



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

---

Trabajo de Tesis Doctoral

EFFECTO DE LAS ENZIMAS PENTOSANASA,  
GLUCOSA OXIDASA Y TRANSGLUTAMINASA EN  
PRODUCTOS DE PANIFICACIÓN

---

STEFFOLANI MARÍA EUGENIA  
Director Dr. Alberto E. León  
Codirector Dra. M. Cecilia Puppo

Año 2010

Steffolani, María Eugenia

Efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa en productos de panificación. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.  
E-Book.

ISBN 978-950-34-0803-2

1. Enzimas. 2. Tesis de doctorado. I. Título  
CDD 612.015 1

Fecha de catalogación: 16/11/2011

*A mis padres, mi esposo Martín y  
mi hijo Joaquín*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Dr. Alberto León por haber confiado en mí y darme la oportunidad de hacer el doctorado. Gracias por haberme dirigido y ayudado en el desarrollo de la tesis.*

*A la Dra. M. Cecilia Puppo por haberme ayudado y acompañado en cada viaje a la ciudad de La Plata. Por enseñarme y guiarme a pesar de las complicaciones de la distancia.*

*A la Dra. Gabriela Pérez y al Dr. Pablo Ribotta por su apoyo constante y por todo el tiempo y esfuerzo dedicado. Gracias por transmitirme sus conocimientos y colaborar en mi formación profesional.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado la beca que me permitió la realización de este trabajo.*

*A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba por haberme brindado un lugar de trabajo para el desarrollo de este estudio.*

*Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) de La Plata por haberme permitido desarrollar parte de mi trabajo en sus laboratorios.*

*Al Centro de Excelencia en Procesos y Productos Córdoba (CEPROCOR), que facilitó sus instalaciones y los equipos para realizar algunas de las determinaciones que formaron parte de este trabajo.*

*Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial de la ciudad de Córdoba por permitirme hacer las determinaciones de tamaño de partículas.*

*A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento a través del Préstamo PICT R 00286*

*A la acción CYTED por el financiamiento del Proyecto de Cooperación Internacional PANXTODOS. 106AC0301.*

*A los integrantes de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, que me permitieron ser parte del equipo de trabajo.*

*A mis amigas, Paola, Lorena, Cristina y Mariela por su generosidad, aliento, paciencia y ayuda desinteresada.*

*A mis amigas, Gabi y Male que de distintas formas estuvieron siempre presente contribuyendo en mi trabajo.*

*A Andrés y Alicia por su colaboración y apoyo.*

*A mis hermanos, por estar siempre, aconsejarme y escucharme.*

*A mis papas, por todo el sacrificio y esfuerzo que hicieron para que yo pueda llegar hasta esta instancia. Por todo el amor y el apoyo que me brindan siempre.*

*A mi esposo Martín y a mi hijo Joaquín por acompañarme, escucharme, aconsejarme y apoyarme durante todo este tiempo.*

---

INTRODUCCIÓN.....	8
1. GRANO DE TRIGO .....	11
2. HARINA DE TRIGO.....	12
2.1. Proteínas .....	13
2.1.1. <i>Gliadinas</i> .....	15
2.1.2. <i>Gluteninas</i> .....	17
2.1.3. <i>Macropolímero de gluteninas</i> .....	21
2.1.4. <i>Estructura del gluten</i> .....	22
2.2. Polisacáridos no almidonosos .....	25
2.3. Almidón.....	28
2.4. Lípidos .....	32
3. ELABORACIÓN DEL PAN .....	33
4. ENZIMAS.....	37
4.1. Pentosanasa.....	38
4.2. Glucosa Oxidasa .....	40
4.3. Transglutaminasa .....	42
5. OBJETIVO GENERAL.....	44
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
1. MATERIALES.....	47
2. MÉTODOS.....	47
2.1. Elaboración del pan.....	50
2.1.1. Formulación de la masa.....	50
2.1.2. Ensayos de Panificación.....	50
2.2. Determinación de la calidad del pan.....	52
2.2.1. Volumen específico del pan.....	52
2.2.2. Textura de la miga de pan .....	53
2.2.3. Estructura de la miga .....	54
2.2.4. Color de la corteza del pan .....	56
2.3. Determinación de las propiedades reológicas y estructurales de la masa .....	57
2.3.1. Ensayo farinográfico .....	57
2.3.2. Ensayos de extensión uniaxial y biaxial.....	58
2.3.3. Ensayo de Adhesividad de la masa.....	59
2.3.4. Análisis de perfil de textura de la masa .....	60
2.3.5. Ensayos de reología dinámica.....	61
2.3.6. Capacidad de expansión de la masa durante la fermentación .....	64
2.3.7. Microestructura de la masa.....	64
2.4. Caracterización química de los componentes de la masa .....	65
2.4.1. Preparación de masas liofilizadas .....	65
2.4.2. Determinación del contenido de pentosanos.....	65
2.4.3. Concentración de grupos sulfhidrilo libres ( <i>SHL</i> ).....	66
2.4.4. Obtención del macropolímero de gluteninas ( <i>GMP</i> ).....	67
2.4.5. Distribución de tamaño de partículas de <i>GMP</i> .....	67
2.4.6. Propiedades reológicas dinámicas del <i>GMP</i> .....	68

