuvo un efecto dramático sobre el comportamiento de ambos almidones, aunque principalmente sobre el de mandioca. En primera instancia, se presentó una disminución en la viscosidad de pico que se debe, en

parte, a un efecto de dilución del almidón. Sin embargo, para ambos almidones, la presencia de harina activa causó una disminución más marcada que la harina inactiva. En la Tabla 3.3 se muestra que la viscosidad de pico fue reducida en un 60,9% por la presencia de harina activa, mientras que fue solo del 9,8% para la harina inactiva. Paralelamente, este mismo parámetro para el almidón de maíz se vio reducido en un 39,3% por la harina activa, y en un 14,1% por la inactiva. Siguiendo la misma tendencia, el *breakdown* de la mandioca se redujo en un 61,2% y un 13,1% mediante la incorporación de harina de soja activa e inactiva, respectivamente; mientras que para el maíz, estas reducciones fueron de 23,8% y 12,6%. Los porcentajes de reducción de estos parámetros para ambos almidones mediante la incorporación de la HSI coinciden casi exactamente con la dilución del almidón (90% de almidón + 10% de harina de soja).

Por último, el *setback* de la mandioca disminuyó un 65,4% y un 26,9% mediante el agregado de harina de soja activa e inactiva, respectivamente. Contrariamente, el *setback* del almidón de maíz aumentó por la incorporación de la harina de soja.

Las harinas deslipidizadas, en modo general produjeron reducciones aun mayores en estos parámetros en comparación con las harinas enteras, y esto podría deberse a la mayor proporción de proteínas que tienen las harinas deslipidizadas.

A modo de resumen, el almidón de mandioca presentó una estructura granular más débil, exponiendo en mayor medida las cadenas de amilosa/amilopectina que aumentan la superficie para la interacción con las proteínas exógenas. Además, como ya se mencionó, las proteínas en la harina de soja inactiva se suponen en estado desplegado, aumentando la interacción proteína-proteína; mientras que la mayoría de las proteínas de la harina activa se encontraría en estado nativo, siendo capaz de interactuar con el almidón.

Tabla 3.3. Propiedades de *pasting* de las diferentes mezclas analizadas.

Muestra	T _p (°C)	VP (BU)	VF (BU)	Breakdown (BU)	Setback (BU)
Mandioca	67,8 ^{a*}	427,9 ^h	237,5 ^g	283,4 ⁱ	92,6 ^e
Mandioca/HSA	68,6 ^{bc}	167,5 ^c	88,9 ^a	110,3 ^f	31,6 ^a
Mandioca/HSA-d	69,1 ^c	165,9 ^c	80,8 ^a	113,8 ^f	28,7 ^a
Mandioca/HSI	68,3 ^{ab}	386,1 ^g	207,7 ^e	246,2 ^h	67,8 ^b
Mandioca/HSI-d	68,6 ^{bc}	366,0 ^f	198,0 ^d	232,2 ^g	64,2 ^b
Maíz	76,8 ^d	232,8 ^e	247,6 ^h	76,5 ^d	91,2 ^{de}
Maíz/HSA	76,7 ^d	141,3 ^b	188,6 ^c	49,3 ^b	96,5 ^e
Maíz/HSA-d	76,3 ^d	133,3 ^a	176,4 ^b	34,3 ^a	77,4 ^c
Maíz/HSI	76,3 ^d	199,9 ^d	216,3 ^{ef}	87,9 ^e	104,2 ^f
Maíz/HSI-d	76,8 ^d	196,9 ^d	218,2 ^f	63,0 ^c	84,3 ^d

Tp: temperatura de pasta; VP: viscosidad de pico; VF: viscosidad final; BD: *breakdown*; SB: *setback*.

HSA: harina de soja activa, HSA-d: harina de soja activa deslipidizada, HSI: harina de soja inactiva, HSI-d: harina de soja inactiva deslipidizada.

*Letras distintas en una misma columna corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5. Difractometría de Rayos X (DRX)

Los datos hasta aquí recopilados indican que la proteína de soja interacciona con el almidón de mandioca durante la gelatinización, y que esta interacción dificulta y/o demora la recristalinización de la amilopectina. A fin de corroborar este hallazgo, se realizó espectrometría de difracción de rayos X para evaluar la formación de cristales durante la retrogradación de la amilopectina. La Figura 3.2 muestra los difractogramas de las mezclas almidón/harina de soja gelatinizadas y luego almacenadas por 7 días a 4 °C. Todas las muestras presentaron picos característicos de la estructura tipo B (14°, 15°, 17°, 20°, 22°, 24°, 26°, las muestras con mandioca presentaron también un pico a 5°), típica del almidón retrogradado (Eliasson y Gudmundsson, 1996), aunque la intensidad de estos picos varió de una muestra a otra.

Para las muestras con almidón de mandioca, se observa una drástica disminución en la cristalinidad mediante la incorporación de HSA, lo que demuestra que, efectivamente, ésta interfirió durante el proceso de recristalinización de la

amilopectina. Por otra parte, la mezcla Md/HSA presentó un perfil similar al del almidón de mandioca. Para las muestras con almidón de maíz se observa la misma tendencia, con una reducción de la cristalinidad causada por el agregado de la HSA, aunque este efecto fue menos marcado que cuando se incorporó al almidón de mandioca.

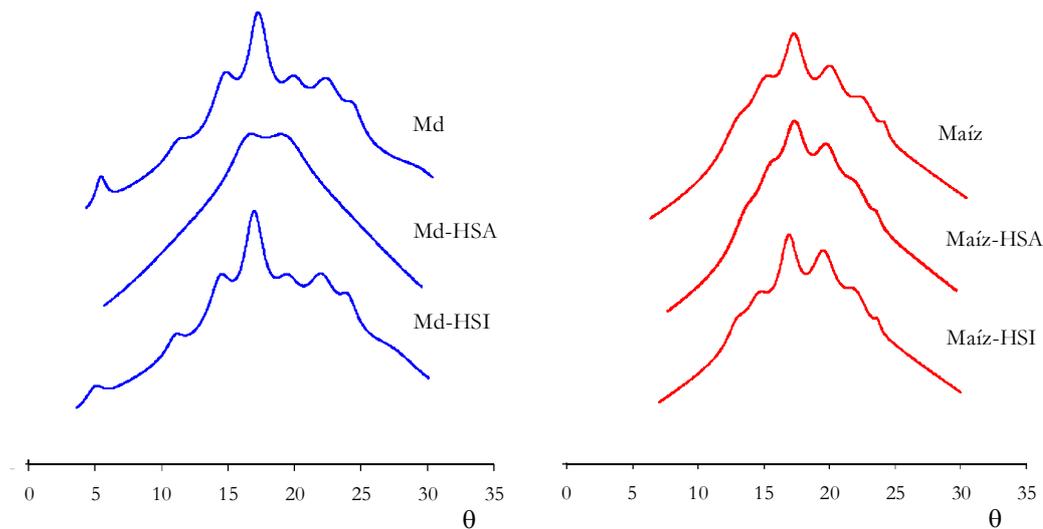


Figura 3.2. Difractogramas de rayos X para las mezclas almidón/harina de soja gelatinizadas y con 7 días de almacenamiento (4 °C).

Md: mandioca, HSA: harina de soja activa, HSI: harina de soja inactiva

Corroborando estas observaciones, en la Tabla 3.4 se muestra que la fase cristalina formada durante la retrogradación fue notablemente reducida mediante la incorporación de harina de soja activa, y este efecto fue evidente para ambos almidones. Sin embargo, fue más marcado en la mezcla almidón de mandioca/harina de soja activa. Este resultado coincide con los resultados de *setback* y DSC que demuestran una reducción evidente en la retrogradación del almidón de mandioca mediante la incorporación de harina de soja activa.

Tabla 3.4. Áreas relativas de las fases amorfa y cristalina para las mezclas almidón/harina de soja gelatinizadas y con 7 días de almacenamiento (4 °C).

Muestra	Área relativa (%)	
	Amorfa	Cristalina
Mandioca	74,57	25,43
Mandioca/HSA	88,41	11,59
Mandioca/HSI	74,92	25,08
Maíz	76,29	23,71
Maíz/HSA	78,62	21,38
Maíz/HSI	74,55	25,45

HSA: harina de soja activa, HSI: harina de soja inactiva

6. Reometría

La Figura 3.3 ilustra el cambio de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la frecuencia para mezclas almidón/harina de soja (los almidones solos, sin la presencia de harina de soja, no pudieron medirse debido a la rápida separación de fases). Ambos módulos fueron dependientes de la frecuencia; las muestras presentaron un comportamiento reológico correspondiente a una solución concentrada (gel débil), donde se observó una tendencia a un cruce de los módulos dinámicos a bajas frecuencias, con mayores valores de G'' a menores frecuencias y un aumento en G' a frecuencias mayores.

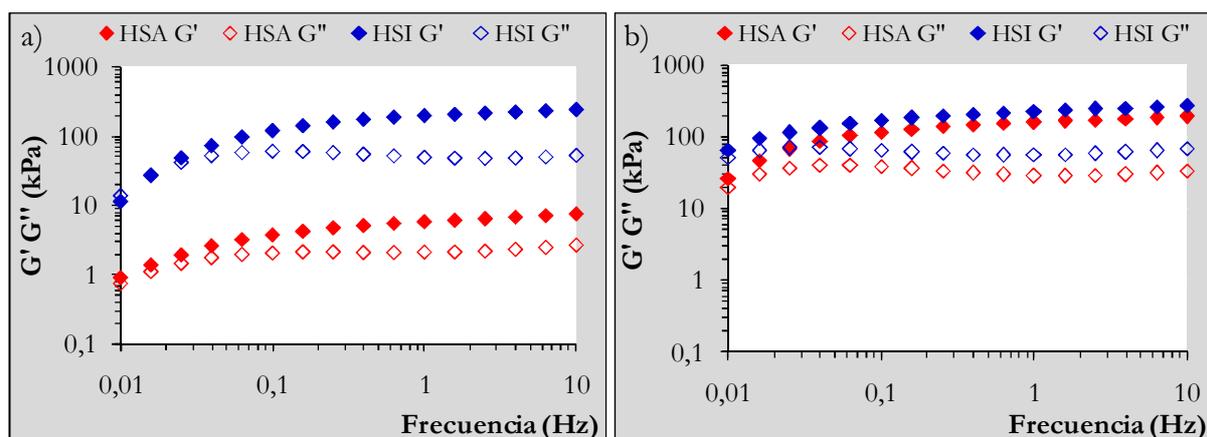


Figura 3.3. Variación de los módulos elástico y viscoso (G' y G'' , respectivamente). Masas a base de almidón de mandioca (a), y almidón de maíz (b).

HSA: harina de soja activa, HSI: harina de soja inactiva

En la Tabla 3.5 se presentan los valores de G' , G'' y $\tan \delta$ a una frecuencia de 1 Hz para las mezclas en estudio. Para la mezcla Md/HSA, la diferencia en los valores de ambos módulos fue más pequeña, por lo que la $\tan \delta$ fue mayor. Otros autores, al trabajar con masa de bizcochuelo a base de diferentes almidones con incorporación de proteína de soja y gluten en distintas proporciones, encontraron que la presencia de proteínas, especialmente de soja, disminuía significativamente la $\tan \delta$ del sistema (Ronda y col., 2011).

Tabla 3.5. Valores de G' , G'' y $\tan \delta$ (1 Hz) para las muestras en estudio.

Muestra	G' (kPa)	G'' (kPa)	$\tan \delta$
Mandioca/HSA	5,9 ^{a*}	2,1 ^a	0,355 ^c
Mandioca/HSI	200,3 ^b	50,8 ^c	0,254 ^b
Maíz/HSA	158,5 ^b	28,4 ^b	0,183 ^a
Maíz/HSI	224,0 ^b	55,6 ^c	0,251 ^b

HSA: harina de soja activa, HSI: harina de soja inactiva.

* Letras diferentes en una misma columna corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Para las mezclas a base de almidón de mandioca, los valores de $\tan \delta$ fueron mayores cuando se incorporó harina de soja activa, mientras que para el almidón de maíz, $\tan \delta$ fue mayor cuando se agregó harina de soja inactiva; el efecto de la harina de soja activa sobre las propiedades reológicas de los almidones fue totalmente dependiente de la naturaleza del almidón.

Se ha postulado que diferentes almidones interactuarían con proteínas exógenas a través de proteínas asociadas al gránulo (Ryan y Brewer, 2007). Las proteínas asociadas a la superficie del gránulo de almidón son aquellas que se encuentran naturalmente sobre la superficie o formando parte integral del gránulo de almidón. Son distintas a las proteínas de reserva del grano o tubérculo, y se trata principalmente de enzimas que participan en la síntesis del almidón, y tienen un peso molecular entre 5 y 149 kDa (Baldwin, 2001). La presencia de estas proteínas

ha sido identificada en almidones de diversas fuentes botánicas, como trigo, cebada, maíz, arroz, mijo, papa y mandioca, entre otras (Yoshino y col., 2005).

Ryan y Brewer (2007) evaluaron la asociación entre las proteínas de soja y el almidón de trigo mediante estudios de adsorción y desorción, y encontraron que las proteínas asociadas al almidón afectarían la unión de las proteínas agregadas (exógenas) a la superficie del gránulo, y concluyeron que las proteínas nativas del almidón atraen y retienen a las proteínas agregadas en íntima asociación con el gránulo.

Aunque se sabe que las proteínas asociadas al gránulo de almidón, presentes en pequeñas cantidades (0,25-0,6% para almidones de cereales y 0,1% para el almidón de mandioca) afectan desproporcionadamente las propiedades físicas del almidón, han sido poco estudiadas a excepción de las que se encuentran en el almidón de trigo. Se sabe además que su naturaleza química y, por ende, las propiedades que le otorgan al almidón, es muy variable de acuerdo a su origen botánico.

Es muy probable que las proteínas asociadas a los gránulos de mandioca y de maíz tengan una estructura diferente, impartiendo al almidón distinta capacidad para interactuar con las proteínas de soja. Debe tenerse en cuenta además, que las proteínas desnaturalizadas de la soja tienen un carácter más hidrofóbico con respecto a las proteínas nativas. Esto lleva a pensar que la relación almidón-proteína exógena mediada a través de las proteínas asociadas al gránulo es altamente dependiente de la estructura de ambas proteínas.

Este ensayo demuestra que las proteínas de soja y el almidón de mandioca no sólo interaccionan durante la gelatinización del almidón, cuando se despliegan las cadenas de amilosa/amilopectina, sino también en condiciones donde el almidón se encuentra en estado nativo.

7. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

A fin de estudiar el grado de interacción entre el almidón y las proteínas presentes en la harina de soja, se realizaron las mezclas almidón/harina de soja y luego se llevó a cabo la extracción de las proteínas con solución tampón (pH 6,9) para determinar la existencia de una afinidad diferencial entre los distintos tipos de proteínas (nativa o desnaturalizada) y de almidón (mandioca o maíz).

Se sabe que la presencia de lípidos afecta las propiedades de las proteínas presentes en la masa a la hora de elaborar productos panificados (Chung y col., 1981). Para evaluar el efecto de los lípidos presentes en la harina de soja sobre la interacción almidón/proteína, se consideraron dos tipos de muestras para el análisis de HPLC: 1) mezclas almidón/soja activa o inactiva enteras, liofilizadas y luego deslipidizadas con n-hexano antes de llevar a cabo la extracción de proteínas, y 2) mezclas almidón/harina de soja activa o inactiva previamente deslipidizadas con n-hexano, y luego liofilizadas.

La Figura 3.4 muestra los cromatogramas típicos para las muestras analizadas. El tiempo de elución del primer pico fue alrededor de 13 min. Este tiempo es notablemente mayor al encontrado por Maforimbo y col. (2006), que realizaron una extracción de proteínas a partir de harina de soja entera y activa, con una solución tampón de fosfato pH 6,9 con 0,5% de SDS, y las fraccionaron utilizando HPLC de exclusión molecular. Estos autores encontraron un tiempo de retención de ≈ 3 min; esta diferencia se atribuye a la presencia de SDS en la solución tampón, que facilita la extracción de las proteínas de mayor tamaño molecular, que eluyen a tiempos más cortos que las de menor tamaño.

A partir de los cromatogramas se observa a simple vista que, como se esperaba, las muestras que contenían harina de soja inactiva presentaron menor solubilidad de proteínas en solución tampón de fosfato (pH 6,9) debido a la desnaturalización, agregación e insolubilización de proteínas durante el proceso de inactivación. Otro

hecho evidente es que la presencia de lípidos durante la preparación de las mezclas disminuyó la cantidad de proteínas extraídas.

No se observaron diferencias en los perfiles de los cromatogramas obtenidos, por lo que en caso de existir una interacción química y/o física entre las proteínas nativas de la soja y el almidón de mandioca, éstas no se vieron manifiestas mediante el empleo de esta técnica.

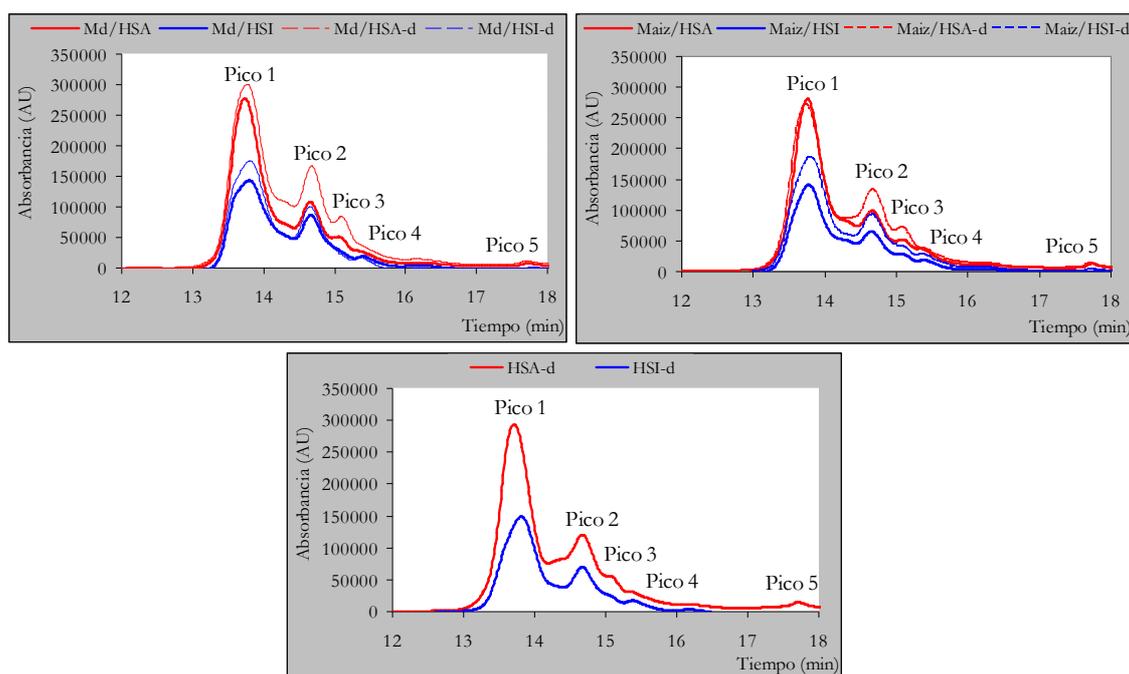


Figura 3.4. Cromatogramas obtenidos por HPLC-SE para las proteínas extraídas de las muestras bajo estudio. Md: almidón de mandioca, HSA: harina de soja activa, HSA-d: harina de soja activa deslipidizada, HSI: harina de soja inactiva, HSI-d: harina de soja inactiva deslipidizada.

En la Figura 3.5 se presentan las áreas totales correspondientes a las proteínas extraídas de las mezclas almidón/harina de soja. Corroborando lo que ya se expuso, las proteínas de la harina inactiva y sus mezclas con ambos almidones fueron extraídas en menor proporción que las de la harina activa y sus mezclas; y la extracción total fue mayor cuando se empleó harina de soja deslipidizada. Esto puede deberse a la mayor proporción de proteínas que presentan estas harinas en relación a las harinas enteras; además, es posible que la presencia de lípidos

aumente las interacciones hidrofóbicas proteína-lípido, disminuyendo la solubilidad de las proteínas. Este comportamiento fue fácilmente reconocible para las mezclas que tenían HSA, aunque la HSI deslipidizada presentó una menor cantidad de proteínas extraíbles en relación a las mezclas almidón/HSI. Durante la elaboración de las masas de harina de soja inactiva, es probable que se formen agregados proteicos de alto peso molecular que no sean fácilmente extraíbles con solución tampón de fosfato. Por otro lado, cuando se realizaron las mezclas almidón/HSI, posiblemente el almidón haya interferido en la formación de estos agregados proteicos, aumentando la solubilidad de las proteínas presentes en el medio. Sin embargo, cuando los lípidos se encontraban presentes durante la elaboración de las mezclas, la solubilidad de las proteínas disminuyó porque los lípidos aumentan las interacciones hidrofóbicas proteína-lípido, disminuyendo la solubilidad de las proteínas.