2.4.7. Proteínas del GMP.....	69
2.4.8. Proteínas de la masa.....	69
2.4.9. Electroforesis bajo condiciones reductoras.....	71
2.4.10. Cuantificación de fracciones proteicas en los geles.....	72
2.5. Sistemas modelo glutenina-enzima.....	72
2.5.1. Extracción de gluteninas.....	72
2.5.2. Incubación glutenina-enzima.....	73
2.5.3. Propiedades reológicas de mezclas gluten-enzima.....	73
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
PRIMERA SECCIÓN:.....	76
PENTOSANASA.....	76
1. Efecto de la enzima pentosanasa sobre la calidad del pan.....	77
2. Efecto de la enzima pentosanasa sobre las propiedades reológicas de la masa.....	80
3. Efecto de la enzima pentosanasa sobre la microestructura de la masa.....	86
4. Caracterización química de los componentes de la masa.....	88
4.1. Efecto de la enzima pentosanasa sobre los pentosanos de la masa.....	88
4.2. Efecto de la enzima pentosanasa sobre las proteínas de la masa.....	89
4.2.1. Determinación de la concentración de grupos sulfhidrilo libres ( <i>SHL</i> ).....	89
4.2.2. Macropolímero de gluteninas (GMP).....	90
4.2.3. Estudio de las distintas fracciones proteicas modificadas por la enzima pentosanasa.....	93
5. Análisis de las propiedades reológicas de mezclas de gluten - enzima.....	98
6. Análisis de correlación entre los distintos parámetros.....	100
SEGUNDA SECCIÓN:.....	102
GLUCOSA OXIDASA.....	102
1. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la calidad del pan.....	103
2. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre las propiedades reológicas de la masa... ..	106
3. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la microestructura de la masa.....	112
4. Caracterización química de los componentes de la masa. ....	113
4.1. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los pentosanos.....	113
4.2. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre las proteínas de la masa.....	114
4.2.1. Determinación de la concentración de grupos sulfhidrilo libres ( <i>SHL</i> ).....	114
4.2.2. Macropolímero de gluteninas (GMP).....	116
4.2.3. Estudio de las distintas fracciones proteicas modificadas por la enzima glucosa oxidasa.....	119
5. Análisis de correlación entre los distintos parámetros.....	124
TERCERA SECCIÓN:.....	126
TRANSGLUTAMINASA.....	126
1. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la calidad del pan.....	127
2. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre las propiedades reológicas de la masa.....	130
3. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la microestructura de la masa.....	136
4. Caracterización química de los componentes de la masa.....	137
4.1. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre los pentosanos.....	138

4.2. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre las proteínas .....	139
4.2.1. Determinación de la concentración de grupos sulfhidrilo libres ( <i>SHL</i> ) .....	139
4.2.2. Macropolímero de Gluteninas (GMP) .....	140
4.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida del GMP y de las proteínas solubles en SDS (FPS-SDS).....	141
4.2.4. Determinación del tamaño de partículas del GMP .....	143
4.2.5. Determinación de las propiedades reológicas del GMP .....	145
4.2.6. Sistemas modelo glutenina-transglutaminasa .....	148
4.2.7. Estudio de las distintas fracciones proteicas modificadas por la enzima transglutaminasa .....	150
5. Análisis de correlación entre los distintos parámetros.....	156
CUARTA SECCIÓN:.....	159
Efecto de las enzimas sobre la calidad de las masas y del pan obtenido a partir de masas congeladas .....	159
1. Efecto de las enzimas como aditivos sobre la calidad del pan.....	160
1.1. Efecto de las enzimas sobre el volumen específico del pan .....	161
1.2. Efecto de las enzimas sobre el color de la corteza de los panes .....	165
1.3. Efecto de las enzimas sobre la textura de la miga de pan .....	168
1.4 Efecto de las enzimas sobre la estructura de la miga de pan .....	171
2. Efecto de las enzimas sobre la calidad de masas congeladas .....	175
2.1. Efecto de las enzimas sobre la fermentación de las masas congeladas.....	175
2.2. Comportamiento reológico de las masas congeladas aplicando grandes deformaciones .....	177
2.2.1. Adhesividad de la masa.....	177
2.2.2. Extensibilidad de la masa .....	180
2.3. Comportamiento reológico de las masas congeladas aplicando pequeñas deformaciones .....	183
2.3.1. Reología dinámica de las masas .....	183
QUINTA SECCIÓN:.....	187
Uso de enzimas para optimizar la formulación del pan .....	187
1. Optimización de la formulación del pan, utilizando combinaciones de enzimas .....	188
1.1. Diseño experimental .....	189
2. Efecto de la combinación de enzimas sobre los parámetros de calidad del pan .....	191
3. Efecto de la combinación de enzimas sobre las propiedades de la masa de pan .....	203
4. Optimización .....	206
CONCLUSIONES GENERALES .....	208
BIBLIOGRAFÍA.....	215