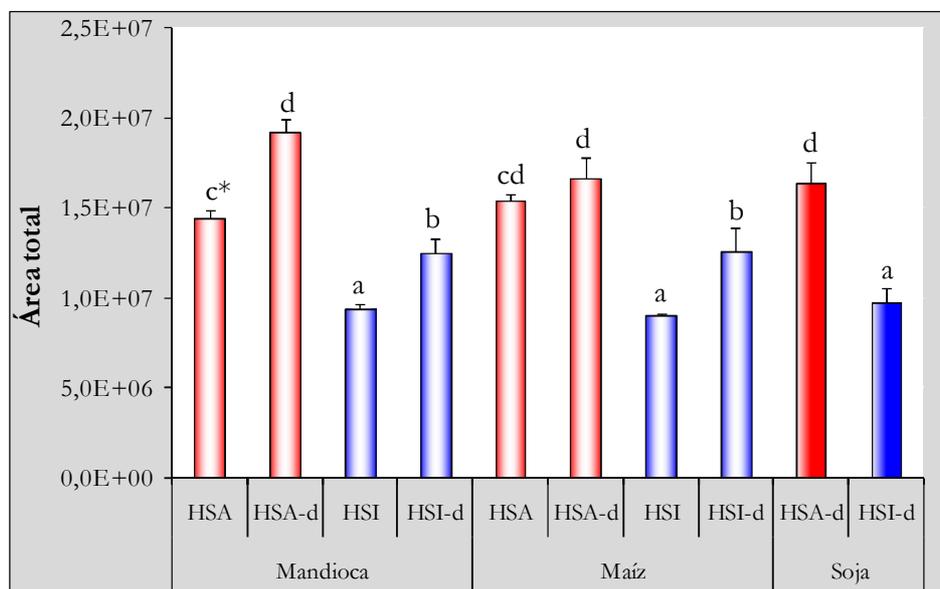


Figura 3.5. Áreas totales de los cromatogramas obtenidos para las proteínas extraídas a partir de las mezclas almidón/harina de soja. HSA: harina de soja activa, HSA-d: harina de soja activa deslipidizada, HSI: harina de soja inactiva, HSI-d: harina de soja inactiva deslipidizada.

*Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p < 0,05$).

8. Microscopía láser confocal de barrido (CLSM)

La microscopía confocal de barrido (CLSM), junto con la tinción fluorescente, se emplea como una herramienta de imagen poderosa a la hora de caracterizar los rasgos morfológicos y estructurales de los gránulos de almidón. Puede llevarse a cabo la visualización de la morfología y microestructura del gránulo, incluyendo los poros y canales internos, y el patrón de distribución del almidón nativo y calentado (Fannon y col., 1993; van de Velde y col., 2002; Blennow y col., 2003; Glaring y col., 2006; Kim y Huber, 2008; Chen y col., 2009) y la identificación de proteínas y lípidos asociados al gránulo (Han y Hamaker, 2002; Han y col., 2005; Glaring y col., 2006; Israkarn y Hongsprabhas, 2007; Han y BeMiller, 2008; Lee y BeMiller, 2008), entre muchas otras aplicaciones.

En este trabajo, se utilizó esta técnica con el objetivo de evaluar la distribución de las proteínas de soja en relación al almidón. En la Figura 3.6 se observa que para ambos almidones, la HSI se presentó como grandes agregados, mientras que la distribución de las proteínas de la HSA fue mucho más homogénea. Asimismo, para las mezclas mandioca/HSA se presentó una distribución más uniforme en relación a la mezcla maíz/HSA.

Moore y col. (2006) utilizaron microscopía confocal para evaluar la distribución de proteínas de distintas fuentes en masas libres de gluten elaboradas a partir de almidones de arroz, maíz y papa. Estos autores también observaron que las proteínas de soja se distribuían en forma de grandes agregados entre los almidones utilizados en la formulación.

Se realizó el mismo ensayo luego de calentar las mezclas almidón/harina de soja en baño María por 60 minutos (para alcanzar la completa gelatinización del almidón), y la distribución relativa del almidón y las proteínas fue similar que bajo condiciones nativas, observándose proteína agregada cuando se incorporó HSI, y una distribución más homogénea con la HSA (fotos no mostradas).

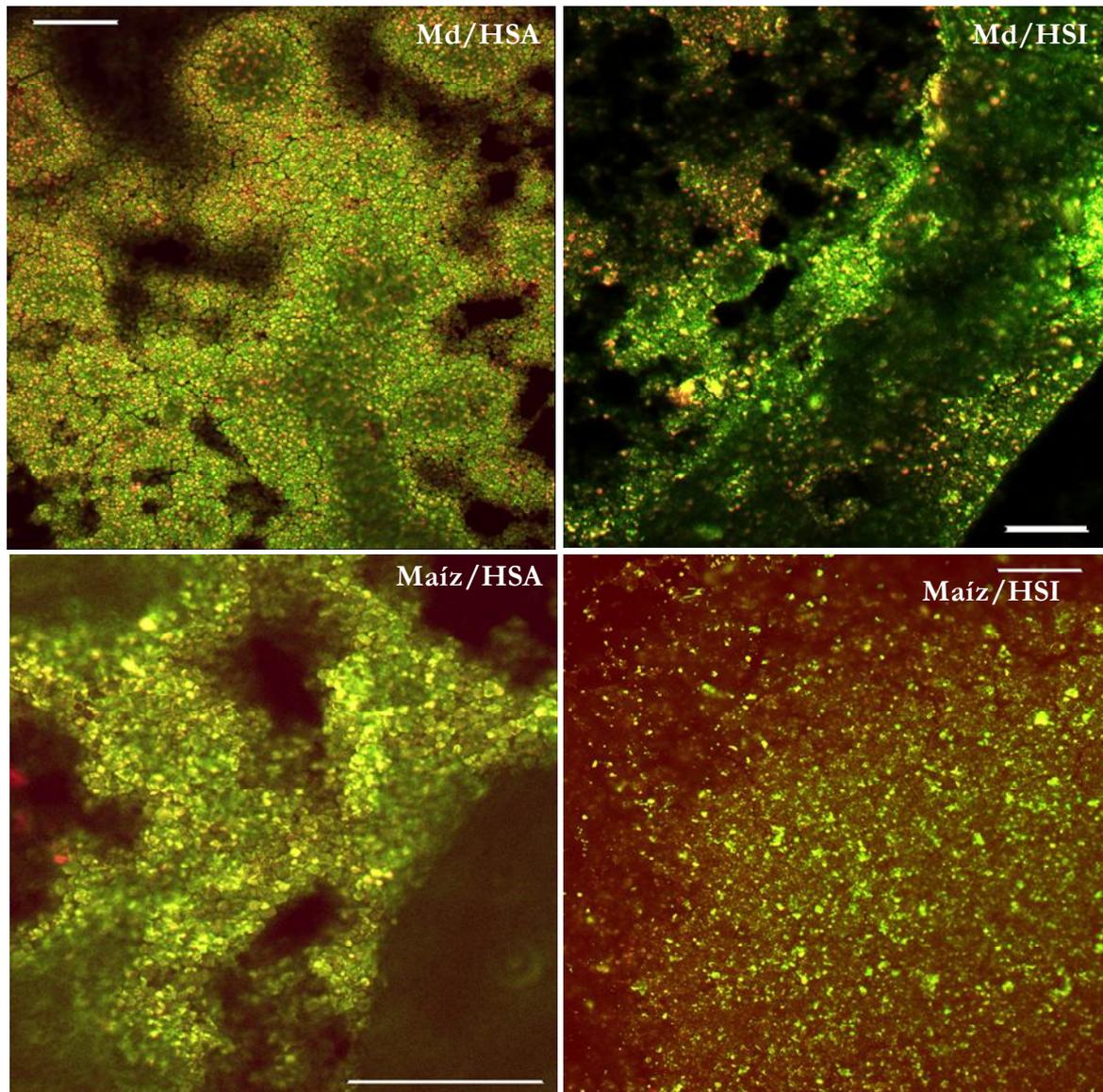


Figura 3.6. Microfotografías de las masas de almidones con harina de soja. Barra: 200 μm . Md: mandioca; HSA: harina de soja activa; HSI: harina de soja inactiva (verde: almidón, rojo/amarillo: proteínas).

Los resultados presentados en este Capítulo, obtenidos mediante variadas metodologías, muestran claramente que existe una interacción diferencial entre el almidón de mandioca y la harina de soja activa. Esta interacción ocurre con las proteínas de la soja, más que con los lípidos, ya que la presencia o ausencia de éstos no derivó en cambios radicales en el comportamiento del sistema.

Esta interacción es posible que ocurra en dos etapas: en condiciones nativas, donde las proteínas de soja interaccionarían con el almidón a través de los componentes asociados a la superficie del gránulo del almidón -más probablemente con las proteínas asociadas al mismo- modificando las propiedades reológicas de la mezcla y la distribución de las proteínas en relación al almidón -demostrado por las imágenes obtenidas por medio de microscopía confocal-; y en condiciones de calentamiento, donde el almidón de mandioca muestra un patrón de desplegamiento durante la gelatinización diferente al del maíz, dejando más expuestas las cadenas de amilosa/amilopectina para que interaccionen con las proteínas de la soja, modificando así las propiedades de *pasting* y retrogradación del almidón. El efecto de la HSA sobre la recristalinización de la amilopectina quedó claramente demostrado mediante la difracción de rayos X y la calorimetría diferencial de barrido.

Capítulo 4

Efecto de la incorporación de diferentes aditivos sobre las propiedades de la masa y la calidad de panes libres de gluten

En el presente Capítulo se estudió el efecto de los aditivos sobre la calidad de los panes y sobre las propiedades de las masas libres de gluten con bajo contenido de agua. Los aditivos evaluados fueron los mismos que en el Capítulo 2.

1. Formulación

En la Tabla 4.1 se muestra la formulación base, seleccionada a partir de un conjunto de 20 ensayos previos, sobre la cual se incorporaron los aditivos ya mencionados en la Tabla 2.2.

En ensayos preliminares de determinación de actividad ureásica, se observó que la harina de soja activa es correctamente inactivada durante el proceso de horneado de los panes.

Tabla 4.1. Formulación base de las masas y panes libres de gluten con bajo contenido de agua.

Ingredientes	% (en base harina)
Harina de arroz	45
Almidón de mandioca	45
Harina de soja activa	10
Agua	65
Margarina	2
Sal	2
Leudante químico	0,1
Levadura prensada	3

2. Composición centesimal de las harinas y/o almidones

La composición centesimal de las harinas utilizadas en la elaboración de panes libres de gluten se presenta en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Composición centesimal de las harinas utilizadas.

	Harina de arroz	Almidón de mandioca	Harina de soja activa
Proteínas (%)	8,11	0,24	36,41
Cenizas (%)	0,23	0,09	4,72
Fibra cruda (%)	0,28	0,21	2,83
Lípidos (%)	0,80	0,01	19,80
Humedad (%)	10,95	12,87	5,98
Carbohidratos (%)	79,63	86,59	30,26

3. Hidrocoloides

Cuando se elaboraron los panes con el agregado de hidrocoloides, estos tuvieron un VE bajo, con una miga muy densa debido, al menos en parte, al aumento considerable de la consistencia de las masas, que las torna difíciles de expandir durante la fermentación. Por esto, los panes con hidrocoloides se elaboraron con un 75% de agua, en base harina.

3.1. Efecto del agregado de hidrocoloides sobre las propiedades de la masa

Se evaluó el efecto de los hidrocoloides sobre la resistencia de la masa mediante un ensayo de penetración, donde la fuerza necesaria para que una sonda de 35 mm de diámetro penetre en las masas luego de la primera (30 min) o segunda fermentación (30 min, 1 min de batido a baja velocidad y otros 30 min de fermentación) fue medida con un texturómetro. A su vez, la disminución de la fuerza necesaria para penetrar las masas entre ambas fermentaciones, calculada como porcentaje de reducción en relación a la fuerza ejercida luego de la primera fermentación, fue tomada como un indicador en la estabilidad de la estructura de las masas frente a las altas deformaciones a las que son sometidas durante el proceso de fermentación. Teniendo en cuenta que las masas con hidrocoloides fueron elaboradas con mayor proporción de agua que el control, no sorprende que este último haya presentado mayor resistencia a la penetración (Tabla 4.3). Entre las masas con hidrocoloides, la masa con X presentó mayor resistencia, seguida por CMC, Al y C ($p < 0,05$). La

goma xántica, entre los hidrocoloides más utilizados en la industria alimenticia, es uno de los que mayor capacidad espesante presenta. Se sabe que, en sistemas acuosos, toma una conformación helicoidal que le da a la molécula una estructura rígida. Se demostró, además, que esta conformación juega un papel importante en el comportamiento de sus soluciones, incluyendo las altas viscosidades (Millane y Wang, 1990).

Las masas con C, si bien presentaron la menor resistencia luego de la primera fermentación, mostraron también la menor reducción de la resistencia luego del proceso completo de fermentación. A partir de la Tabla 4.3, se puede ver que en las masas con hidrocoloides, mayores valores de resistencia están también relacionados con mayores porcentajes de reducción.

Tabla 4.3. Valores de resistencia durante la fermentación, módulos elástico (G') y viscoso (G'') y $\tan \delta$ a 1 Hz, para las masas con hidrocoloides.

	Formulación				
	Control	X	CMC	C	Al
Resistencia (g)					
Primera fermentación	76,3 ^{e*}	66,1 ^d	53,4 ^c	27,4 ^a	41,2 ^b
Segunda fermentación	46,3 ^c	33,6 ^b	34,1 ^b	22,9 ^a	29,1 ^{ab}
% Reducción	39,3	49,1	36,2	16,3	29,3
Reometría					
G' (kPa)	29,75 ^a	30,57 ^a	24,15 ^a	60,82 ^b	21,64 ^a
G'' (kPa)	6,84 ^a	7,47 ^a	6,49 ^a	12,88 ^b	5,35 ^a
$\tan \delta$	0,230 ^b	0,243 ^{bc}	0,266 ^d	0,209 ^a	0,245 ^c

X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

La región de linealidad viscoelástica para las masas libres de gluten con baja proporción de agua, fue establecida hasta una deformación igual a 0,05% realizando un barrido de deformación. A partir de este valor se observó una caída en los módulos elástico y viscoso, que corresponde a la ruptura de la estructura a mayores

deformaciones. Para los ensayos reométricos, con fines comparativos se elaboró la masa control con un 75% de agua (llamada C2), para evaluar si las diferencias observadas en estos ensayos se debían a la presencia de hidrocoloides o a la mayor proporción de agua. En la Figura 4.1 se presentan los valores de G' y G'' en función de la frecuencia para las muestras analizadas. G' fue mayor que G'' en todo el rango de frecuencias analizado, lo que demuestra un comportamiento sólido-elástico de las masas. Con la excepción de las masas con carragenato, el agregado de hidrocoloides no modificó significativamente los valores de G' y G'' a 1 Hz en relación al control (Tabla 4.3). Para la muestra C2 se observó una disminución de los valores de los módulos dinámicos con respecto al control elaborado con 65% de agua, mientras que los valores de $\tan \delta$ no fueron modificados. Lazaridou y col. (2007), trabajando con masas a base de harina de arroz y almidón de maíz con distinta cantidad de agua (130, 140 y 150 g por cada 100 g de sólidos) encontraron una disminución en el módulo elástico a medida que aumentaba la cantidad de agua. Este fenómeno está bien documentado para las masas a base de trigo (Phan-Thien y Safari-Ardi, 1998; Autio y col., 2001), donde se encuentra que una mayor proporción de agua lleva a una disminución de ambos módulos (G' y G''), sin que la $\tan \delta$ se vea afectada. Esto permite concluir que el agua tiene principalmente un efecto plastificante, modificando los parámetros reológicos sin afectar la estructura de la masa.

La masa con C presentó un módulo elástico significativamente mayor que la masa control. La misma tendencia se observó para la componente viscosa (G''), aunque la $\tan \delta$ fue significativamente diferente para todas las muestras: fue mayor para las masas con CMC, seguida por aquellas con Al, por el control y con X ($p > 0,05$) y fue significativamente menor para las masas con C. Autores como Molina Ortiz y col. (2004), trabajando con geles de aislado proteico de soja/carragenato, encontraron una interacción entre las proteínas y el hidrocoloide, y que esta interacción derivó en geles con mayor viscoelasticidad.

Existe una controversia entre distintos autores (Tronsmo y col., 2003; Dobraszcyk y Salmanowicz, 2008; Angioloni y Collar, 2009) sobre la correlación que existe entre los ensayos llevados a cabo a altas deformaciones y a bajas deformaciones. Se sabe que entre los componentes de las masas se establecen interacciones tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Si las interacciones hidrofóbicas que se establecen son, por ejemplo, fuerzas de van der Waals, y las hidrofílicas son, por ejemplo, puentes de hidrógeno, a bajas deformaciones -como las presentes durante los ensayos reométricos- estas interacciones permanecerían intactas, mientras que a las altas deformaciones que son sometidas las masas durante la fermentación, estas interacciones pueden romperse; por lo que la correlación entre ambos tipos de ensayo puede considerarse una función de estas relaciones. Así, en este trabajo, no se encontró una correlación entre ambos ensayos.

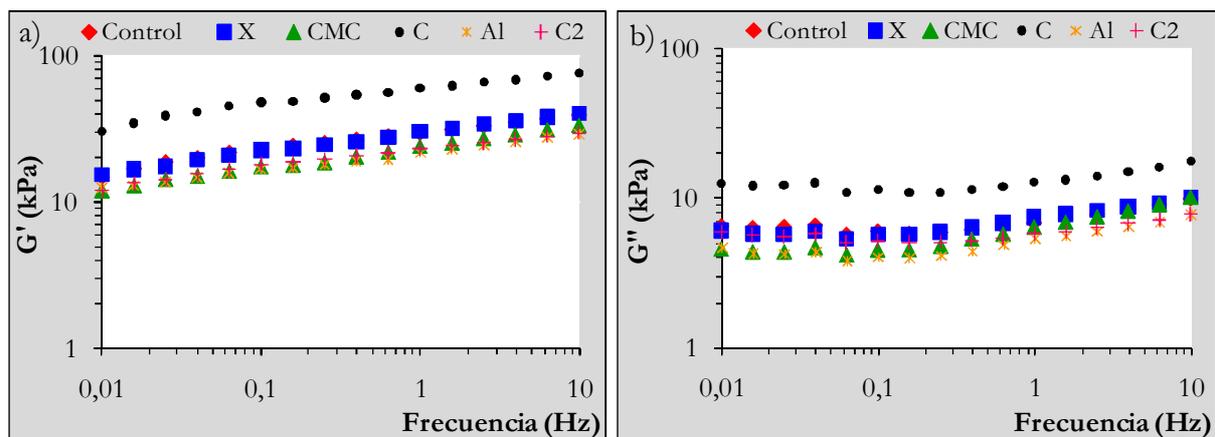


Figura 4.1. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de los batidos control (sin hidrocoloide), con goma xántica (X), carboximetilcelulosa (CMC), carragenato (C) y alginato (Al); C2: masa control con 75% de agua (base harina). a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

Mediante el uso del calorímetro diferencial de barrido, se estudió la influencia de los aditivos sobre la gelatinización y retrogradación del almidón imitando el proceso de cocción de la masa en el horno. Se prepararon las masas de la misma manera que para la elaboración de pan, con la salvedad que se evitó el uso de margarina. Se pesó una pequeña cantidad en cápsulas de aluminio, y se calentó en el

calorímetro a temperaturas similares a las medidas en el centro de la miga durante la etapa de horneado. Luego, se colocaron las cápsulas a 4 °C durante 7 días, y finalmente se volvieron a calentar en el calorímetro a fin de obtener los parámetros de la fusión de los nuevos cristales formados durante el almacenamiento. Los resultados de este ensayo para las masas con hidrocoloides se recogen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Valores de ΔH , T_o y ancho de pico para la gelatinización del almidón y la retrogradación de la amilopectina en masas con incorporación de hidrocoloides.

	Formulación				
	Control	X	CMC	C	Al
Horneado					
ΔH (J/g sólidos)	7,01 ^{a*}	7,16 ^a	7,09 ^a	6,23 ^a	6,55 ^a
T_o (°C)	66,23 ^a	67,07 ^a	66,28 ^a	66,45 ^a	67,14 ^a
Ancho de pico (°C)	22,10 ^c	18,94 ^{ab}	19,35 ^b	19,67 ^b	17,96 ^a
Retrogradación					
ΔH (J/g sólidos)	1,71 ^c	2,09 ^b	2,52 ^a	2,62 ^a	1,92 ^{bc}
T_o (°C)	42,88 ^a	43,17 ^a	43,30 ^a	43,07 ^a	43,05 ^a
Ancho de pico (°C)	16,58 ^b	15,14 ^a	14,30 ^a	14,39 ^a	15,12 ^a

X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato, ΔH : entalpía de transición (expresada en valor absoluto), T_o : temperatura de inicio de la transición.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Los hidrocoloides no afectaron la gelatinización del almidón presente en las masas, ya que no se observaron diferencias ni en el ΔH de gelatinización ni en la temperatura de inicio (T_o) de esta transición; sin embargo, el ancho del pico y, por ende, la temperatura de finalización del pico, disminuyó en las masas con incorporación de hidrocoloide. Si bien se esperaba que la presencia de hidrocoloides modificara los parámetros de gelatinización a causa de su alta afinidad por el agua (Sajjan y Rao, 1987; Alloncle y Doublier, 1991; Yoshimura y col., 1998), compitiendo con el almidón por ella, debe tenerse en cuenta también que estas masas fueron preparadas con mayor cantidad de agua (75% base harina,

mientras que para el control fue de 65%), lo que dificulta la comparación de estos resultados. Ferrero y col. (1996) estudiaron el efecto de la incorporación de distintas cantidades de hidrocoloides (gomas guar, garrofín y xántica, CMC y alginato de sodio) sobre la gelatinización y la retrogradación del almidón de maíz; y encontraron que al trabajar con la relación hidrocoloide:almidón más baja (1:10), en exceso de agua, los parámetros de gelatinización del almidón no se veían modificados; en tanto que al aumentar la concentración de hidrocoloides (a relaciones tan altas como 1:2 y 1:1 hidrocoloide:almidón), observaban un corrimiento del pico hacia mayores temperaturas, así como un aumento en el ancho del mismo, y mayores valores de ΔH .

La entalpía de retrogradación de las masas horneadas en el DSC fue mayor para las masas con hidrocoloide, que es indicativo de una mayor recristalinización de la amilopectina durante el almacenamiento. A su vez, el ancho de pico de la transición fue menor para estas masas respecto al control ($p < 0,05$). Picos de transición que abarcan un menor rango de temperatura están relacionados con la formación de cristales más perfectos (Biliaderis, 1990) y de estabilidad similar. Se ha descrito en la bibliografía que la curva del ΔH de fusión de la amilopectina retrogradada en función de la cantidad de agua presente en el sistema, muestra una forma de campana, con valores de entalpía máximos hacia una concentración de 50% de almidón en agua; mientras que alcanza valores mínimos a concentraciones extremas de 80 y 10% de almidón (Zeleznač y Hoseney, 1986). La miga de pan presenta humedades que oscilan entre 35 y 45% (Rogers y col., 1988; He y Hoseney, 1990; Baik y Chinachoti, 2000; Ribotta y Le Bail, 2007); bajo estas condiciones, mayores cantidades de agua llevan a una mayor retrogradación de la amilopectina. Teniendo en cuenta que los panes con hidrocoloides fueron elaborados con mayor cantidad de agua que el pan control, es plausible que esta mayor cantidad de agua favorezca una mayor recristalinización de la amilopectina, como se observa en la Tabla 4.4. Otros autores atribuyeron la mayor retrogradación del almidón en presencia de

0,5% de hidrocoloides a una incompatibilidad termodinámica entre polisacáridos diferentes, formándose dos fases que promueven la recristalinización de amilosa/amilopectina (Rosell y col., 2007). Sin embargo, parece poco probable que a una proporción tan baja de hidrocoloide (0,5% en relación a casi el 80% de almidón que poseen las harinas), una incompatibilidad termodinámica tenga efectos tan dramáticos sobre el comportamiento de la fase mayoritaria.

A fin de evaluar el efecto de los hidrocoloides sobre la fracción proteica en la masa, se realizó la extracción de proteínas con Tris/HCl y se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 4.2). Se observó una disminución en la intensidad de las bandas de alta masa molecular (200 000 - 60 000, aproximadamente) en las masas con CMC, C y Al, y con esta última se observó la desaparición de una banda de alrededor de 200 000 de masa molecular que sería resultado de una insolubilización por un posible acomplejamiento proteínas-alginato (Figura 4.2, círculo rojo).

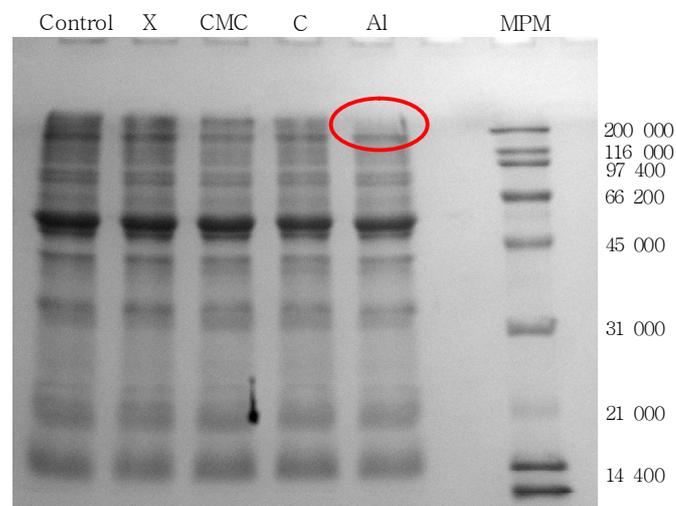


Figura 4.2. Electroforesis bajo condiciones no reductoras de las proteínas extraídas con solución tampón TRIS/HCl a partir de masa sin (control) y con incorporación de hidrocoloides (X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato). MPM: marcador de masa molecular.

Existe evidencia de una interacción química específica entre el alginato y las proteínas de soja (Oates y col., 1987). Aunque la reacción química no ha sido

completamente detallada, se ha sugerido que los residuos de ácido glutámico presentes en las proteínas de soja y el ácido manurónico del alginato serían los grupos involucrados (Oates y col., 1987; Shih, 1994).

A través del análisis de las imágenes obtenidas durante la fermentación de las masas, se comparó el comportamiento de los distintos hidrocoloides durante este proceso. No se observaron diferencias en el número de alvéolos/mm², ni en el tamaño de los mismos o el área relativa ocupada por aire durante la primera fermentación de la masa control y con agregado de hidrocoloides (Tabla 4.5). Como se esperaba, el tamaño de los alvéolos aumentó en el segundo período fermentativo en relación al primero; además, el tamaño de los alvéolos en la segunda fermentación fue significativamente mayor para todas las masas con hidrocoloides cuando se las comparó con el control, y la masa con X fue la que presentó alvéolos de mayor tamaño. Luego de la segunda fermentación se observó que las masas con CMC presentaron mayor área ocupada por alvéolos, y que ésta fue menor para las masas con el agregado de C.

Tabla 4.5. Número, tamaño y fracción de alvéolos en masas con incorporación de hidrocoloides luego de la primera y la segunda fermentación.

		Formulación				
		Control	X	CMC	C	Al
Nº alvéolos/mm ²	F1	4,2 ^{a*}	4,2 ^a	3,9 ^a	3,8 ^a	3,3 ^a
	F2	3,7 ^b	2,5 ^a	3,7 ^b	2,7 ^a	2,8 ^a
Tamaño alvéolos (mm ²)	F1	0,036 ^a	0,029 ^a	0,039 ^a	0,032 ^a	0,038 ^a
	F2	0,074 ^a	0,639 ^c	0,100 ^b	0,100 ^b	0,097 ^b
% Área de alvéolos	F1	13,2 ^a	14,4 ^a	15,1 ^a	12,2 ^a	12,4 ^a
	F2	30,9 ^b	28,4 ^{ab}	36,6 ^c	24,6 ^a	26,7 ^{ab}

X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato, F1: primera fermentación, F2: segunda fermentación.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes (p<0,05).

3.2. Efecto del agregado de hidrocoloides sobre la calidad del pan

En la Tabla 4.6 se muestra los resultados de la evaluación tecnológica de los panes con el agregado de hidrocoloides. El efecto de los hidrocoloides sobre el VE del

pan fue diferente de acuerdo a la fuente utilizada. Así, el mayor VE se obtuvo mediante la incorporación de carragenato, seguido por el de los panes con CMC. La incorporación de X y Al no aumentó el VE respecto al pan control.

El análisis de correlación de Pearson arrojó una correlación negativa ($r = -0,80$; $p < 0,05$) entre la fuerza de penetración de las masas y el VE del pan. Este resultado es opuesto al obtenido en el Capítulo 2, donde se había observado que a mayores valores de resistencia se obtenía mayor VE, y se había atribuido este comportamiento a que estas masas tenían mayor capacidad de retener los gases formados durante la fermentación. Sin embargo, es lógico pensar que masas con una resistencia mayor a cierto umbral sean más difíciles de expandir durante la fermentación y el horneado.

Tabla 4.6. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación hidrocoloides.

	Formulación				
	Control	X	CMC	C	Al
VE (cm³/g)	1,98 ^{a*}	1,86 ^a	2,14 ^b	2,38 ^c	1,99 ^a
Nº alvéolos/mm²	1,30 ^c	1,07 ^b	1,67 ^d	0,89 ^a	1,58 ^d
Tamaño alvéolos (mm²)	4,26 ^c	5,38 ^d	2,73 ^a	8,06 ^e	3,38 ^b
% Área de alvéolos	54,9 ^b	55,8 ^b	49,0 ^a	58,8 ^c	51,4 ^a
Uniformidad	2,07 ^c	1,68 ^{ab}	4,32 ^d	1,42 ^a	2,01 ^{bc}
Dureza inicial (g)	249 ^c	162 ^b	113 ^a	132 ^{ab}	141 ^{ab}
Velocidad de endurecimiento (g/día)	208,8 ^c	172,7 ^b	136,5 ^a	170,9 ^b	160,3 ^{ab}
L*	69,17 ^{ab}	74,37 ^c	71,01 ^b	68,85 ^a	70,95 ^b
a*	9,30 ^b	5,25 ^a	7,93 ^b	8,49 ^b	8,61 ^b
b*	31,95 ^b	21,55 ^a	30,70 ^b	31,77 ^b	32,42 ^b

X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

La dureza inicial de la miga fue reducida mediante la incorporación de hidrocoloides, así como la velocidad de endurecimiento durante el período de

almacenamiento (72 h, 25 °C), tal como lo muestra la pendiente de la recta de regresión determinada por los 3 puntos de medición (2, 24 y 72 h luego de horneados los panes). Este efecto no estaría relacionado con una disminución de la recristalinización de la amilopectina, ya que el ΔH de retrogradación fue mayor para las masas con hidrocoloides en comparación al control, sino, muy probablemente, a una reducción en la pérdida de humedad durante el almacenamiento, retardando el proceso de envejecimiento (Rosell y col., 2007). De acuerdo con esto, Rogers y col. (1988) encontraron una mayor dureza de la miga, así como una mayor velocidad de endurecimiento, en panes con menor contenido de humedad (en el rango de 22 a 37% de humedad), y que este endurecimiento no se debía a una mayor retrogradación de la amilopectina, que fue menor a menores contenidos de agua.

En la literatura todavía no existe un acuerdo sobre el mecanismo de envejecimiento del pan. Por muchos años se aceptó la hipótesis propuesta por Schoch y French (1947), que asociaba el endurecimiento de la miga con la retrogradación (recristalinización) de la amilopectina. Apoyando esta hipótesis, autores como Krog y col. (1989) encontraron una correlación positiva entre la recristalinización y la dureza de la miga; mientras que, por el contrario, Martin y col. (1991) sugirieron que la retrogradación de la amilopectina y el endurecimiento de la miga no estaban asociadas, y postularon que este endurecimiento era ocasionado por uniones y entrecruzamientos débiles (puentes de hidrógeno) entre las proteínas y el almidón presentes en la harina. Esto implicaría que las proteínas son esenciales para el proceso de endurecimiento, y que los panes elaborados únicamente a partir de almidón tendrían una velocidad de endurecimiento muy baja o, incluso, nula. Sin embargo, Kim y D'Appolonia (1977a,b) habían sugerido que las proteínas no tenían un rol directo en el endurecimiento del pan, sino que disminuían la velocidad de endurecimiento al diluir el almidón en el sistema. No obstante, trabajos posteriores han demostrado que la incorporación de distintas cantidades de gluten

en sistemas modelo a base de almidón no afecta el endurecimiento de la miga (León y col., 1997b; Every y col., 1998). Además, Rao y col. (1992) sugirieron que los cristales de almidón forman parte de un dominio discontinuo embebido en otro continuo, amorfo; a partir de esta visión surgen interrogantes como qué tan significativo es el papel de los cristales de almidón en comparación con el dominio continuo. Avalando esta postura, Morgan y col. (1997) encontraron que la velocidad de endurecimiento correlacionaba mejor con el contenido de doble hélices (medido por resonancia magnética nuclear) que con el contenido cristalino de la miga (medido por difracción de rayos X) estudiado por otros autores (Zobel y Senti, 1959; Dragsdorf y Varriano-Morston, 1980). A partir de estos resultados, Every y col. (1998) sugirieron que las interacciones almidón-almidón asociadas al endurecimiento del pan ocurren principalmente entre las cadenas de glucanos formando doble hélices que no necesariamente se asocian en estructuras cristalinas. En cuanto a la estructura de la miga, a partir de la Figura 4.3 y de los resultados del análisis de imagen (Tabla 4.5) se observa que los panes con C presentaron una estructura más abierta, al igual que los panes con X, en relación a las otras muestras. El número de alvéolos por mm^2 fue menor para estos panes y, concordantemente, fueron de mayor tamaño. El área relativa de alvéolos fue mayor para los panes con C; mientras que los panes con CMC y Al mostraron menores valores. Este parámetro no mostró una correlación con el VE de los panes, probablemente debido a que durante el análisis de imagen no se tienen en cuenta los alvéolos menores a $0,01 \text{ mm}^2$, que pueden representar áreas diferentes de acuerdo a la formulación empleada.

Los panes con CMC presentaron mayores valores de uniformidad, que equivale a un mayor número de alvéolos pequeños en relación a los alvéolos de mayor tamaño. Por otro lado, los panes con C y X presentaron menor valor de uniformidad, asociado a una estructura de miga más abierta. Los panes libres de gluten, en general, presentan una miga con una estructura densa, con paredes

alveolares gruesas. Desde este punto de vista, la presencia de alvéolos más grandes, dando como resultado migas más esponjosas, es beneficiosa a la hora de su elección por parte del consumidor.

En la Figura 4.3 se muestran las áreas relativas de alvéolos luego de la primera y la segunda fermentación (F1 y F2, respectivamente) y en la miga de pan. Los resultados expresan el porcentaje del área de alvéolos que se alcanza durante la fermentación en relación al área obtenida en la miga (el 100% se consideró el área de alvéolos correspondiente a la miga de pan).

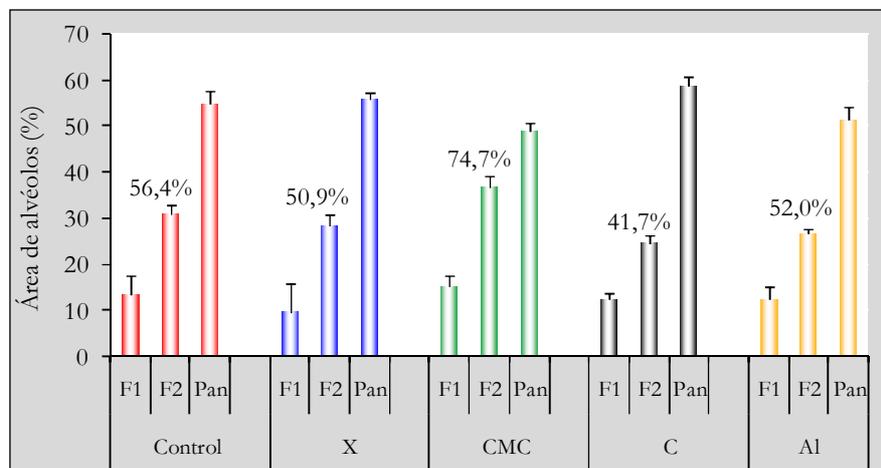


Figura 4.3. Área relativa de alvéolos (%) en masas al finalizar la primera y la segunda fermentación, y en la miga de pan. Se muestra el porcentaje de área que representan los alvéolos en la masa luego de la segunda fermentación en relación a la miga de pan (considerado como 100%). X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato; F1: primera fermentación; F2: segunda fermentación.

Se observa que las masas con X y Al tuvieron un comportamiento similar al control. La masa con CMC, por otra parte, presentó la estructura alveolar más similar a la del pan, mientras que la masa con agregado de C mostró una menor fracción de área representada por aire en la masa fermentada en relación al pan. Los panes con C fueron los que mayor VE mostraron (concordantemente con la mayor fracción de aire en relación a los otros panes), y este mayor VE es probable que se deba, al menos en parte, a una mayor capacidad de expansión de la masa en el horno.

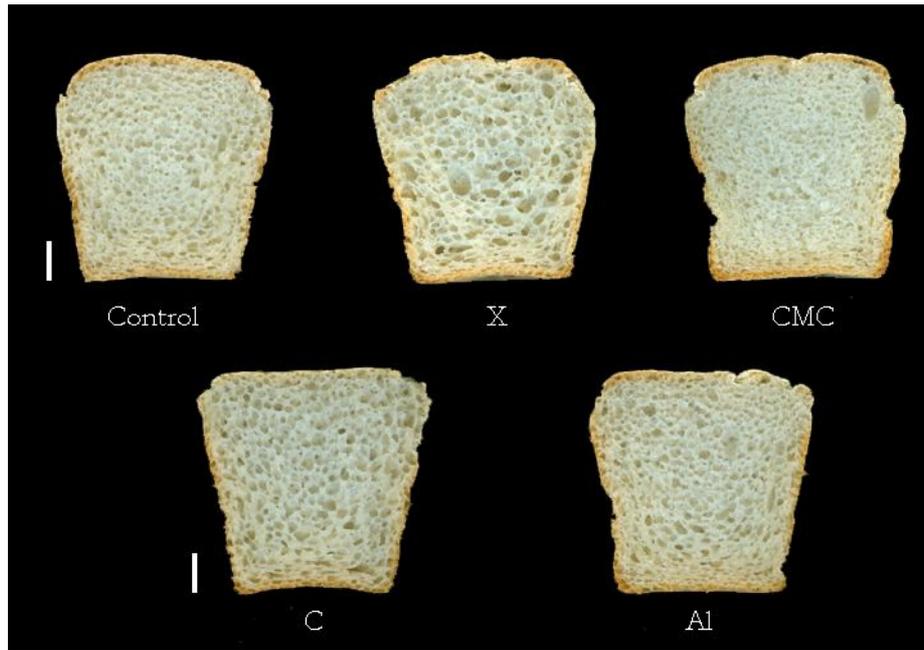


Figura 4.4. Fotografías de los panes control y con hidrocoloides (X: goma xántica, CMC: carboximetilcelulosa, C: carragenato, Al: alginato). Barra: 1 cm.

La corteza de los panes con hidrocoloides, en general, fue más clara que el control, lo que está relacionado con las reacciones de Maillard y de caramelización, ya que los hidrocoloides tienen un alto impacto sobre la distribución de agua. Al igual que en el Capítulo 2, esta tendencia no se cumplió para los panes con incorporación de C, que presentaron un valor de L^* más bajo, correspondiente a una corteza más oscura. Los parámetros a^* y b^* fueron modificados únicamente por la incorporación de CMC (Tabla 4.6).

4. Proteínas

4.1. Efecto del agregado de proteínas sobre las propiedades de la masa

En la Tabla 4.7 se muestran las fuerzas de penetración durante la fermentación de las masas con el agregado de proteínas. La resistencia, así medida, fue más alta para la masa control que para las masas con proteínas ($p < 0,05$); y la caída en este parámetro hacia el final de la fermentación fue mayor para las masas con proteínas, y este comportamiento indica una disminución en la estabilidad de las mismas frente a este proceso.

Tabla 4.7. Valores de resistencia durante la fermentación, módulos elástico (G') y viscoso (G'') y $\tan \delta$ a 1 Hz, para las masas con proteínas.

	Formulación		
	Control	Huevo	Suero
Resistencia (g)			
Primera fermentación	76,3 ^{b*}	58,2 ^a	64,3 ^a
Segunda fermentación	46,3 ^b	26,6 ^a	20,3 ^a
% Reducción	39,2	54,4	68,4
Reometría			
G' (kPa)	29,75 ^a	63,90 ^c	41,65 ^b
G'' (kPa)	6,84 ^a	17,15 ^b	9,22 ^a
$\tan \delta$	0,230 ^a	0,268 ^b	0,222 ^a

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Contrariamente, cuando se llevaron a cabo ensayos de reología dinámica oscilatoria, se observó una mayor consistencia (en términos reométricos, la consistencia viene dada por mayores valores de G^* , directamente relacionada con los valores de G' y G'') para las masas con proteínas, relacionada con un mayor valor de los módulos elástico y viscoso, G' y G'' , respectivamente (Figura 4.5). Parte de este efecto puede estar relacionado al mayor contenido de sólidos presentes en las masas.

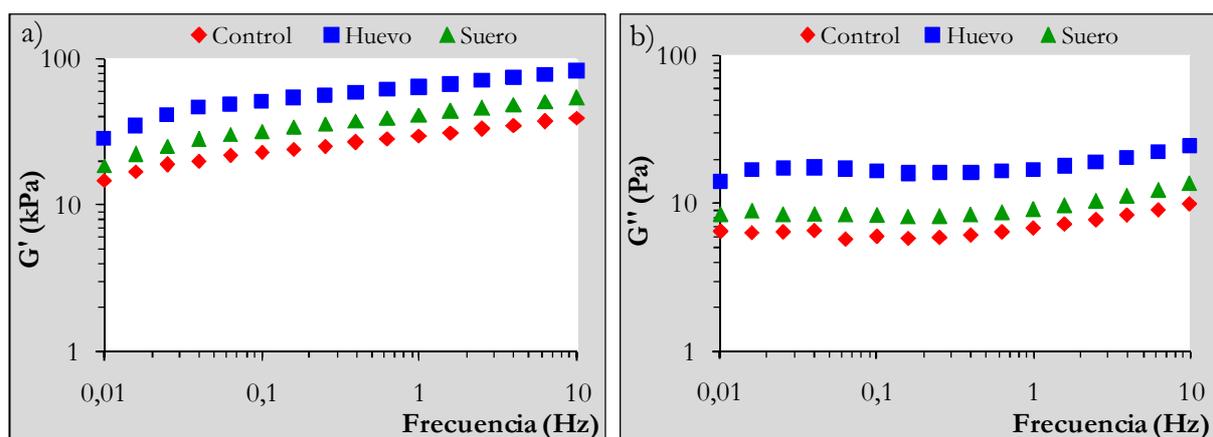


Figura 4.5. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de las masas control, con huevo y suero. a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

La reología dinámica se lleva a cabo a deformaciones muy bajas (generalmente por debajo del 1%), lo que permite medir las propiedades de las muestras sin perturbar o destruir su estructura interna, y esto resulta de suma importancia ya que brinda información del sistema a nivel molecular (Ferry, 1980). Además, habitualmente se asume que las propiedades reológicas están relacionadas con el desempeño de la masa durante el proceso de obtención del pan. Por esto, se han llevado a cabo numerosas investigaciones abocadas a medir las propiedades reológicas de las masas de trigo para caracterizar su comportamiento (Safari-Ardi y Phan-Thien, 1998; Autio y col., 2001). Asimismo, numerosos estudios de este tipo se realizaron en masas libres de gluten (Lazaridou y col., 2007; Demirkesen y col., 2010; Torbica y col., 2010). En 2003, Dobraszcyk revisó la correlación entre las propiedades reológicas de la masa de trigo y su subsiguiente comportamiento durante la elaboración de pan. Sin embargo, no encontró una relación convincente entre ambos procesos (reología y horneado), aunque sí lo hizo con las propiedades reológicas evaluadas a grandes deformaciones (farinógrafo, extensómetro, alveógrafo, entre los más utilizados). Para las masas con incorporación de proteínas, no se observó una correlación entre los ensayos a bajas y altas deformaciones.

En la Tabla 4.8 se presentan los parámetros de gelatinización y retrogradación de las masas con el agregado de proteínas. Aunque el pico de gelatinización del almidón en las masas no sufrió un cambio en las temperaturas con respecto al control, sí se observa una disminución de la entalpía de gelatinización. Como lo demuestran también los menores valores de ΔH recalculados teniendo en cuenta la cantidad de almidón presente en las masas, esta disminución no está relacionada a un efecto de dilución del almidón por parte de las proteínas incorporadas. Tanto las proteínas de suero de leche como las de huevo son altamente hidrofílicas; las primeras, incluso, se considera que poseen propiedades comparables a la de los hidrocoloides (Hudson y col., 2000). Como ya se discutió en el Capítulo 3, no

existe un acuerdo sobre el efecto de la cantidad de agua sobre la entalpía de gelatinización. Mientras que hay trabajos que demuestran que a menor cantidad de agua se asocia una menor entalpía (Donovan, 1979; Eliasson, 1983), otros autores sugieren lo contrario (García y col., 1996). Los resultados encontrados en este trabajo apoyan la primera postura. El ancho de pico fue mayor para las masas con suero, que puede ser el resultado de la superposición con la endoterma de desnaturalización de las proteínas presentes en el concentrado de suero, que se encuentran mayormente en estado nativo (según especificaciones del comerciante). Por otro lado, las proteínas del huevo pasteurizado es probable que se encuentren mayormente desnaturalizadas, sin realizar un aporte significativo al comportamiento térmico de las masas.

Tabla 4.8. Valores de ΔH , T_o y ancho de pico para la gelatinización del almidón y la retrogradación de la amilopectina en masas con incorporación de proteínas.

	Formulación		
	Control	Huevo	Suero
<i>Horneado</i>			
ΔH (J/g sólidos)	7,01 ^{a*}	5,70 ^b	5,89 ^b
ΔH (J/g almidón)	9,61 ^a	8,07 ^b	7,81 ^b
T_o (°C)	66,23 ^a	66,20 ^a	66,48 ^a
Ancho de pico (°C)	22,10 ^a	22,27 ^a	25,19 ^b
<i>Retrogradación</i>			
ΔH (J/g sólidos)	1,71 ^b	2,00 ^b	2,60 ^a
T_o (°C)	42,88 ^a	42,95 ^a	45,03 ^b
Ancho de pico (°C)	16,58 ^b	16,13 ^b	14,73 ^a

ΔH : entalpía de transición (expresada en valor absoluto), T_o : temperatura de inicio de la transición.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto a la retrogradación, esta fue sólo afectada por la incorporación de las proteínas de suero, donde se observa un aumento en la recristalinización de la amilopectina, así como un aumento en la T_o , y una disminución del ancho de pico, que indicarían la formación de cristales mejor estructurados y más estables. En el Capítulo 3 quedó demostrado el efecto beneficioso de la harina de soja sobre la

recristalinización del almidón de mandioca, disminuyéndola significativamente. Los cambios introducidos en el sistema mediante la incorporación de distintos aditivos, como en el caso de las proteínas, pueden tener un efecto negativo sobre esta interacción. La presencia de 5% de proteínas puede introducir un impedimento de tipo estérico que dificulte la interacción entre las proteínas de la harina de soja y el almidón de mandioca.

En la Tabla 4.9 se presentan los resultados del análisis de las imágenes obtenidas durante la fermentación de las masas control y con proteínas. No se encontraron diferencias entre las distintas masas luego del primer proceso de fermentación en cuanto al tamaño de los alvéolos. Sin embargo, el área alveolar fue mayor para la masa control que para las masas con la incorporación de proteínas. Para el segundo proceso de fermentación, se observó un mayor número de alvéolos/mm² para las masas con huevo, y un menor número para las masas con suero, respecto al control; y no se observaron diferencias entre las distintas muestras para el tamaño de alvéolos o la fracción relativa de alvéolos.

Tabla 4.9. Número, tamaño y fracción de alvéolos en masas con incorporación de proteínas luego de la primera y la segunda fermentación.

		Formulación		
		Control	Huevo	Suero
N° alvéolos/mm ²	F1	4,2 ^{a*}	4,0 ^a	3,7 ^a
	F2	3,7 ^b	4,1 ^c	3,1 ^a
Tamaño alvéolos (mm ²)	F1	0,025 ^a	0,021 ^a	0,025 ^a
	F2	0,074 ^a	0,073 ^a	0,092 ^a
% Área de alvéolos	F1	13,2 ^b	8,4 ^a	9,0 ^a
	F2	30,9 ^a	28,3 ^a	28,9 ^a

F1: primera fermentación, F2: segunda fermentación.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.2. Efecto del agregado de proteínas sobre la calidad del pan

Los panes con huevo presentaron un ligero -aunque estadísticamente significativo- aumento en el volumen específico respecto al pan control ($p < 0,05$) (Tabla 4.10).

Mezaize y col. (2009) evaluaron el efecto de la sustitución de harina con 5% de huevo en polvo o proteínas de suero a una formulación libre de gluten a base de harinas de arroz y maíz, y almidones de maíz y papa, con aproximadamente 80% de agua conteniendo 1,9% de goma guar, y no encontraron un incremento significativo del VE respecto al control (sin incorporación de proteínas). Gallagher y col. (2003a) tampoco encontraron un aumento en el VE mediante la incorporación de proteínas de leche.

La incorporación de huevo también afectó la dureza de la miga, aumentándola respecto al pan control. Estos resultados concuerdan con Mezaize y col. (2009) quienes atribuyeron este resultado a la alta absorción de agua de estas proteínas que lleva a la formación de migas más densas. La velocidad de endurecimiento de la miga durante el almacenamiento (hasta 72 h) a 25 °C fue también mayor para los panes con huevo. Vale la pena remarcar que no se observó correlación entre la entalpía de retrogradación de la amilopectina y la dureza final ni la velocidad de endurecimiento de la miga.

Tabla 4.10. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación de huevo y proteínas de suero.

	Formulación		
	Control	Huevo	Suero
VE (cm³/g)	1,98 ^{a*}	2,09 ^b	2,03 ^{ab}
Nº alvéolos/mm²	1,30 ^a	1,17 ^a	1,17 ^a
Tamaño alvéolos (mm²)	4,26 ^a	4,16 ^a	4,41 ^a
% Área de alvéolos	54,9 ^b	48,4 ^a	52,1 ^{ab}
Uniformidad	2,07 ^b	1,62 ^a	2,85 ^c
Dureza inicial (g)	249 ^a	559 ^b	261 ^a
Velocidad de endurecimiento (g/día)	208,8 ^a	512 ^b	248 ^a
L*	69,17 ^b	65,26 ^a	68,75 ^b
a*	9,30 ^{ab}	11,34 ^b	8,49 ^a
b*	31,95 ^a	34,23 ^a	31,36 ^a

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Imágenes representativas de cada pan se presentan en la Figura 4.6. Se observa que los panes con huevo presentaron paredes alveolares más gruesas, y una estructura más irregular. El análisis de imagen, por otro lado, no arrojó diferencias ni en el número de alvéolos/mm² ni en el tamaño de los mismos entre los panes obtenidos con distinta formulación. Además, la relación de alvéolos pequeños/grandes (uniformidad) fue mayor para los panes con suero, y menor para los panes con huevo, respecto al control.



Figura 4.6. Fotografías de los panes control y con proteínas. Barra: 1 cm.

En la Figura 4.7 se muestran las áreas relativas de alvéolos para las masas con proteínas luego de la fermentación, y en la miga de pan. Se observa que las proteínas no ejercieron un efecto notable en el comportamiento de la masa durante la fermentación en relación al control.

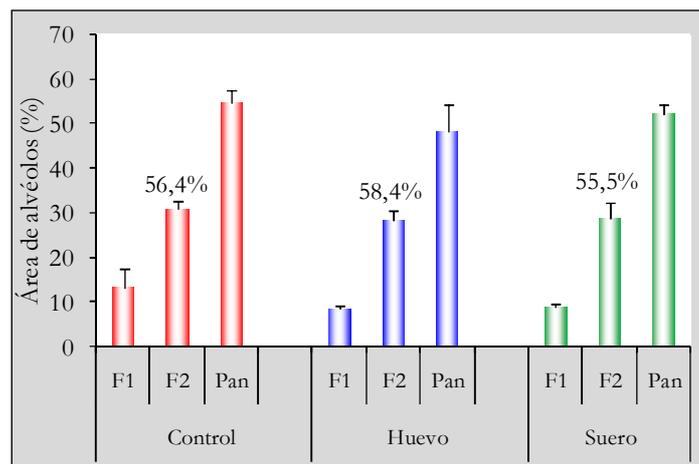


Figura 4.7. Área relativa de alvéolos (%) en masas con el agregado de proteínas al finalizar la primera y la segunda fermentación, y en la miga de pan. Se muestra el porcentaje de área que representan los alvéolos en la masa luego de la segunda fermentación en relación a la miga de pan (considerado como 100%); F1: primera fermentación; F2: segunda fermentación.

El color de la corteza fue modificado por la incorporación del huevo, de acuerdo a lo que se esperaba, fundamentalmente por su color característico: el valor de L^* fue menor, mientras que a^* aumentó (Tabla 4.10).

5. Emulsionantes

5.1. Efecto del agregado de emulsionantes sobre las propiedades de la masa

La incorporación de emulsionantes afectó el comportamiento de la masa durante la fermentación, aunque el efecto fue diferente de acuerdo al emulsionante utilizado (Tabla 4.11). Cuando se incorporó SSL, la resistencia de las masas luego de la primera fermentación fue mayor en relación al control, mientras que lo contrario se obtuvo para las masas con DATEM. El porcentaje de reducción de la resistencia luego del proceso completo de fermentación, sin embargo, no fue modificado con la incorporación de los emulsionantes.

En masas de trigo, se ha informado que el DATEM facilita la interacción entre los lípidos, las proteínas y el almidón (Jacobsberg y col., 1976). Tu y Tsen (1978) postularon que los emulsionantes aniónicos se unen a las gluteninas del trigo durante el amasado, formando complejos glutenina-emulsionante. Mediante el uso de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) se ha identificado el enlace entre el grupo carbonilo del DATEM y los residuos glutamina de las gluteninas (Hähnel y col., 1994). Estas interacciones serían las responsables del efecto reforzador del DATEM sobre la estructura de las masas de trigo. Sin embargo, si bien la mayor fracción proteica del arroz está constituida por glutelinas, éstas son extremadamente insolubles en agua en estado nativo, debido a su alta hidrofobicidad y a los puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro que se establecen en su estructura, formando complejos rígidos de alto peso molecular (Graham y Philips, 1979; Juliano, 1985; Hamada, 1996), por lo que se considera que la interacción entre éstos y los emulsionantes aniónicos es poco probable. Las proteínas de soja, por otro lado, están constituidas casi en su totalidad por

albúminas y globulinas, hidrofílicas (Tang y col., 2006) y con residuos hidrofóbicos en el interior de la estructura proteica, que potencialmente podrían interaccionar con los emulsionantes aniónicos (Malhotra y Coupland, 2004). Otra teoría para explicar el reforzamiento de las masas se basa en las propiedades físicas de los lípidos polares (galactolípidos o fosfolípidos presentes en la harina de cereales, y surfactantes como el DATEM o el SSL) y su capacidad para formar fases líquido-cristalinas en agua. Los lípidos polares de la harina son esenciales para la calidad de los productos horneados y su función en la masa puede ser vista como la de estabilizar las espumas. De acuerdo a este concepto, estas moléculas polares están asociadas con proteínas en estructuras líquido-cristalinas en la fase acuosa que rodea las burbujas de gas y los gránulos de almidón en la masa, y consecuentemente, contribuyen a la elasticidad, permitiendo que las celdas de gas se expandan. Los surfactantes, probablemente, actúen de la misma forma que los lípidos naturales de la harina y mejoren el desempeño de la masa en el proceso de panificación (Tamstorf y col., 1986). Este mecanismo parece más probable para explicar el efecto de los emulsionantes en estas masas, contribuyendo así a la estabilidad y consistencia de las mismas.

Tabla 4.11. Valores de resistencia durante la fermentación, módulos elástico (G') y viscoso (G'') y $\tan \delta$ a 1 Hz, para las masas control y con emulsionantes.

	Formulación		
	Control	DATEM	SSL
Resistencia (g)			
Primera fermentación	76,3 ^{b*}	47,0 ^a	88,8 ^c
Segunda fermentación	46,3 ^b	28,7 ^a	53,8 ^b
% Reducción	39,3	38,9	39,4
Reometría			
G' (kPa)	29,75 ^a	84,55 ^b	165,50 ^c
G'' (kPa)	6,84 ^a	15,85 ^b	41,10 ^c
$\tan \delta$	0,230 ^b	0,188 ^a	0,246 ^b

DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio.

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En la Figura 4.8 se presentan las curvas de barrido de frecuencia para las masas control y con emulsionantes. Las masas con emulsionantes presentaron mayores valores para los módulos elástico y viscoso, respecto al control. La masa con SSL presentó mayores G' y G'' que aquellas con DATEM, aunque el valor de $\tan \delta$ de esta última fue menor ($p < 0,05$) (Tabla 4.11). Los mayores valores de los módulos dinámicos claramente indican que los emulsionantes están incorporando distintas interacciones al sistema, y su efecto dependerá también del tipo de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas que se formen entre los distintos componentes de la masa. Como se mencionó anteriormente, si estas interacciones son débiles, como las fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno, estas tendrán un papel más importante sobre los ensayos llevados a cabo a bajas deformaciones (reométricos) que a altas deformaciones (ensayo de penetración). A partir de los resultados reométricos se observa, como se esperaba, un efecto reforzador de la masa mediante la incorporación de ambos emulsionantes; sin embargo, este efecto no se evidenció mediante la evaluación de la resistencia de las masas durante la fermentación.

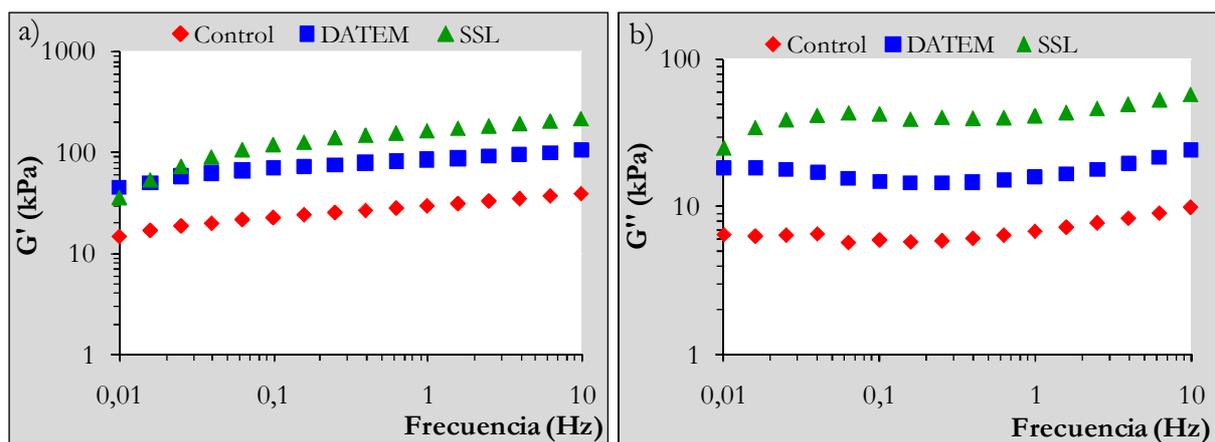


Figura 4.8. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de las masas control, con éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM) y estearoil 2-lactilato de sodio (SSL). a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

No se observaron diferencias en las electroforesis de las extracciones proteicas a partir de las masas control y con DATEM o SSL (datos no mostrados), lo que indica que, independientemente de las interacciones que se establezcan entre los componentes de estas masas, la solubilidad de las proteínas no se vio modificada.

La entalpía de gelatinización del almidón se vio reducida por la incorporación de los dos emulsionantes, pero más notoriamente por el DATEM que, además, produjo un corrimiento del pico hacia la derecha (Tabla 4.12). Eliasson (1986) informó que la incorporación de emulsionantes como el SSL demoraba la gelatinización, y también encontró una disminución en los valores de entalpía, atribuyendo este comportamiento a la ocurrencia de reacciones exotérmicas, como la formación de complejos amilosa-emulsionante. La capacidad de los emulsionantes de formar complejos con los lípidos y la amilosa ha sido ya demostrada, y estos complejos afectan las características físicas del almidón (Larsson, 1980; Ghiasi y col., 1982a,b). Ghiasi y col. (1982a,b) observaron una disminución en la capacidad de hinchamiento del almidón de trigo en presencia de SSL que explica en parte las mayores temperaturas de gelatinización.

Numerosos trabajos (Brates y White, 1986; Krog y col., 1989; Eliasson y Ljunger, 1988; Biliaderis y Tonogai, 1991; Gudmundsson, 1992) informan la disminución de la recristalinización del almidón por parte de los emulsionantes, especialmente del DATEM y el SSL. Sin embargo, en este trabajo se encontró un aumento en la retrogradación de la amilopectina en presencia de DATEM, mientras que el pico fue más angosto, probablemente relacionado a la formación de cristales de estabilidad similar.

Tabla 4.12. Valores de ΔH , T_o y ancho de pico para la gelatinización del almidón y la retrogradación de la amilopectina en masas con incorporación de emulsionantes.

	Formulación		
	Control	DATEM	SSL
Horneado			
ΔH (J/g sólidos)	7,01 ^{c*}	4,98 ^a	5,86 ^b
T_o (°C)	66,23 ^a	67,82 ^b	66,46 ^a
Ancho de pico (°C)	22,10 ^a	22,59 ^a	21,79 ^a
Retrogradación			
ΔH (J/g sólidos)	1,71 ^b	2,89 ^a	2,09 ^b
T_o (°C)	42,88 ^a	44,19 ^a	43,25 ^a
Ancho de pico (°C)	16,58 ^b	12,21 ^a	15,59 ^b

DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio, ΔH : entalpía de transición (expresada en valor absoluto), T_o : temperatura de inicio de la transición.

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Mediante el análisis de las imágenes obtenidas durante la fermentación de las masas se encontraron diferencias durante la primera fermentación únicamente para el área relativa de alvéolos, que fue mayor para la masa control que para aquellas con incorporación de emulsionantes, y la masa con SSL fue la que menor área presentó. Por otro lado, durante la segunda fermentación tampoco se observaron diferencias entre las muestras (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Número, tamaño y fracción de alvéolos en masas con incorporación de emulsionantes luego de la primera y la segunda fermentación.

		Formulación		
		Control	DATEM	SSL
N° alvéolos/mm ²	F1	4,2 ^{a*}	5,3 ^a	4,8 ^a
	F2	3,7 ^a	4,0 ^a	5,9 ^b
Tamaño alvéolos (mm ²)	F1	0,026 ^a	0,017 ^a	0,015 ^a
	F2	0,074 ^a	0,061 ^a	0,049 ^a
% Área de alvéolos	F1	13,1 ^c	8,1 ^b	6,9 ^a
	F2	30,9 ^a	24,8 ^a	26,2 ^a

DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio.

F1: primera fermentación, F2: segunda fermentación.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2. Efecto del agregado de emulsionantes sobre la calidad del pan

Contrariamente a lo que se esperaba, la incorporación de emulsionantes no resultó en un aumento del volumen específico de los panes, y la incorporación de SSL incluso lo disminuyó con respecto al control (Tabla 4.14). Si se analiza la Figura 4.9 se observa que los panes con SSL presentaron una celda de gas de gran tamaño cerca de la superficie del pan, y esta se halló de manera sistemática en todos estos panes. Este efecto es característico de sistemas en los que se produce una significativa evaporación de agua. El vapor formado ejerce una gran presión sobre la miga en formación, que resulta en una caída de su estructura.

La dureza de la miga de los panes con emulsionantes fue mayor respecto al control ($p < 0,05$). La misma tendencia se observó para la velocidad de endurecimiento de la miga durante el almacenamiento. Como ya se mencionó, se ha informado que la incorporación de emulsionantes aniónicos tiene un efecto positivo sobre la textura de la miga, disminuyendo su dureza y demorando su endurecimiento durante el almacenamiento. Sin embargo, estos efectos no fueron evidentes en los resultados aquí expuestos. Los panes con SSL mostraron una dureza inicial significativamente más alta que la de los panes control y con DATEM, ya que la sonda del texturómetro apoyó sobre una superficie mucho más compactada, debido a la presencia de esta gran celda de aire. La velocidad de endurecimiento fue mayor para los panes con emulsionante en relación al control, pero no hubo diferencias entre los panes con DATEM y con SSL.

El análisis de imagen de las migas demostró que los panes con DATEM presentaron menor número de alvéolos, de mayor tamaño. Los panes con SSL, por su parte, presentaron una menor área relativa de alvéolos -la celda de gas presente cerca de la superficie fue excluida para este cálculo-.

Tabla 4.14. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación de DATEM y SSL.

	Formulación		
	Control	DATEM	SSL
VE (cm ³ /g)	1,98 ^{b*}	1,99 ^b	1,71 ^a
Nº alvéolos/mm ²	1,30 ^b	1,12 ^a	1,04 ^a
Tamaño alvéolos (mm ²)	4,26 ^a	4,96 ^a	4,48 ^a
% Área de alvéolos	54,9 ^b	54,9 ^b	45,9 ^a
Uniformidad	2,07 ^b	1,31 ^a	2,18 ^b
Dureza inicial (g)	249 ^a	280 ^a	833 ^b
Velocidad de endurecimiento (g/día)	208,8 ^a	361,4 ^b	380,0 ^b
L*	69,17 ^b	70,85 ^a	72,63 ^a
a*	9,30 ^a	8,91 ^a	6,70 ^a
b*	31,95 ^a	32,09 ^a	29,39 ^a

DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio.

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto al color de la corteza, sólo la luminosidad se vio modificada por la incorporación de los emulsionantes, resultando más clara (mayores valores de L*).

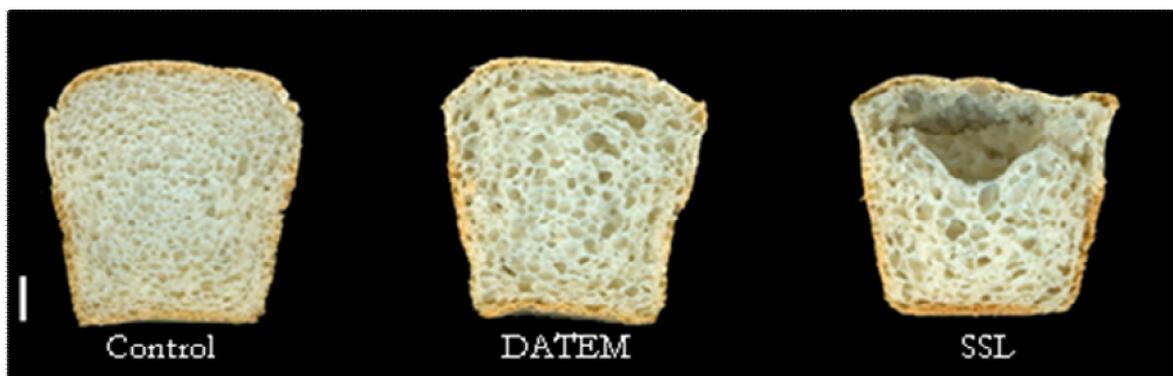


Figura 4.9. Fotografías de los panes control y con emulsionantes (DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio). Barra: 1 cm.

En la Figura 4.10 se muestran las áreas relativas de alvéolos para las masas con emulsionantes, luego de las dos fermentaciones, y en la miga de pan. Se observa que los emulsionantes no provocaron un cambio significativo en el

comportamiento de la masa durante la fermentación en relación al control. Evidentemente, la diferencia observada en la calidad de los panes radica en un comportamiento distinto de las masas durante el horneado, y no durante la fermentación (Tabla 4.13 y Figura 4.10).

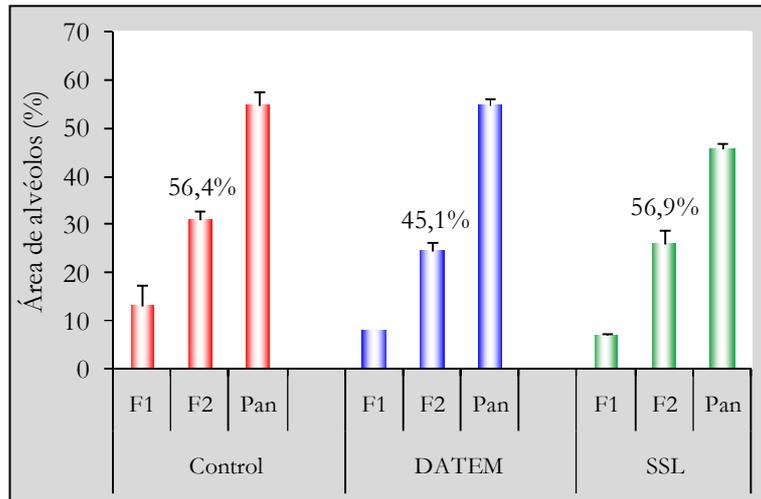


Figura 4.10. Área relativa de alvéolos (%) en masas con el agregado de emulsionantes al finalizar la primera y la segunda fermentación, y en la miga de pan. Se muestra el porcentaje de área que representan los alvéolos en la masa luego de la segunda fermentación en relación a la miga de pan (considerado como 100%). (DATEM: éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico, SSL: estearoil 2-lactilato de sodio); F1: primera fermentación; F2: segunda fermentación.

6. Enzimas

En este Capítulo, se evaluaron dos dosis diferentes de cada enzima: 0,003 g y 0,03 g de glucosa oxidasa cada 100 g de harina (GOX 1 y GOX 2, respectivamente); y 0,0006 g y 0,001 g de amilasa cada 100 g de harina (Am 1 y Am 2, respectivamente).

6.1. Efecto del agregado de enzimas sobre las propiedades de la masa

En esta parte del trabajo se evaluó el efecto de una enzima polimerizante (glucosa oxidasa) y otra amilolítica (α -amilasa) a fin de, en el primer caso, estudiar la posible formación de una red proteica que entregue una estructura con mejores propiedades viscoelásticas a los panes carentes de la red de gluten; y en el segundo

caso, paliar el efecto de la recristalinización de la amilopectina, ya que los panes libres de gluten son ricos en almidón.

La incorporación de enzimas redujo de forma significativa la resistencia de las masas luego de la primera fermentación con respecto al control (Tabla 4.15). Puede observarse que la enzima glucosa oxidasa, aunque disminuyó la resistencia inicial de las masas fermentadas, disminuyó aproximadamente a la mitad el porcentaje de reducción de la misma en relación al control. Por otro lado, la información obtenida a partir de la reología dinámica no apoyó completamente estas observaciones, ya que ambas dosis de GOX produjeron un aumento significativo de la consistencia de las masas (dada por mayores valores de G' y G'') (Figura 4.11), y una disminución significativa de la $\tan \delta$ (Tabla 4.15). La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a glucono-lactona y peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno oxida los grupos sulfhidrilo, induciendo el entrecruzamiento de distintas fuentes proteicas por medio de la formación de puentes disulfuro. Otra reacción en la que participa el H_2O_2 es en la gelación oxidativa de los pentosanos solubles en agua -principalmente arabinosilanos-. Para este proceso, Hosney y Faubion (1981) propusieron la unión del radical sulfenil de una proteína al ácido ferúlico (presente en la harina de cereales) esterificado a un arabinosilano. Este “injerto” unido covalentemente entre un polipéptido y un polisacárido crearía una entidad entrecruzada de alto peso molecular, que sería responsable de un aumento de la consistencia de las masas. El aumento de los módulos G' y G'' podría deberse, entonces, tanto a la gelación oxidativa de pentosanos como a la formación de puentes disulfuro entre péptidos o proteínas formando una estructura más entrecruzada que aumente la viscoelasticidad de la masa.

La enzima α -amilasa cataliza la hidrólisis de los enlaces α -(1-4) del almidón para producir α -dextrinas de bajo peso molecular. La incorporación de α -amilasa produjo una disminución en la fuerza de penetración de las masas durante la fermentación respecto al control (Tabla 4.15). Estos resultados coinciden con los

obtenidos a partir de la reología dinámica, ya que los valores de G' y G'' fueron significativamente menores comparados al control, especialmente para la mayor dosis de la enzima α -amilasa.

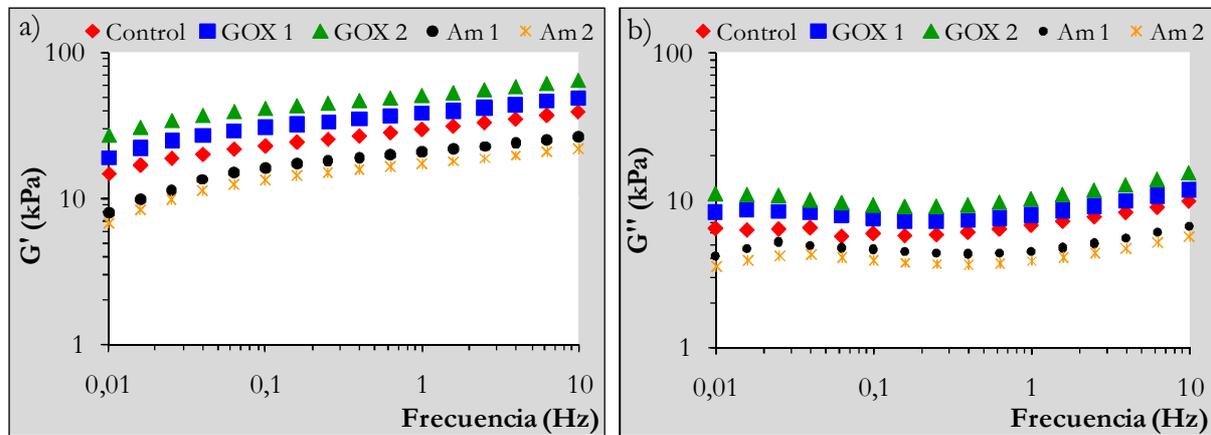


Figura 4.11. Variación de los módulos dinámicos en función de la frecuencia de las masas control (sin enzimas) y con glucosa oxidasa (GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%) y α -amilasa (Am 1: α -amilasa 0,0006%; Am 2: α -amilasa 0,001%). a) módulo elástico (G'), b) módulo viscoso (G'').

El almidón dañado es la fracción de almidón más susceptible a ser atacada por la α -amilasa durante la fermentación, aunque tanto el almidón dañado como el nativo pueden tornarse sustrato de la enzima durante la gelatinización (Ferrand, 1964). El almidón dañado corresponde a la fracción de gránulos de almidón que se rompe durante la molienda para la obtención de harinas, y tiene la capacidad de retener alta cantidad de agua, aumentando la consistencia de las suspensiones a temperatura ambiente. Chen y col. (2003) evaluaron el efecto de cantidades crecientes de almidón dañado en las propiedades de la harina de arroz, y demostraron que una mayor proporción de daño aumentaba la capacidad de absorción de agua, y que la susceptibilidad al ataque de amilasas era más elevada. Hatcher y col. (2002) encontraron un aumento en el módulo elástico y la $\tan \delta$ de masas de trigo para la elaboración de *noodles* a medida que aumentaba la cantidad de almidón dañado.

Tabla 4.15. Valores de resistencia durante la fermentación, módulos elástico (G') y viscoso (G'') y $\tan \delta$ a 1 Hz, para las masas con enzimas.

	Formulación				
	Control	GOX 1	GOX 2	Am 1	Am 2
Resistencia (g)					
Primera fermentación	76,3 ^{c*}	41,5 ^a	50,4 ^b	46,7 ^{ab}	42,0 ^a
Segunda fermentación	46,3 ^b	33,9 ^a	39,4 ^a	27,3 ^a	26,7 ^a
% Reducción	39,3	18,4	21,7	41,6	36,4
Reometría					
G' (kPa)	29,75 ^{bc}	38,20 ^c	51,10 ^d	20,80 ^{ab}	17,40 ^a
G'' (kPa)	6,84 ^b	7,97 ^b	10,25 ^c	4,50 ^a	3,86 ^a
$\tan \delta$	0,230 ^d	0,209 ^{ab}	0,201 ^a	0,217 ^{bc}	0,223 ^{cd}

GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%; Am 1: α -amilasa 0,0006%; Am 2: α -amilasa 0,001%.

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto a la modificación de las proteínas causada por la incorporación de glucosa oxidasa, en la Figura 4.12 se presenta la electroforesis llevada a cabo bajo condiciones no reductoras a partir de la fracción proteica solubilizada con solución tampón Tris/HCl y con Tris/HCl+SDS, y se demuestra la formación de complejos proteicos de alta masa molecular (aproximadamente 200 000) (círculos rojos), así como una disminución en la intensidad de las bandas entre los 110 000 y 65 000 de masa molecular, posiblemente por la acción de la glucosa oxidasa. Gujral y Rosell (2004a) también informaron la modificación de las proteínas de arroz mediante la incorporación de GOX, obteniendo polímeros de mayor peso molecular y menor solubilidad, y además observaron una reducción en los grupos sulfhidrilo libres, asociada a la formación de puentes disulfuro. Además, las proteínas de soja también poseen grupos sulfhidrilo (Kinsella, 1979) que pueden ser oxidados por el H_2O_2 producido por la acción de la GOX.

Por otra parte, no se encontró un efecto de la α -amilasa sobre la distribución de las proteínas según su masa molecular (datos no mostrados).

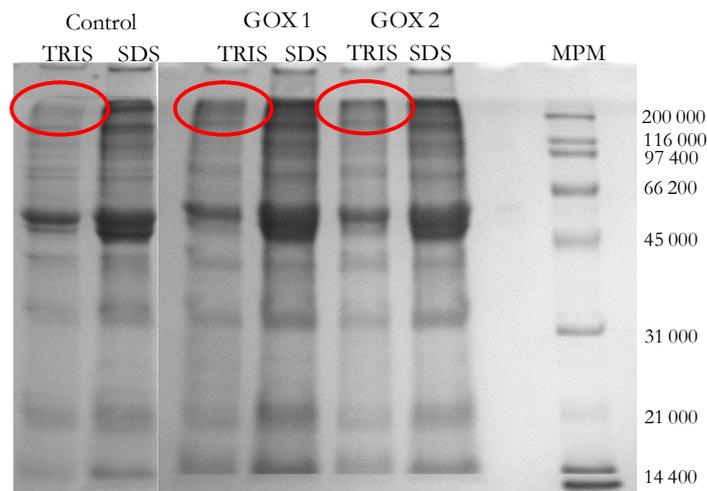


Figura 4.12. Electroforesis bajo condiciones no reductoras de las proteínas extraídas con solución tampón de TRIS/HCl (carril TRIS) y con TRIS/HCl+SDS (carril SDS) a partir de masa sin (control) y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%). MPM: marcador de masa molecular.

En la Tabla 4.16 se presentan los parámetros de gelatinización y retrogradación para el almidón presente en las masas con la incorporación de GOX y Am. La gelatinización del almidón no sufrió modificaciones por la incorporación de enzimas. Únicamente la temperatura de inicio del pico de transición fue más elevada para las masas con α -amilasa, provocando un corrimiento del pico hacia la derecha. Durán y col. (2001) evaluaron el efecto de la incorporación de maltodextrinas de distinto grado de polimerización (3-7 DP) a distintos almidones, y encontraron que éstas aumentaban la temperatura de gelatinización asignando este comportamiento a un efecto estabilizante de los oligosacáridos sobre las regiones amorfas del almidón, aumentando la temperatura de transición, mientras que no evidenciaron un efecto sobre la entalpía de gelatinización.

La incorporación de GOX provocó un aumento en la retrogradación de la amilopectina (mayores valores de ΔH_{rel}). La posible modificación de las proteínas de soja por parte de la GOX puede tener un efecto negativo sobre la interacción entre las proteínas de soja y el almidón de mandioca, como se explicó con anterioridad.

Tabla 4.16. Valores de ΔH , T_o y ancho de pico para la gelatinización del almidón y la retrogradación de la amilopectina en masas con incorporación de enzimas.

	Formulación				
	Control	GOX 1	GOX 2	Am 1	Am 2
Horneado					
ΔH (J/g sólidos)	7,01 ^{a*}	7,27 ^a	6,98 ^a	7,19 ^a	7,49 ^a
T_o (°C)	66,23 ^a	66,43 ^a	66,67 ^{ab}	67,33 ^c	67,23 ^{bc}
Ancho de pico (°C)	22,10 ^a	23,09 ^a	22,54 ^a	21,59 ^a	21,21 ^a
Retrogradación					
ΔH (J/g sólidos)	1,71 ^{bc}	2,13 ^{ab}	2,42 ^a	1,68 ^c	2,11 ^{abc}
T_o (°C)	42,88 ^a	43,79 ^b	44,32 ^b	43,15 ^a	44,03 ^b
Ancho de pico (°C)	16,58 ^b	15,89 ^b	14,99 ^a	16,54 ^b	14,83 ^a

GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%; Am 1: α -amilasa 0,0006%; Am 2: α -amilasa 0,001%, ΔH : entalpía de transición (expresada en valor absoluto), T_o : temperatura de inicio de la transición.

*Letras distintas en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto a la incorporación de amilasa, no se observó efecto alguno sobre la entalpía de recristalinización de la amilopectina. La α -amilasa hidroliza enlaces α -(1-4) principalmente al azar. De esta manera, son cortadas las largas cadenas de amilopectina que conectan distintos cristales (Zobel y Senti, 1959; Senti y Dimler, 1960; Hug-Iten y col., 2003). Sin embargo, esta enzima tiene un escaso efecto sobre las cadenas laterales de la amilopectina que todavía pueden cristalizar (Goesaert y col., 2009). Goesaert y col. (2009) propusieron el uso de una amilasa maltogénica (exoamilasa), que degrada las cadenas de amilopectina liberando casi exclusivamente α -maltosa, para disminuir la retrogradación de la amilopectina.

El ancho de pico de retrogradación fue reducido por la dosis más alta de ambas enzimas, y este cambio está relacionado con el aumento en la T_o de la transición. Este hecho puede estar asociado a la formación de cristales más estables durante el almacenamiento de las muestras a 4 °C. La α -amilasa actúa hidrolizando el almidón dañando, accesible para la acción enzimática. A mayor concentración de la enzima pueden producirse dextrinas de peso molecular más bajo que a la menor dosis. Se

ha informado el efecto retardador de la retrogradación de las dextrinas, que interrumpen la interacción entre las cadenas de amilopectina. Si estas dextrinas son de menor grado de polimerización, se formarán cristales más estables que si son de mayor peso molecular. Un efecto similar puede ocurrir a altas dosis de glucosa oxidasa.

En la Tabla 4.17 se resumen los resultados del análisis de las imágenes obtenidas durante la fermentación de las masas. Las masas con enzimas mostraron alvéolos de mayor tamaño respecto al control durante la primera fermentación, y el área ocupada por alvéolos también fue mayor con la excepción de la masa con Am2. Los mayores valores se encontraron para las dosis más bajas de ambas enzimas. En lo que concierne a la segunda fermentación, no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en el tamaño de alvéolos entre las distintas masas. Nuevamente, las masas con mayor fracción de alvéolos (%) fueron aquellas con la menor dosis de incorporación de enzimas.

Tabla 4.17. Número, tamaño y fracción de alvéolos en masas con incorporación de enzimas luego de la primera y la segunda fermentación.

		Formulación				
		Control	GOX 1	GOX 2	Am 1	Am 2
Nº alvéolos/mm ²	F1	4,2 ^b	3,4 ^a	4,6 ^c	3,6 ^a	3,5 ^a
	F2	3,7 ^c	2,8 ^a	3,4 ^b	3,4 ^b	3,0 ^a
Tamaño alvéolos (mm ²)	F1	0,026 ^a	0,049 ^c	0,034 ^b	0,051 ^c	0,033 ^b
	F2	0,074 ^a	0,111 ^a	0,086 ^a	0,101 ^a	0,090 ^a
% Área de alvéolos	F1	13,2 ^b	16,4 ^c	15,5 ^{bc}	17,7 ^c	9,9 ^a
	F2	30,9 ^a	35,9 ^a	29,6 ^a	33,8 ^a	30,5 ^a

GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%; Am 1: α -amilasa 0,0006%; Am 2: α -amilasa 0,001%; F1: primera fermentación; F2: segunda fermentación.

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

6.2. Efecto del agregado de enzimas sobre la calidad del pan

De la Tabla 4.18 se observa que la menor dosis de α -amilasa aumentó el volumen específico del pan con respecto al control, debido en gran parte a que ésta hidroliza

el almidón que resulta lixiviado en el proceso de la gelatinización durante el horneado, reduciendo la viscosidad del sistema con un efecto beneficioso sobre el VE, y también debido a la mayor cantidad de azúcares simples, fermentables por las levaduras; mientras que con la mayor dosis de esta enzima no se observó diferencia en el VE respecto también al control. Las masas con mayor dosis de α -amilasa presentaron menor valor de resistencia durante la fermentación, así como menores valores de G' y G'' ; esto lleva a una baja resistencia a la pérdida de gases durante el horneado, y este comportamiento produce panes con menor VE.

La incorporación de GOX no produjo panes de mayor VE con respecto al control, a pesar de haberse evidenciado la formación de una estructura proteica más entrecruzada, como lo demuestran los estudios electroforéticos.

Tabla 4.18. Parámetros de calidad de panes libres de gluten con la incorporación de glucosa oxidasa y amilasa.

	Formulación				
	Control	GOX 1	GOX 2	Am 1	Am 2
VE (cm³/g)	1,99 ^{a*}	2,05 ^{ab}	2,01 ^a	2,15 ^b	2,04 ^{ab}
Nº alvéolos/mm²	1,30 ^a	1,60 ^b	1,92 ^b	1,34 ^a	1,27 ^a
Tamaño alvéolos (mm²)	4,26 ^b	3,17 ^a	3,34 ^a	4,05 ^b	4,15 ^b
% Área de alvéolos	54,9 ^c	50,8 ^{ab}	49,0 ^a	53,2 ^{bc}	53,7 ^{bc}
Uniformidad	2,07 ^a	2,54 ^{bc}	2,62 ^c	2,58 ^{bc}	2,32 ^{ab}
Dureza inicial (g)	249 ^b	169 ^a	169 ^a	171 ^{ab}	229 ^{ab}
Velocidad de endurecimiento (g/día)	208,8 ^a	329,9 ^b	304,4 ^{ab}	287,3 ^{ab}	316,2 ^{ab}
L*	69,17 ^{bc}	70,70 ^c	71,48 ^c	67,07 ^{ab}	66,03 ^a
a*	9,30 ^a	8,38 ^a	8,22 ^a	10,61 ^b	11,30 ^b
b*	31,95 ^b	30,46 ^a	30,26 ^a	34,15 ^c	33,85 ^c

GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%; Am 1: α -amilasa 0,0006%; Am 2: α -amilasa 0,001%.

*Letras diferentes en una misma fila corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se observó una disminución de la dureza inicial de la miga mediante la incorporación de GOX (Tabla 4.18). Coincidentemente con este trabajo, Gujral y Rosell (2004a) también encontraron una disminución de la dureza al incorporar GOX. La velocidad de endurecimiento de estos panes durante el almacenamiento fue mayor que la del control. Como ya se explicó, la posible disrupción de la interacción beneficiosa entre las proteínas de la soja y el almidón de mandioca por medio de la acción catalítica de la GOX, podría tener un efecto negativo sobre el comportamiento del pan durante el almacenamiento. Respecto a la incorporación de α -amilasa, ésta provocó una reducción en la dureza inicial de la miga, y la velocidad de endurecimiento fue similar a la del pan control.

En la Figura 4.13 se presentan las áreas relativas de alvéolos para las masas con enzimas luego de la primera y segunda fermentación (F1 y F2, respectivamente) y en la miga de pan. Las masas con la dosis más baja de ambas enzimas (GOX y Am) presentaron, luego de la segunda fermentación, mayor fracción de área en relación a la que se observó para la miga de pan.

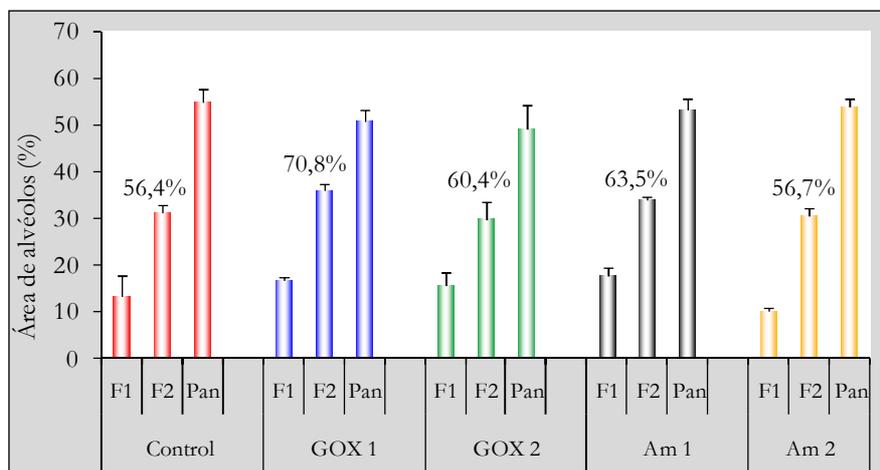


Figura 4.13. Área relativa de alvéolos (%) en masas con el agregado de enzimas al finalizar la primera y la segunda fermentación, y en la miga de pan. Se muestra el porcentaje de área que representan los alvéolos en la masa luego de la segunda fermentación en relación a la miga de pan (considerado como 100%). GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%; Am 1: α -amilasa 0,0006%; Am 2: α -amilasa 0,001%; F1: primera fermentación; F2: segunda fermentación.

En la Figura 4.14 se muestran imágenes representativas de los panes con el agregado de enzimas. A simple vista, el aspecto global de los panes no fue modificado por la presencia de las enzimas. El análisis de imagen (Tabla 4.14) muestra, sin embargo, que la miga de los panes con GOX presentó mayor cantidad de alvéolos, y que estos fueron de menor tamaño; al mismo tiempo que el área relativa de alvéolos fue menor. Por otro lado, los panes con Am presentaron una estructura alveolar (dada por número y tamaño de alvéolos) similar a la del control. Las dos dosis de ambas enzimas presentaron mayor proporción de alvéolos pequeños en relación a los de mayor tamaño (mayores valores de uniformidad). En cuanto al color de la corteza, la incorporación de α -amilasa llevó a la formación de una corteza globalmente más oscura, principalmente por la mayor cantidad de azúcares reductores que participan en las reacciones de Maillard.



Figura 4.14. Fotografías de los panes control y con enzimas (GOX 1: glucosa oxidasa 0,003%; GOX2: glucosa oxidasa 0,03%; Amilasa 1: α -amilasa 0,0006%; Amilasa 2: α -amilasa 0,001%). Barra: 1 cm.

7. Análisis de correlación entre los parámetros

En este Capítulo se encontraron correlaciones significativas que resumen el comportamiento del sistema en estudio (Tabla 4.19). Así, se observó que las masas

con mayores valores de G' y G'' -que juntos brindan información sobre la consistencia del sistema- presentaron mayor número de alvéolos de menor tamaño durante la fermentación, y esto se relaciona con la mayor capacidad de retener el aire incorporado durante el batido, pero también con una mayor dificultad para la expansión de la fase gaseosa durante la fermentación. Concordantemente, masas más resistentes llevaron a panes con mayor dureza inicial de la miga, que se relaciona con la menor fracción de aire presente, aunque la velocidad de endurecimiento no se vio afectada. Siguiendo el mismo comportamiento, las masas que presentaron mayor valor de resistencia dieron lugar a panes de menor volumen específico. Los ensayos de comportamiento reológico de las masas bajo pequeñas y grandes deformaciones no presentaron una correlación significativa.

En cuanto al análisis de las imágenes tomadas durante la fermentación, los distintos parámetros (número y tamaño de alvéolos, y fracción relativa de área ocupada por aire) correlacionaron entre sí. El tamaño de alvéolos y la fracción de aire en las masas se relacionaron de manera negativa con la dureza inicial de la miga. El volumen del pan, como se esperaba, también presentó una asociación inversa con la dureza. Además, a mayor fracción de aire presente en la miga del pan se obtuvo menor dureza de la miga; mientras que a mayor dureza inicial de la miga le correspondió mayor velocidad de endurecimiento durante el almacenamiento.

Finalmente, al considerar el comportamiento calorimétrico de las masas, se observó que a menores entalpías de gelatinización le correspondieron mayores valores de G' y G'' , menor tamaño promedio de alvéolos en las masas durante la fermentación, y menor fracción de aire en las masas. Además, una mayor temperatura de fusión del almidón retrogradado se asoció a mayores valores de G' , G'' y R . Así, las variables que influyen sobre las propiedades viscoelásticas de las masas lo hacen también sobre las propiedades del almidón durante el calentamiento.

Tabla 4.19. Valores de correlación para algunos parámetros estudiados.

	Masa													
	Reología			Gelatinización		Retrogradación		Primera fermentación			Segunda fermentación			
	G'	G''	R	ΔH	Tp	ΔH	Tp	Tc-To	N° alv/mm	Tamaño alv	% Área alv	N° alv/mm	Tamaño alv	% Área alv
G' (Pa)	1,00													
G'' (Pa)	0,99	1,00												
R (g)	0,46	0,53	1,00											
ΔH _{gel} (J/g)	0,64*	0,59*	0,08	1,00										
Tp _{gel} (°C)	-0,42	-0,50	-0,13	-0,12	1,00									
ΔH _{ret} (J/g)	-0,23	-0,13	0,30	-0,51	-0,19	1,00								
Tp _{ret} (°C)	0,56*	0,59*	0,64*	0,15	-0,02	0,28	1,00							
Tc-To _{ret} (°C)	-0,16	-0,05	0,31	-0,49	-0,12	0,88*	0,48	1,00						
N° alvéolos/mm ² F1	0,65*	0,58*	0,40	0,56	-0,08	-0,41	0,22	-0,46	1,00					
Tamaño alv F1 (mm ²)	-0,68*	-0,66*	-0,50	-0,73*	0,26	0,39	-0,23	0,38	-0,72*	1,00				
% Área F1	-0,62*	-0,62*	-0,40	-0,76*	0,30	0,31	-0,24	0,35	-0,40	0,87*	1,00			
N° alv/mm ² F2	0,83*	0,86*	0,66*	0,48	-0,48	0,01	0,67*	0,03	0,61*	-0,58*	-0,55*	1,00		
Tamaño alv F2 (mm ²)	-0,23	-0,21	0,12	-0,29	0,23	0,10	-0,39	0,02	0,01	0,06	0,26	-0,42	1,00	
% Área F2	-0,51	-0,46	-0,03	-0,70*	0,26	0,30	0,11	0,40	-0,44	0,74*	0,68*	-0,18	-0,03	1,00
VE (cm ³ /g)	-0,48	-0,50	-0,80*	-0,09	0,05	-0,23	-0,48	-0,10	-0,44	0,39	0,32	-0,52	-0,25	0,15
Dureza 0 (g)	0,85*	0,90*	0,67*	0,51	-0,49	0,13	0,70	0,18	0,43	-0,66*	-0,70*	0,88*	-0,24	-0,35
Pendiente (g/día)	0,49	0,49	0,22	0,43	-0,12	0,06	0,58*	0,12	0,33	-0,41	-0,47	0,54	-0,34	-0,14
Uniformidad	-0,22	-0,13	0,04	-0,43	-0,32	0,14	0,02	0,21	-0,20	0,34	0,32	0,15	-0,20	0,73*
N° alvéolos/mm ²	-0,41	-0,40	-0,21	-0,48	0,10	0,10	-0,01	0,12	-0,20	0,54	0,58	-0,19	-0,20	0,59
Tamaño alvéolos (mm ²)	0,24	0,19	-0,21	0,33	-0,08	-0,29	-0,26	-0,24	0,14	-0,36	-0,26	-0,14	0,21	-0,65*
% Área de alvéolos	-0,41	-0,48	-0,42	-0,08	0,35	-0,14	-0,56*	-0,25	-0,11	0,09	0,15	-0,62*	0,33	-0,26
L*	0,34	0,34	0,19	0,01	-0,29	-0,03	-0,05	-0,12	0,46	-0,10	0,14	0,17	0,49	-0,12
a*	-0,38	-0,40	-0,24	-0,03	0,37	0,01	0,04	0,02	-0,39	0,17	-0,08	-0,17	-0,58*	0,16
b*	-0,14	-0,16	-0,28	0,15	0,05	-0,04	0,13	-0,02	-0,29	0,10	-0,18	0,07	-0,86*	0,07

	Pan									
	VE	Textura		Estructura de la miga			Color de corteza			
	Dureza 0	Pendiente	Uniformidad	N° alv/cm	Tamaño alv	% Área alv	L*	a*	b*	
VE (cm ³ /g)	1,00									
Dureza 0 (g)	-0,57*	1,00								
Pendiente (g/día)	-0,22	0,68*	1,00							
Uniformidad	0,10	-0,03	0,01	1,00						
N° alvéolos/mm ²	0,01	-0,40	-0,14	0,60*	1,00					
Tamaño alvéolos (mm ²)	0,34	0,01	-0,13	-0,66*	-0,79*	1,00				
% Área de alvéolos	0,46	-0,58*	-0,46	-0,59*	-0,44	0,70*	1,00			
L*	-0,49	0,12	-0,13	0,03	0,13	-0,05	-0,19	1,00		
a*	0,40	-0,21	0,10	-0,03	0,05	-0,11	0,16	-0,95*	1,00	
b*	0,43	-0,04	0,17	0,05	0,11	-0,14	-0,03	-0,82*	0,89*	1,00

*Correlaciones de Pearson significativas (p<0,05).

R: resistencia de las masas a la extrusión; ΔH: entalpía asociada a una transición térmica; To: temperatura de inicio de una transición térmica; Tp: temperatura de pico de la endoterma de transición; Tc: temperatura de conclusión de la endoterma de transición; VE: volumen específico de pan; Pendiente: velocidad de endurecimiento de la miga de pan.

Los resultados del presente Capítulo muestran que la incorporación de los aditivos modificó el comportamiento de la masa, y esta modificación se evidenció en un cambio en sus propiedades calorimétricas y reológicas (a bajas y altas deformaciones). Además, el patrón electroforético de las proteínas que se encuentran en la masa fue alterada por la presencia de algunos de los aditivos, como el alginato y la glucosa oxidasa. Globalmente, estos cambios llevaron a la obtención de panes con diferentes características, como volumen específico de las piezas, dureza y velocidad de endurecimiento de la miga, características del alveolado y color de la corteza. No obstante, estos panes obtenidos no necesariamente fueron de mejor calidad que el control.

La masa control presentó un muy buen desempeño a la hora de obtener panes de buen volumen, con una estructura de miga aceptable y, fundamentalmente, con un menor endurecimiento de la miga durante el almacenamiento. Si se considera que este pan es elaborado a partir de una formulación simple, éste constituye una propuesta promisoría para el mercado de panificados para celíacos.

En el Capítulo anterior se observó que la interacción entre el almidón de mandioca y la harina de soja activa modificaba notoriamente las propiedades del almidón; y los resultados presentados en el presente Capítulo sugieren que esta interacción es la que gobierna el comportamiento de la masa. Bajo estas condiciones, se obtuvo un pan de buenas características. En este sentido, la incorporación de aditivos, globalmente, no mejoró la calidad final del pan, ya que modifican o impiden la interacción entre ambos componentes.

Conclusiones Generales

La celiacía es una de las enfermedades alimenticias más frecuente, con una incidencia mundial de aproximadamente 1/100-200. La enfermedad tiene una etiología multifactorial, con una interacción compleja entre factores genéticos, inmunológicos y ambientales. El factor ambiental está dado por la presencia de péptidos derivados de las prolaminas que causan una reacción inmune inadecuada, principalmente contra células epiteliales en el intestino delgado. Esto conlleva al aplanamiento de las vellosidades intestinales, que reduce sensiblemente la superficie de absorción de los nutrientes. La exposición crónica a las prolaminas en algunos pacientes puede, además, derivar en complicaciones como el desarrollo de linfomas intestinales, el retraso en el crecimiento, osteoporosis e infertilidad. Lamentablemente, hasta la actualidad no se ha informado la existencia de ningún tratamiento efectivo contra esta enfermedad, y la adhesión a una dieta libre de gluten parece la única alternativa viable.

En Argentina, los alimentos a base de trigo constituyen una gran proporción del total de los alimentos ingeridos por la población. El pan es un alimento de costo relativamente bajo, por lo que ocupa una posición de gran importancia en la nutrición en nuestro país, y también a nivel mundial. En el año 2006, en Argentina se consumieron 72,5 kg de pan/hab. Sin embargo, los aproximadamente 250 000 celíacos que viven en nuestro país no están incluidos en esta estadística, ya que sólo pueden consumir pan elaborado a partir de harinas o almidones diferentes a los provenientes del trigo. Los panes que se obtienen a partir de estas materias primas son de baja calidad tecnológica y con propiedades organolépticas deficientes. A partir de este problema, numerosos trabajos de investigación se llevaron a cabo para dar con una solución factible tanto para los pacientes celíacos como para el sector panadero/industrial.

En este trabajo se estudió el efecto que provocó la incorporación de distintos aditivos sobre la calidad y las propiedades de panes elaborados a partir de distintas materias primas sin gluten. En primera instancia, se evaluaron distintas formulaciones para la obtención de panes a partir de harina de arroz, harina de maíz y harina de soja inactiva deslipidizada, en distintas proporciones y con distinta cantidad de agua (entre 110 y

220%, base harina). Se observó que la incorporación de harina de soja afectó las características de los batidos y los panes debido a la afinidad que tienen las proteínas de soja por el agua y a las interacciones que se establecieron entre estas proteínas y los almidones. La presencia de harina de soja mejoró el volumen específico de los panes, tanto a base de arroz como de maíz, y este aumento estuvo relacionado con un incremento en la resistencia de los batidos. Sin embargo, la relación positiva entre ambos parámetros ocurrió hasta un cierto límite/umbral de resistencia. Globalmente, los panes elaborados con arroz, maíz y soja presentaron buenos atributos. A partir de estos resultados, se seleccionó la formulación a base de harina de arroz y de maíz en igual proporción, 20% de harina de soja y 158% de agua, base harina, y sobre esta formulación se estudió el efecto de diferentes aditivos, que consistieron en hidrocoloides (goma xántica, carboximetilcelulosa, carragenato y alginato), proteínas (concentrado proteico de suero de leche y huevo pasteurizado en polvo), emulsionantes (SSL y DATEM) y enzimas (glucosa oxidasa y α -amilasa). Es muy probable que la alta cantidad de agua presente en este sistema haya enmascarado de cierto modo el efecto de los aditivos presentes, ya que sólo se observó un cambio pronunciado en las propiedades de los batidos y las características del pan luego del agregado de hidrocoloides. Se procedió entonces a estudiar el efecto de los mismos aditivos en un sistema distinto, con materias primas diferentes que permitan la utilización de cantidades menores de agua. Se seleccionó una formulación a base de almidón de mandioca, harina de arroz y harina de soja activa entera, en la que se utilizó un 65% de agua, base harina, salvo para los panes con hidrocoloides, en los que se incorporó 75% de agua. Si bien los distintos aditivos tuvieron un efecto significativo sobre las propiedades calorimétricas y reológicas de las masas y sobre la calidad de los panes obtenidos, este efecto no siempre llevó a la producción de productos con parámetros tecnológicos más aceptables. La masa control presentó un buen desempeño a la hora de obtener panes de buena calidad tecnológica, y si se considera que fue elaborada a partir de una formulación muy simple, ésta se

transforma en una propuesta prometedora para la industria dedicada a la panificación de productos aptos para celíacos.

Dada la controversia que existe sobre el mecanismo de endurecimiento del pan durante el almacenamiento, donde algunos autores alegan que la interacción entre el gluten y el almidón es el principal responsable de este fenómeno, queda claro que en panes elaborados a partir de harinas o almidones libres de gluten, la miga también endurece con el tiempo. Se observó también que la presencia de proteínas distintas al gluten, como la proteína de la harina de soja, ya sea nativa o desnaturalizada, disminuye el endurecimiento de la miga, y esta disminución está relacionada, al menos en parte, a una disminución en la retrogradación del almidón presente en el sistema, evaluado por calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X.

Las buenas características del pan se debieron en gran medida a la interacción entre el almidón de mandioca y las proteínas de la soja nativas presentes en la harina activa. Esta interacción ocurrió, probablemente, a través de los componentes asociados a la superficie del gránulo del almidón. Además, bajo condiciones que favorecieron la gelatinización, el almidón de mandioca presentó un comportamiento particular, exponiendo en mayor medida que otros almidones (como el de maíz) las cadenas de amilosa/amilopectina, que interaccionaron con las proteínas de la soja; este hecho modificó las propiedades de *pasting* y retrogradación del almidón. El efecto de la harina de soja activa sobre la recristalinización del almidón de mandioca quedó demostrado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir de este trabajo, se logró obtener panes libres de gluten de calidad variable de acuerdo, fundamentalmente, a las materias primas que se utilizaran y a la cantidad de agua que se incorporara. Los resultados demuestran, contrariamente a la opinión generalizada, que la incorporación de aditivos no es imprescindible para la obtención de productos libres de gluten de buena calidad, especialmente si se utilizan aquellos que normalmente se emplean atendiendo a paliar las deficiencias de productos

elaborados a base de harina de trigo, que representan un sistema particular, y completamente diferente a aquellos sin gluten.

Este hecho abre nuevas perspectivas a la hora de seleccionar materias primas y variables tecnológicas, como amasado y tipo de fermentación, ya que una selección cuidadosa de variables tan simples puede reducir los costos de producción y facilitar notablemente la obtención de formulaciones de recetas aptas para celíacos.

Bibliografía

- AACC. American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC. Novena Edición. St Paul, MN, EUA.
- Acs E, Kovacs Z, Matuz J. 1997. Possibilities of producing low-protein, gluten-free bread. 1. Structure formation. *Novenytermeles*, 46, 227-234.
- Ahlborn GJ, Pike OA, Hendrix SB, Hess WM, Huber CS. 2005. Sensory, mechanical, and microscopic evaluation of staling in low-protein and gluten-free breads. *Cereal Chemistry*, 82, 328-335.
- Aït Kaddour A, Barron C, Robert P, Cuq B. 2008. Physico-chemical description of bread dough mixing using two-dimensional near-infrared correlation spectroscopy and moving-window two-dimensional correlation spectroscopy. *Journal of Cereal Science*, 48, 10-19.
- Akimov SS, Belkin AM. 2001. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood*, 98, 1567-1576.
- Alloncle M, Doublier JL. 1991. Viscoelastic properties of maize starch/hydrocolloid pastes and gels. *Food Hydrocolloids*, 5, 455-467.
- Ameille V, Castello P, Garcia R, Rakotozafy L, Potus J, Nicolas J. 2000. Effects of glucose oxidase or lipase addition on dough consistency and oxygen consumption during mixing of unyeasted flour dough. *Sciences des Aliments*, 20, 441-455.
- Angioloni A, Collar C. 2009. Small and large deformation viscoelastic behaviour of selected fibre blends with gelling properties. *Food Hydrocolloids*, 23, 742-748.
- Anjum FM, Khan MR, Din A, Saeed M, Pasha I, Arshad MU. 2007. Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits-structure, genetics, and relation to dough elasticity. *Journal of Food Science*, 72, 56-63.
- Anton AA, Artfield SD. 2008. Hydrocolloids in gluten free breads: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 11-23.
- Arendt EK, O'Brien CM, Schober T, Gormley TR, Gallagher E. 2002. Development of gluten-free cereal products. *Farm and Food*, 12, 21-27.
- Argos P, Pedersen K, Marks MD, Larkins BA. 1982. A structural model for maize zein proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 9984-9990.

- Armero E, Collar C. 1998. Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives. *Journal of Cereal Science*, 28, 165-174.
- Atwell WA, Hood LF, Lineback DR, Varriano-Marston E, Zobel HF. 1988. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Foods World*, 33, 306-311.
- Autio K, Flander L, Kinnunen A, Heinonen R. 2001. Bread quality relationship with rheological measurements of wheat flour dough. *Cereal Chemistry*, 78, 654-657.
- Baek MH, Yoo B, Lima S-T. 2004. Effects of sugars and sugar alcohols on thermal transition and cold stability of corn starch gel. *Food Hydrocolloids*, 18, 133-142.
- Baik M-Y, Chinachoti P. 2000. Moisture redistribution and phase transitions during bread staling. *Cereal Chemistry*, 77, 484-488.
- Baker LA, Rayas-Duarte RP. 1998. Retrogradation of amaranth starch at different storage temperatures and the effects of salt and sugars. *Cereal Chemistry*, 75, 308-314.
- Baldwin PM. 2001. Starch granule-associated proteins and polypeptides: A review. *Starch/Stärke*, 53, 475-503.
- Ballesteros López AC, Guimarães Pereira AJ, Gonçalves Junqueira R. 2004. Flour mixture of rice flour, corn and cassava starch in the production of gluten-free white bread. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 63-70.
- Bárcenas ME, Benedito C, Rosell MC. 2004. Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage. *Food Hydrocolloids*, 18, 769-774.
- Bárcenas ME, Rosell CM. 2005. Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*, 19, 1037-1043.
- Barichelo V, Yada RI, Coffin RH, Stanley DW. 1990. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: Starch structure and composition. *Journal of Food Science*, 55, 1054-1059.

- Belitz HD, Grosch W. 1999a. Cereal and cereal products. En: Food Chemistry. Segunda edición. Editado por Belitz HD y Grosch W. Springer, Alemania. 631-692.
- Belitz HD, Grosch W. 1999b. Carbohydrates. En: Food Chemistry. Segunda edición. Editado por Belitz HD y Grosch W. Springer, Alemania. 237-318.
- Bell DA. 1990. Methylcellulose as a structure enhancer in bread baking. *Cereal Foods World*, 35, 1001-1006.
- Belton PS, Colquhoun IJ, Grant A, Wellner N, Field J M, Shewry PR, Tatham AS. 1995. FTIR and NMR studies on the hydration of a high-Mr subunit of glutenin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17, 74-80.
- Betchel W. 1955. A review of bread staling research. *Cereal Chemistry*, 13, 108-121.
- Biliaderis C, Maurice T, Vose J. 1980. Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science*, 45, 1669-1674.
- Biliaderis C. 1990. Thermal analysis of food carbohydrates. En: Thermal Analysis of Foods. Editado por Harwalkar V y Ma C. Elsevier, Inglaterra. 168-220.
- Biliaderis CG, Tonogai JR. 1991. Influence of lipids on the thermal and mechanical properties of concentrated starch gels. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39, 833-840.
- Blennow A, Hansen M, Schulz A, Jorgensen K, Donald AM, Sanderson J. 2003. The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. *Journal of Structural Biology*, 143, 229-241.
- Bloksma AH, Bushuk W. 1988. Rheology and chemistry of dough. En: Wheat: chemistry and technology. Tercera edición. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. EUA. 131-217.
- Bloksma AH. 1990. Rheology of the breadmaking process. *Cereal Foods World*, 35, 228-236.
- Bourne MC. 1978. Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7), 62-66.

- Bowles LK. 1996. Amylolytic enzymes. En: Baked goods freshness: Technology, evaluation and inhibition of staling. Editado por Hebeda RE y Zobel HF. Marcel Dekker, Nueva York, EUA. 105-129.
- Braccini I, Grasso RP, Perez S. 1999. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydrate Research*, 317, 119-130.
- Brates LV, White PJ. 1986. Interactions of amylopectin with monoglycerides in model systems. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 63, 1537-1540.
- C.I.E. 1986. Colorimetrie (3ra edición). Publication C.I.E. N° 15, 2. Viena: Central Bureau of the Commission Internationale de L'Eclairage.
- Cabrera-Chávez F, Calderón de la Barca AM. 2008. Letter to the editor. *Journal of Cereal Science*, 48, 878.
- Cagampang GB, Cruz LJ, Espiritu SG, Santiago RG, Juliano BO. 1966. Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chemistry*, 43, 145-155.
- Campbell GM, Rielly CD, Fryer PJ, Sadd PA. 1991. The measurement of bubble size distributions in an opaque food fluid. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, 69, 67-76.
- Cato L, Gan JJ, Rafael LGB, Small DM. 2004. Gluten free breads using rice flour and hydrocolloid gums. *Food Australia*, 56, 75-78.
- Cauvain SP, Chamberlain N. 1988. The bread improving effect of fungal α -amylase. *Journal of Cereal Science*, 8, 239-248.
- Cauvain SP. 1998. Improving the control of staling in frozen bakery products. *Food Science and Technology*, 9, 56-61.
- Chen J-J, Lii C-Y, Lu S. 2003. Physicochemical and morphological analyses on damaged rice starches. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 283-289.
- Chen P, Yu L, Simon G, Petinakis E, Dean K, Chen L. 2009. Morphologies and microstructures of corn starches with different amylose-amylopectin ratios studied by confocal laser scanning microscope. *Journal of Cereal Science*, 50, 241-247.

- Chung OK, Tsen CC, Robinson RJ. 1981. Functional properties of surfactants in breadmaking. III. Effects of surfactants and soy flour on lipid binding in breads. *Cereal Chemistry*, 58, 220-226.
- Clemente MG, Musu MP, Frau F, Brusco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S. 2000. Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. *Gut*, 47, 520-526.
- Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud. CODEX STAN 118-1979; enmendado 1983; revisado 2008.
- Collar C, Andreu P, Martínez JC, Armero E. 1999. Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: a response surface methodology study. *Food Hydrocolloids*, 13, 467-475.
- Courtin CM, Roelants A, Delcour JA. 1999. Fractionation reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1870-1877.
- Courtin CM, Delcour JA. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, 35, 225-243.
- Creda MP, Wosiacki G. 1985. Characterization of pinhao starch. Part II. *Starch/Stärke*, 37, 404-407.
- Daniels DGH, Fisher N. 1976. Release of carbon dioxide from dough during baking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, 351-357.
- Danzer LA, Ades H, Rees ED. 1975. The helical content of zein, a water insoluble protein, in non-aqueous solvents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 386, 26-31.
- Davidou S, Le Meste M, Debever E, Bekaert D. 1996. A contribution to the study of staling of white bread: effect of water and hydrocolloid. *Food Hydrocolloids*, 10, 375-383.
- Debet MR, Gidley JM. 2006. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*, 64, 452-465.

- Defloor I, Delcour JA. 1999. Impact of maltodextrins and antistaling enzymes on the differential scanning calorimetry staling endotherm of baked bread doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 737-741.
- Demirkesen I, Mert B, Sumnu G, Sahin S. 2010. Rheological properties of gluten-free bread formulations. *Journal of Food Engineering*, 96, 295-303.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nature Medicine*, 3, 797-801.
- Dieterich W, Trapp D, Esslinger B, Leidenberger M, Piper J, Hahn E, Schuppan D. 2003. Autoantibodies of patients with celiac disease are insufficient to block tissue transglutaminase activity. *Gut*, 52, 1562-1566.
- Dobraszczyk BJ. 2003. Measuring the rheological properties of dough. En: *Bread Making: Improving Quality*. Editado por Cauvain SP. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, Inglaterra. 375-400.
- Dobraszczyk BJ, Salmanowicz BP. 2008. Comparison of predictions of baking volume using large deformation rheological properties. *Journal of Cereal Science*, 47, 292-301.
- Donovan J. 1979. Phase transitions of starch-water system. *Biopolymers*, 18, 263-275.
- Dragsdorf RF, Varriano-Morston E. 1980. Bread staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with α -amylases from different sources. *Cereal Chemistry*, 57, 310-314.
- Drapron R, Godon B. 1987. Role of enzymes in baking. En: *Enzymes and their role in cereal technology*. Editado por Kruger JE, Lineback D y Stauffer CE. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EUA. 281-324.
- Durán E, León AE, Barber B, Benedito de Barber C. 2001. Effect of low molecular weight dextrins on gelatinization and retrogradation of starch. *European Food Research and Technology*, 212, 203-207.
- Duvick DN. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chemistry*, 38, 515-519.

- Dziezak JD. 1988. Emulsifiers: the interfacial key to emulsion stability. *Food Technology*, 42, 172-186.
- Eliasson AC. 1980. Effect of water content on the gelatinization of wheat starch. *Starch/Stärke*, 32, 270-272.
- Eliasson AC. 1983. Differential scanning calorimetry studies on wheat starch-gluten mixture. *Journal of Cereal Science*, 30, 199-205.
- Eliasson AC. 1986. On the effects of surface active agents on the gelatinization of starch - a calorimetric investigation. *Carbohydrate Polymers*, 6, 463-476.
- Eliasson AC, Ljunger G. 1988. Interactions between amylopectin and lipid additives during retrogradation in a model system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44, 353-361.
- Eliasson AC, Larsson K. 1993. Bread. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson A y Larsson K. Marcel Dekker, Nueva York, EUA. 325-363.
- Eliasson AC, Gudmundsson M. 1996. Starch: Physicochemical and functional aspects. En: *Carbohydrates in Food*. Editado por Eliasson AC. Marcel Dekker, Nueva York, EUA. 431-503.
- Elton GAH. 1969. Some quantitative aspects of bread staling. *Baker's Digest*, 43, 24-27.
- Engleson J, Atwell B. 2008. Gluten-free Product Development. *Cereal Foods World*, 53, 180-184.
- Escudier MP, Gouldson IW, Pereira AS, Pinho FT, Poole RJ. 2001. On the reproducibility of the rheology of shear thinning liquids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 97, 99-124.
- Esposito C, Paparo F, Caputo I, Rossi M, Maglio M, Sblattero D, Not T, Porta R, Auricchio S, Marzari R, Troncone R. 2002. Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut*, 51, 177-181.

- Every D, Gerrard JA, Gilpin MJ, Ross M, Newberry MP. 1998. Staling in starch bread: the effect of gluten additions on specific loaf volume and firming rate. *Starch/Stärke*, 50, 443-446.
- Fannon JE, Shull JM, BeMiller JN. 1993. Interior channels of starch granules. *Cereal Chemistry*, 70, 611-613.
- Ferrand EA. 1964. Flour properties in relation to the modern bread processes in the United Kingdom with special reference to alpha-amylase and starch damage. *Cereal Chemistry*, 41, 98-111.
- Ferrero C, Martino MN, Zaritzky NE. 1996. Effect of hydrocolloids on starch thermal transitions, as measured by DSC. *Journal of Thermal Analysis*, 47, 1247-1266.
- Ferry JD. 1980. The nature of viscoelastic behavior. En: *Viscoelastic properties of polymers*. Tercera edición. Editado por Ferry, JD. Wiley, Nueva York, EUA. 1-32.
- Flack E. 1987. The contribution of emulsifying agents to modern food production. *Food Science and Technology Today*, 1, 240-243.
- Fleming SE, Sosulski FW. 1978. Microscopy evaluation of bread fortified with concentrated plant proteins. *Cereal Chemistry*, 55, 373-382.
- Folk JE, Finlayson JS. 1977. The ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link and the catalytic role of TGases. *Advances in Protein Chemistry*, 31, 1-133.
- Gallagher E, Gormley TR, Arendt AK. 2003a. Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *Journal of Food Engineering*, 56, 153-161.
- Gallagher E, Kunkel A, Gormley TR, Arendt EK. 2003b. The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf-life (intermediate and long term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 218, 44-48.
- Gan J, Rafael LGB, Cato L, Small DM. 2001. Evaluation of the potential of different rice flours in bakery formulations. En: *Cereals 2001. Proceedings del 51 Australian Cereal Chemistry Conference*. Editado por Wootton M, Batey IL, Wrigley CW. New South Wales, Australia. Royal Australian Chemical Institute, Werribee, Australia. 309-312.

- Gan Z, Angold RE, Williams MR, Ellis PR, Vaughan JG, Galliard T. 1990. The microstructure and gas retention of bread dough. *Journal of Cereal Science*, 12, 15-24.
- Gan Z, Ellis PR, Schofield JD. 1995. Mini review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, 21, 215-230.
- Garcia V, Colonna P, Lourdin D, Buleon A, Bizot H, Ollivon M. 1996. Thermal transitions of cassava starch at intermediate water contents. *Journal of Thermal Analysis*, 47, 1213-1228.
- García-Ochoa F, Santos V, Casas J, Gómez E. 2000. Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnology Advance*, 18, 549-579.
- Gellynck X, Kühne B, Van Bockstaele F, Van de Walle D, Dewettinck K. 2009. Consumer perception of bread quality. *Appetite* 53, 16-23.
- Gerrard JA, Abbot RC, Newberry MP, Gilpin MJ, Ross M, Fayle SE. 2001. The effects of non-gluten proteins on the staling of bread. *Starch/Stärke*, 53, 278-280.
- Gerrard JA, Sutton KH. 2005. Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for celiac disease. *Trend in Food Science and Technology*, 16, 510-512.
- Ghiasi K, Hosney RC, Varriano-Marston E. 1982a. Gelatinization of wheat starch. I. Excess-water systems. *Cereal Chemistry*, 59, 81-85.
- Ghiasi K, Varriano-Marston E, Hosney RC. 1982b. Gelatinization of wheat starch. II. Starch-surfactant interaction. *Cereal Chemistry*, 59, 86-88.
- Glaring MA, Koch CB, Blennow A. 2006. Genotype-specific spatial distribution of starch molecules in the starch granule: A combined CLSM and SEM approach. *Biomacromolecules*, 7, 2310-2320.
- Goel PK, Singhal RS, Kulkarni PR. 1999. Studies on interactions of corn starch with casein and casein hydrolysates. *Food Chemistry*, 64, 383-389.
- Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke WS, Courtin CM, Gebruers K, Delcour JA. 2005. Wheat constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 12-30.

- Goesaert H, Slade L, Levine H, Delcour JA. 2009. Amylases and bread firming - an integrated view. *Journal of Cereal Science*, 50, 345-352.
- Gómez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S, Castelletto R, Echeverría R, Sugai E, Vázquez H, Mauriño E, Bai JC. 2001. Prevalence of celiac disease in Argentina: Screening of an adult population in the La Plata area. *The American Journal of Gastroenterology*, 96, 2700-2704.
- Gómez M, del Real S, Rosell CM, Ronda F, Blanco CA, Caballero PA. 2004. Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread quality. *European Food Research and Technology*, 219, 145-150.
- Gortner RA, MacDonald RT. 1944. Studies on the fractionation of zein. *Cereal Chemistry*, 21, 324-333.
- Graham DE, Phillip MC. 1979. Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70, 403-414.
- Gray JA, BeMiller JN. 2003. Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 1-20.
- Greenwood C. 1976. Starch. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 1. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EUA. 119-157.
- Gruppen H, Kormelink FJM, Voragen AGJ. 1993. Water-unextractable cell-wall material from wheat-flour. III. A structural model for arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 18, 111-128.
- Gudmundsson M. 1992. Effects of an added inclusion-amylose complex on the retrogradation of some starches and amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 17, 299-304.
- Gujral HS, Haros M, Rosell CM. 2003. Starch hydrolysing enzymes for retarding the staling for rice bread. *Cereal Chemistry*, 80, 750-754.
- Gujral SH, Rosell MC. 2004a. Improvement of the baking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Research International*, 37, 75-81.

- Gujral SH, Rosell MC. 2004b. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 39, 225-230.
- Haarasilta S, Pullinen T, Vaisanen S, Tammersalo-Karsten I. 1991. Enzyme product and method of improving the properties of dough and the quality of bread. US Patent 4 990 343.
- Hähnel W, Jussofie I, Weitemeyer C, Müller F. 1994. Infrarotspektroskopische untersuchungen zur wirkung von emulgatoren in hefebackwaren I: Modellversuche zur wirkung von emulgatoren auf gluten und aminosäuren. *Fat Science and Technology*, 96, 60-64.
- Halttunen T, Mäki M. 1999. Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology*, 116, 566-572.
- Hamada JS. 1996. Separation and molecular mass distribution of rice proteins by size-exclusion high-performance liquid chromatography in a dissociating buffer. *Journal of Chromatography A*, 734, 195-203.
- Hamdami N, Monteau J-Y, Le Bail A. 2004. Thermophysical properties evolution of French partly baked bread during freezing. *Food Research International*, 37, 703-713.
- Han J-A, BeMiller JN. 2008. Effects of protein on crosslinking of normal maize, waxy maize, and starches. *Carbohydrate Polymers*, 73, 532-540.
- Han X-Z, Hamaker BR. 2002. Location of starch granule-associated proteins revealed by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Cereal Science*, 35, 109-116.
- Han X-Z, Benmoussa M, Gray JA, BeMiller JN, Hamaker BR. 2005. Detection of proteins in starch granule channels. *Cereal Chemistry*, 82, 351-355.
- Haque A, Morris ER. 1994. Combined use of ispaghula and HPMC to replace or augment gluten in breadmaking. *Food Research International*, 27, 379-393.
- Hatcher DW, Anderson MJ, Desjardins RG, Edwards NM, Dexter JE. 2002. Effects of flour particle size and starch damage on processing and quality of white salted noodles. *Cereal Chemistry*, 79, 64-71.

- He H, Hoseney RC. 1990. Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. *Cereal Chemistry*, 67, 603-605.
- He H, Hoseney RC. 1991. Gas retention of different cereal flours. *Cereal Chemistry*, 68, 334-336.
- Heiniö R-L. 2006. Sensory attributes of bakery products. En: *Bakery products: science and technology*. Editado por Hui YH. Blackwell Publishing, Ames, EUA. 285-298.
- Hibino K, Kidzu T, Masumura T, Ohtsuki K, Tanaka K, Kawabata K, Fujii S. 1989. Amino acid composition of rice prolamin polypeptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 513-518.
- Hoover R. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root and root starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 45, 253-267.
- Hoseney RC, Faubion JM. 1981. A mechanism for the oxidative gelation of wheat flour water-soluble pentosans. *Cereal Chemistry*, 58, 421-424.
- Hoseney RC. 1984. Functional properties of pentosans in baked foods. *Food Technology*, 38, 114-117.
- Hoseney RC. 1994. Proteins of cereals. En: *Principles of Cereal; Science and Technology*. Segunda edición. Editado por Hoseney RC. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EUA. 65-79.
- Houston DF, Mohammed A. 1970. Purification and partial characterization of a major globulin from rice endosperm. *Cereal Chemistry*, 47, 5-12.
- Hudson HM, Daubert CR, Foegeding EA. 2000. Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3112-3119.
- Hug-Iten S, Escher F, Conde-Petit B. 2003. Staling of bread: role of amylose and amylopectin and influence of starch-degrading enzymes. *Cereal Chemistry*, 80, 654-661.

- Israkarn K, Hongsprabhas P. 2007. Influences of granule-associated proteins on physicochemical properties of mungbean and cassava starches. *Carbohydrate Polymers*, 68, 314-322.
- Iturriaga L, López B, Añón C. 2004. Thermal and physicochemical characterization of seven argentine rice flours and starches. *Food Research International*, 37, 439-447.
- Izydorczyk MS, Biliaderis CG, Bushuk W. 1990. Oxidative gelation studies of water-soluble pentosans from wheat. *Journal of Cereal Science*, 11, 153-169.
- Jacobsberg FR, Worman SL, Daniels NWR. 1976. Lipid binding in wheat-flour doughs: the effect of DATEM emulsifier. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, 1064-1070.
- Janeway CA, Jr. 2001. How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 7461-7468.
- Jenkins PJ, Donald AM. 1998. Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydrate Research*, 308, 133-147.
- Joshi P, Brimelow C. 2002. Colour measurement of food by colour reflectance. En: *Colour in food. Improving quality*. Editado por MacDougall DB. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra, y CRC Press LLC, Boca Ratón, EUA. 80-114.
- Juliano BO. 1972. The rice caryopsis and its composition. En: *Rice Chemistry and Technology*. Primera edición. Editado por Houston DF. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN, EUA. 16-74.
- Juliano BO. 1985. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. En: *Rice Chemistry and Technology*. Segunda Edición. Editado por Juliano BO. American Association of Cereal Chemist, St Paul, MN, EUA. 59-174.
- Kagawa H, Hirano H, Kikuchi F. 1988. Variation in glutelin seed storage protein in rice (*Oryza sativa* L.). *Japanese Journal of Breeding*, 38, 327-332.

- Katsube-Tanaka T, Duldulao JBA, Kimura Y, Iida S, Yamaguchi T, Nakano J, Utsumi S. 2004. The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1699, 95-102.
- Kenny S, Wehrle K, Auty M, Arendt EK. 2001. Influence of sodium caseinate and whey protein on baking properties and rheology of frozen dough. *Cereal Chemistry*, 78, 458-463.
- Kent NL, Evers AD. 1994. Bread-baking technology. En: *Kent's technology of cereals*. Cuarta edición. Pergamon, Oxford, Inglaterra. 191-217.
- Kim HS, Huber KC. 2008. Channels within soft wheat starch A- and B-type granules. *Journal of Cereal Science*, 48, 159-172.
- Kim SK, D'Appolonia BL. 1977a. The role of wheat flour constituents in bread staling. *The Baker's Digest*, 51, 38-57.
- Kim SK, D'Appolonia BL. 1977b. Bread staling studies. I. Effect of protein content on staling rate and bread crumb pasting properties. *Cereal Chemistry*, 54, 207-215.
- Kinsella JE. 1979. Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 56, 242-258.
- Kirchhoff E, Schieberle P. 2001. Determination of key aroma compounds in the crumb of a three-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4304-4311.
- Kishimoto T, Watanabe M, Mitsui T, Hori H. 1999. Glutelin basic subunits have mammalian mucin-type O-linked disaccharide side chain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370, 271-277.
- Kokelaar JJ, Prins A. 1995. Surface rheological properties of bread dough components in relation to gas bubble stability. *Journal of Cereal Science*, 22, 53-61.
- Krog N. 1981. Theoretical aspects of surfactants in relation to their use in breadmaking. *Cereal Chemistry*, 58, 158-164.
- Krog N, Olesen SK, Toemaes H, Joensson T. 1989. Retrogradation of the starch fraction in wheat bread. *Cereal Foods World*, 34, 281-285.

- Krueger BR, Knutson CA, Inglett GE, Walker CE. 1987. A differential scanning calorimetry study on the effects of annealing on gelatinisation behavior of corn starch. *Journal of Food Science*, 52, 715-718.
- Kulp K, Ponte JG. 1981. Staling of white pan bread: Fundamental causes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, 1-48.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 681-685.
- Lamsal BP, Jung S, Johnson LA. 2007. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1215-1223.
- Larsson L. 1980. Inhibition of starch gelatinization by amylose-lipid complex formation. *Starch/Stärke*, 32, 125-126.
- Lazaridou A, Duta D, Papageorgiou M, Belc N, Biliaderis CG. 2007. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79, 1033-1047.
- Lee SH, BeMiller JN. 2008. Lysophosphatidylcholine identified as channel-associated phospholipid of maize starch granules. *Cereal Chemistry*, 85, 776-779.
- Lefebvre J, Mahmoudi N. 2007. The pattern of the linear viscoelastic behaviour of wheat flour dough as delineated from the effects of water content and high molecular weight glutenin subunits composition. *Journal of Cereal Science*, 45, 49-58.
- León AE, Durán E, Benedito de Barber C. 1997a. A new approach to study starch changes occurring in the dough-baking process and during bread storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 204, 316-320.
- León AE, Durán E, Benedito de Barber C. 1997b. Firming of starch gels and amylopectin retrogradation as related to dextrin production by α -amylase. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 205, 131-134.
- Leung HK, Steinberg MP. 1979. Water binding of food constituents as, determined by NMR, freezing, sorption and dehydration. *Journal of Food Science*, 44, 1212-1216.

- Lezcano E. 2006. Trigo y sus derivados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Agroindustria y Mercados. Dirección Nacional de Alimentos. Ministerio de Economía y Producción - Buenos Aires, Argentina.
- Li J-Y, Yeh AI. 2001. Relationship between thermal, rheological characteristics and swelling power of various starches. *Journal of Food Engineering*, 50, 141-148.
- Li J-Y, Yeh A-I, Fan K-L. 2007. Gelation characteristics and morphology of corn starch/soy protein concentrate composites during heating. *Journal of Food Engineering*, 78, 1240-1247.
- Lin J-H, Singh H, Chang Y-C, Chang Y-H. 2010. Factor analysis of the functional properties of rice flours from mutant genotypes. *Food Chemistry*, 126, 1108-1114.
- Lodi A, Vodovotz Y. 2008. Physical properties and water state changes during storage in soy bread with and without almond. *Journal of Food Chemistry*, 110, 554-561.
- Lorand K, Conrad SM. 1984. Transglutaminases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 58, 9-35.
- Lundin KEA, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. 1993. Gliadin-specific, HLADQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$)-restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac-disease patients. *Journal of Experimental Medicine*, 178, 187-196.
- Lundin KEA, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. 1994. T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac-disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Human Immunology*, 41, 285-291.
- Maaurf AG, Che Man YB, Asbi BA, Junainah AH, Kennedy JF. 2001. Gelatinisation of sago starch in the presence of sucrose and sodium chloride as assessed by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 45, 335-345.
- Maforimbo E, Skurray G, Uthayakumaran S, Wrigley CW. 2006. Improved functional properties for soy-wheat doughs due to modification of the size distribution of polymeric proteins. *Journal of Cereal Science*, 43, 223-229.
- Malhotra A, Coupland JN. 2004. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18, 101-108.

- Mandala I, Michon C, Launay B. 2004. Phase and rheological behaviors of xanthan/amylose and xanthan/starch mixed systems. *Carbohydrate Polymers*, 58, 285-292.
- Mandala I, Karabela D, Kostaropoulos A. 2007. Physical properties of breads containing hydrocolloids stored at low temperature. I. Effect of chilling. *Food Hydrocolloids*, 21, 1397-1406.
- Mandala I, Polaki A, Yanniotis S. 2009. Influence of frozen storage on bread enriched with different ingredients. *Journal of Food Engineering*, 92, 137-145.
- Marco C, Rosell MC. 2008a. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *European Food Research and Technology*, 227, 1205-1213.
- Marco C, Rosell MC. 2008b. Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. *Journal of Food Engineering*, 84, 132-139.
- Mariotti M, Lucisano M, Pagani MA, Ng PKW. 2009. The role of corn starch, amaranth flour, pea isolate and Psillium flour on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. *Food Research International*, 42, 963-975.
- Martin ML, Zeleznak KJ, Hoseney RC. 1991. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. *Cereal Chemistry*, 68, 498-503.
- Matsushima N, Danno G, Takezawa H, Izumi Y. 1993. Three-dimensional structure of maize a-zein proteins studied by small angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1339, 14-22.
- McCarthy DF, Gallagher E, Gormley TR, Schober TJ, Arendt EK. 2005. Application of response surface methodology in the development of gluten-free bread. *Cereal Chemistry*, 82, 609-615.
- McKinney LL. 1958. Zein. En: *The Encyclopedia of Chemistry*. Editado por Clark GL. Reinhold Publishing, Nueva York, EUA. 319-320.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. 2000. Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, 343, 338-344.

- Meuser F, Suckow P. 1986. Non-starch polysaccharides. En: Chemistry and physics of baking. Editado por Blanshard MV, Frazier PJ y Galliard T. The Royal Society of Chemistry, Londres, Inglaterra. 42-61.
- Mezaize S, Chevallier S, Le Bail A, de Lamballerie M. 2009. Optimization of gluten-free formulations for french-style breads. *Journal of Food Science*, 74, 140-146.
- Millane RP, Wang B. 1990. A cellulose-like conformation accessible to the xanthan backbone and implications for xanthan synergism. *Carbohydrate Polymers*, 13, 57-68.
- Mirsaeedghazi H, Emam-Djomeh Z, Mousavi, SMA. 2008. Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 112-119.
- Moe ST, Draget KI, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O. 1995. Alginates. En: Food polysaccharides and their applications. Editado por Stephen AM. Marcel Dekker, Nueva York, EUA. 245-286.
- Molberg Ø, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorff P, Lundin KEA, Sjöström H, Sollid LM. 1998. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells. *Nature Medicine*, 4, 713-717.
- Molina Ortiz SE, Puppò MC, Wagner JR. 2004. Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates-carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, 18, 1045-1053.
- Moore MM, Schober TJ, Dockery P, Arendt EK. 2004. Textural comparison of gluten free and wheat-based doughs, batters and breads. *Cereal Chemistry*, 81, 567-575.
- Moore MM, Heinbockel M, Dockery P, Ulmer HM, Arendt EK. 2006. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 83, 28-36.
- Moorthy SN. 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A Review. *Starch/Stärke*, 54, 559-592.

- Moreira MA, Hermondson MA, Larkins BA, Nielsen NC. 1979. Partial characterization of the acidic and basic polypeptides of glycinin. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 9921-9926.
- Morgan KR, Gerrard JA, Every D, Ross M, Gilpin M. 1997. Staling in starch bread: the effect of antistaling α -amylase. *Starch/Stärke*, 49, 54-59.
- Morita Y, Yoshida C. 1968. Studies on gamma globulin of rice embryo. Part I. Isolation and purification of gamma globulin from rice embryo. *Journal of Biological Chemistry*, 32, 664-670.
- Morris ER, Rees DA, Robinson G. 1980. Cation-specific aggregation of carrageenan helices. Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 138, 349-362.
- Mossé J. 1961. Monographie sur une protéine du maïs: la zéine. *Annales de Physiologie Végétale*, 3, 105-139.
- Münzing K. 1991. DSC studies of starch in cereal and cereal products. *Thermochimica Acta*, 193, 441-448.
- Neumann H, Bruemmer JM. 1997. Investigation with the production of gluten free bread and roll specialties. *Getreide Mehl und Brot*, 51, 50-55.
- Nwokocha LM, Aviara NA, Senan C, Williams PA. 2009. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. *Carbohydrate Polymers*, 76, 362-367.
- Oates CG, Ledward DA, Mitchell JR, Hodgson I. 1987. Glutamic acid reactivity in heated protein and protein-alginate mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 477-483.
- Ogawa M, Kumamuru T, Satoh H, Iwata N, Omura T, Kasai Z, Tanaka K. 1987. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant and Cell Physiology*, 28, 1517-1527.
- Onyango C, Unbehend G, Lindhauer MG. 2009. Effect of cellulose-derivatives and emulsifiers on creep-recovery and crumb properties of gluten-free bread prepared from sorghum and gelatinised cassava starch. *Food Research International*, 42, 949-955.

- Onyango C, Mutungi C, Unbehend G, Lindhauer MG. 2011. Modification of gluten-free sorghum batter and bread using maize, potato, cassava or rice starch. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 681-686.
- Osborne TB. 1907. Proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution Washington, 84, 1-119.
- Oudgenoeg G, Hilhorst R, Piersma SR, Boeriu CG, Gruppen H, Hessing M, Voragen AG, Laane C. 2001. Peroxidase mediated cross-linking of a tyrosine containing peptide with ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2503-2510.
- Peressini D, Pin M, Sensidoni A. 2011. Rheology and breadmaking performance of rice-buckwheat batters supplemented with hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 25, 340-349.
- Phan-Thien N, Safari-Ardi M. 1998. Linear viscoelastic properties of flour-water doughs at different water concentrations. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 74, 137-150.
- Pisookbuntern W, D'Appolonia BL. 1983. Bread staling studies. I: Effect of surfactants on moisture migration from crumb to crust and firmness values of bread crumb. *Cereal Chemistry*, 60, 298-300.
- Pomes AF. 1971. Zein. En: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Editado por Mark H. Wiley, Nueva York, EUA. Vol. 15, 125-132.
- Primo-Martín C, Valera R, Martínez-Anaya MA. 2003. Effect of pentosanase and oxidases on the characteristics of doughs and the glutenin macropolymer (GMP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4673-4679.
- Ragae S, Abdel-Aal EM. 2006. Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chemistry*, 95, 9-18.
- Rao P, Nussinovitch A, Chinachoti P. 1992. Effects of selected surfactants on amylopectin recrystallization and on recoverability of bread crumb during storage. *Cereal Chemistry*, 69, 613-618.

- Rasiah IA, Sutton KH, Low FL, Lin HM, Gerrard JA. 2005. Crosslinking of wheat dough protein by glucose oxidase and resulting effects on bread and croissants. *Food Chemistry*, 89, 325-332.
- Renzetti S, Dal Bello F, Arendt EK. 2008. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 48, 33-45.
- Renzetti S, Arendt EK. 2009a. Effects of oxidase and protease treatments on the breadmaking functionality of a range of gluten-free flours. *European Food Research and Technology*, 229, 307-317.
- Renzetti S, Arendt EK. 2009b. Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *Journal of Cereal Science*, 50, 22-28.
- Ribotta PD, Ausar SF, Morcillo MH, Pérez GT, Beltramo DM y León AE. 2004. Production of gluten-free bread using soybean flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1969-1974.
- Ribotta PD, Arnulphi SA, León AE, Añón MC. 2005. Effect of soybean addition on the rheological properties and breadmaking quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1889-1896.
- Ribotta PD, Le Bail A. 2007. Thermo-physical assessment of bread during staling. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 879-884.
- Ribotta PD, Colombo A, León AE, Añón MC. 2007. Effects of soy protein on physical and rheological properties of wheat starch. *Starch/Stärke*, 59, 614-623.
- Ribotta PD, Rosell, CM. 2010. Effects of enzymatic modification of soybean protein on the pasting and rheological profile of starch-protein system. *Starch/Stärke*, 62, 373-383.
- Roach RR, Hoseney RC. 1995. Effect of certain surfactants on the starch in bread. *Cereal Chemistry*, 72, 578-582.
- Rogers DE, Zeleznak KJ, Lai CS, Hoseney RC. 1988. Effect of native lipids, shortening and bread moisture on bread firming. *Cereal Chemistry*, 65, 398-401.

- Rojas JA, Rosell CM, Benedito de Barber C. 1999. Pasting properties of different wheat flour hydrocolloid systems. *Food Hydrocolloids*, 13, 27-33.
- Rolée A, Le Meste M. 1999. Effect of moisture content on the thermomechanical behavior of concentrated wheat starch-water preparations. *Cereal Chemistry*, 76, 452-458.
- Román-Brito JA, Agama-Acevedo E, Méndez-Montevalvo G, Bello-Pérez LA. 2007. Textural studies of stored corn tortillas with added xanthan gum. *Cereal Chemistry*, 84, 502-505.
- Ronda F, Oliete B, Gómez M, Caballero PA, Pando V. 2011. Rheological study of layer cake batters made with soybean protein isolate and different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 102, 272-277.
- Rosell CM, Wang J, Aja S, Bean S, Lookhart G. 2003. Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chemistry*, 80, 52-55.
- Rosell CM, Collar C, Haros M. 2007. Assessment of hydrocolloid effects on thermo-mechanical properties of wheat using the Mixolab. *Food Hydrocolloids*, 21, 452-462.
- Ryan KJ, Brewer MS. 2007. In situ examination of starch granule-soy protein and wheat protein interactions. *Food Chemistry*, 104, 619-629.
- Safari-Ardi M, Phan-Thien N. 1998. Stress relaxation and oscillatory tests to distinguish between doughs prepared from wheat flours of different varietal origin. *Cereal Chemistry*, 75, 80-84.
- Sajjan SU, Rao MRR. 1987. Effect of hydrocolloids on the rheological properties of wheat starch. *Carbohydrate Polymer*, 7, 395-402.
- Sánchez D, Tucková L, Sebo P, Michalak M, Whelan A, Sterzl I, Jelínková L, Havrdová E, Imramovská M, Benes Z, Krupicková S, Tlaskalová-Hogenová H. 2000. Occurrence of IgA and IgG autoantibodies to calreticulin in coeliac disease and various autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 15, 441-449.
- Sánchez HD, Osella CA, de la Torre MA. 2002. Optimization of gluten-free bread prepared from cornstarch, rice flour, and cassava starch. *Journal of Food Science*, 67, 416-419.

- Sánchez HD, Osella CA, de la Torre MA. 2004. Use of response surface methodology to optimize gluten-free bread fortified with soy flour and drink milk. *Food Science and Technology International*, 10, 5-9.
- Sandhu K, Singh N. 2007. Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. *Food Chemistry*, 101, 1499-1507.
- Sandhu K, Singh N, Malhi NS. 2007. Some properties of corn grain and their flours I: Physicochemical, functional and chapati-making properties of flour. *Food Chemistry*, 101, 938-946.
- Sandhu K, Kaura M, Singh N, Lima S-T. 2008. A comparison of native and oxidized normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1000-1010.
- Schober TJ, Messerschmidt M, Bean SR, Park S-H, Arendt EK. 2005. Gluten-free bread from sorghum: quality differences among hybrids. *Cereal Chemistry*, 82, 394-404.
- Schober TJ. 2009. Manufacture of gluten-free specialty breads and confectionery products. En: *Gluten-free food science and technology*. Editado por Gallagher E. Wiley-Blackwell, Oxford, Inglaterra. 130-180.
- Schoch TJ, French D. 1947. Studies on staling. *Cereal Chemistry*, 24, 231-249.
- Seguro K, Kumazawa Y, Kuraishi C, Sakamoto H, Motoki M. 1996. The epsilon-(gamma-glutamyl) lysine moiety in cross-linked casein is an available source of lysine for rats. *Journal of Nutrition*, 126, 2557-2562.
- Senti FR, Dimler RJ. 1960. Changes in starch and gluten during aging of bread. *Baker's Digest*, 34, 70-71.
- Sharadanant R, Khan K. 2003. Effect of hydrophilic gums on the quality of frozen dough: II. Bread characteristics. *Cereal Chemistry*, 80, 773-780.
- Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 433-441.

- Shibanuma K, Takeda Y, Hizukuri S, Shibata S. 1994. Molecular structures of some wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, 25, 111-116.
- Shih FF. 1994. Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties. *Journal of American Oil Chemical Society*, 7, 1281-1285.
- Shih FF. 2004. Rice proteins. En: *Rice Chemistry and Technology*. Tercera edición. Editado por Champagne ET. American Association of Cereal Chemist, St Paul, MN, EUA. 143-162.
- Shittu TA, Aminu RA, Abulude EO. 2009. Functional effects of xanthan gum on composite cassava-wheat dough and bread. *Food Hydrocolloids*, 23, 2254-2260.
- Singh H. 1991. Modification of food protein by covalent cross-linking. *Trends Food Science and Technology*, 8, 196-200.
- Sivaramakrishnan HP, Senge B, Chattopadhyay PK. 2004. Rheological properties of rice dough for making rice bread. *Journal of Food Engineering*, 62, 37-45.
- Sollid LM. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews, Immunology*, 2, 647-655.
- Sollid LM, Jabri B. 2005. Is celiac disease an autoimmune disorder? *Current Opinion in Immunology*, 17, 595-600.
- Sriroth K, Santisopasri V, Petchalanuwat C, Kurotjanawong K, Piyachomkwan K, Oates CG. 1999. Cassava starch granule structure- function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 38, 161-170.
- Stampfli I, Nersten B. 1995. Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry*, 52, 353-360.
- Stathopoulos C. 2008. Dairy-based ingredients. En: *Gluten-free cereal products and beverages*. Editado por Arendt E y Dal Bello F. Academic Press. Burlington, MA, EUA. 217-236.
- Steffe JF. 1996. Viscoelasticity. En: *Rheological methods in food processing engineering*. Segunda edición. Editado por Steffe JF. Freeman Press, East Lansing, EUA. 294-351.

- Sworn G, 2000. Xanthan gum. En: Handbook of hydrocolloids. Primera edición. Editado por Philip GO y Williams PA. Woodhead, Cambridge, Inglaterra. 103-115.
- Tamstorf S, Jonsson T, Krog N. 1986. The role of fats and emulsifiers in baked products. En: Chemistry and physics of baking. Editado por Blanshard J, Frazier P y Galliard T. The Royal Society of Chemistry, Inglaterra. 75-88.
- Tan Y, Corke H. 2002. Factor analysis of physicochemical properties of 63 rice varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 745-752.
- Tang C-H, Wu H, Chen Z, Yang X-Q. 2006. Formation and properties of glycinin-rich and β -conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. *Food Research International*, 39, 87-97.
- Thanh VH, Shibasaki K. 1977. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 490, 370-384.
- Thomas DJ, Atwell W. 1999. Starch structure. En: Practical guide for the food industry. Eagan Press Handbook Series, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EUA. 49-86.
- Tilley KA, Benjamin RE, Bagorogoza KE, Moses Okot-Kotber B, Prakash O, Kwen H. 2001. Tyrosine cross-links: Molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2627-2632.
- Torbica A, Hadnadev M, Tamara Dapčević T. 2010. Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloids*, 24, 626-632.
- Trius A, Sebranek JG. 1996. Carrageenans and their use in meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 69-85.
- Tronsmo KM, Magnus EM, Baardseth P, Schofield JD, Aamodt A, Færgestad EM. 2003. Comparison of small and large deformation rheological properties of wheat dough and gluten. *Cereal Chemistry*, 80, 587-595.
- Tu CC, Tsen CC. 1978. Effects of mixing and surfactants on microscopic structure of wheat glutenin. *Cereal Chemistry*, 55, 87-95.

- Utsumi S. 1992. Plant food protein engineering. En: *Advances in Food Nutrition Research*. Editado por Kinsella JE. Academic Press Inc., San Diego, CA, EUA. Vol. 36, 89-208.
- Utsumi S, Matsumura Y, Mori T. 1997. Structure-function relationships of soy proteins. En: *Food proteins and their applications*. Editado por Damodoran S y Paraf S. Marcel Dekker, Nueva York, EUA. 257-291.
- van de Velde F, van Riel J, Tromp RH. 2002. Visualisation of starch granule morphologies using confocal scanning laser microscopy (CSLM). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1528-1536.
- van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. 1998. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T-cell reactivity. *Journal of Immunology*, 161, 1585-1588.
- van Oort M, van Straaten F, Laane C. 1995. Pentosans and pentosanases in bread-making. *International Food Ingredients*, 2, 23-27.
- Vemulapalli V, Hoseney RC. 1998. Glucose oxidase effects on gluten and water soluble. *Cereal Chemistry*, 75, 859-862.
- Vemulapalli V, Miller KA, Hoseney RC. 1998. Glucose oxidase in breadmaking systems. *Cereal Chemistry*, 75, 439-442.
- Wang M-W, Oudgenoeg G, van Vliet T, Hamer RJ. 2003. Interaction of water unextractable solids with gluten protein: Effect on dough properties and gluten quality. *Journal of Cereal Science*, 38, 95-104.
- Wang M-W, van Vliet T, Hamer RJ. 2005. Interaction of water unextractable solids and xylanase with gluten protein: effect of wheat cultivar. *Journal of Cereal Science*, 41, 251-258.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. 1996. Functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 23, 1-18.
- Wellner N, Bianchini D, Mills ENC, Belton PS. 2003. Effect of selected hofmeister anions on the secondary structure and dynamics of wheat prolamins in gluten. *Cereal Chemistry*, 80, 596-600.

- Wellner N, Mills ENC, Brownsey G, Wilson RH, Brown N, Freeman J, Halford NG, Shewry PR, Belton PS. 2005. Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6, 255-261.
- Whistler R, Daniel J. 1984. Molecular structure of Starch. En: *Starch Chemistry and Technology*. Editado por Whistler R, BeMiller J y Paschal E. Academic Press Inc., Nueva York, EUA. 153-182.
- Wickramasinghe HAM, Takigawa S, Matsuura-Endo C, Yamauchi H, Noda T. 2009. Comparative analysis of starch properties of different root and tuber crops of Sri Lanka. *Food Chemistry*, 112, 98-103.
- Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115-119.
- Willhoft EMA. 1973. Mechanism and theory of staling of bread and baked goods, and associated changes in textural properties. *Journal of Texture Studies*, 4, 292-322.
- Xue J, Ngadi M. 2007. Thermal properties of batter systems formulated by combinations of different flours. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1459-1465.
- Yoshimura M, Takaya T, Nishinari K. 1998. Rheological studies on mixtures of corn starch and konjac-glucomannan. *Carbohydrate Polymers* 35, 11-19.
- Yoshino Y, Hayashi M, Seguchi M. 2005. Presence and amounts of starch granule surface proteins in various starches. *Cereal Chemistry*, 82, 739-742.
- Zelevnak KJ, Hoseney RC. 1986. The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chemistry*, 63, 407-411.
- Zobel HF, Senti FR. 1959. The bread staling problem. X-ray diffraction studies on breads containing a cross-linked starch and a heat-stable amylase. *Cereal Chemistry*, 36, 441-451.