# **INTRODUCCIÓN**

El arte de la panificación es una de las tecnologías más antiguas conocidas en la humanidad. Distintos hallazgos sugieren que los habitantes de Babilonia, Egipto, Grecia y Roma usaban el pan como parte de su dieta muchas décadas antes de Cristo (Matz 1995). Y aunque no se conocía de la misma forma que hoy en día, el pan ha sido por años un alimento popular clave, ocupando una posición de gran importancia en la nutrición internacional (Barrett 1975, Cauvain 2004).

Anualmente en Argentina se industrializan alrededor de 3,8 millones de toneladas de harina de trigo. El 86 % de la producción de harina de trigo del año 2006 tuvo como destino el mercado interno. El producto se industrializa y consume de diferente manera: 71,3 % para elaborar pan de panaderías artesanales, 8,6 % para pastas, 8,1 % para consumo como harina fraccionada y otros, 7,3 % para galletitas y bizcochos y 4,7 % para pan industrial (Lezcano 2006).

Las proteínas procedentes del trigo poseen menor valor nutritivo que las de origen animal debido a que son deficientes en lisina. Sin embargo el consumo de cereales es recomendable desde el punto de vista nutricional, ya que proporcionan a la dieta hidratos de carbono complejos, fibra dietética, minerales y vitaminas del complejo B y son de bajo contenido en grasa; por ello se incluyen en la primera y más ancha franja de la nueva pirámide nutricional.

La calidad panadera de una harina se determina por las propiedades del pan que se puede obtener a partir de ella, tales como volumen, terneza, esponjosidad. Existen además diversas determinaciones tradicionales: relación gluten húmedo/gluten seco, concentración de proteína, ensayos reológicos (alveograma, farinograma, extensograma, entre otros) que permiten predecir su comportamiento en la panificación posterior. De todas las determinaciones, la de volumen de pan a partir de una cierta cantidad de harina en condiciones estandarizadas es la que más certeza brinda sobre la aptitud de una harina.

Las harinas obtenidas de los trigos cultivados en Argentina difieren notablemente en calidad industrial, según la zona de procedencia del cereal. Estas diferencias de calidad tan marcadas se deben a diversas razones, genéticas y ambientales, interrelacionadas entre sí. En Argentina, las harinas que se comercializan se obtienen por mezcla de diferentes variedades de trigos hasta que

la harina resultante tenga valores de W aproximadamente constantes (Cuniberti 2004).

Una harina de trigo de buena calidad panadera no debería necesitar de aditivos para lograr un producto de buen volumen, textura y aspecto. Sin embargo, muchas veces se requiere del uso de aditivos de diverso tipo para mejorar el rendimiento de harinas de calidad inferior.

Continuamente los productores buscan alternativas tecnológicas y de formulación que permitan disminuir los costos de producción, teniendo en cuenta, al mismo tiempo, las transformaciones que ocurren año a año y que provocan la aparición de un gran número de patrones de consumo novedosos. Permanentemente se lanzan al mercado nuevos aditivos que tienden a mejorar la calidad y a aumentar el tiempo de conservación de los productos de panificación. La conservación de este tipo de productos es un problema que ha merecido atención y ha sido abordado de diferentes formas que involucran: cambios en la formulación, agregado de aditivos, aplicación de bajas temperaturas, uso de envases adecuados.

La obtención de productos panificados a partir de masas congeladas fue introducida en la producción alrededor de 1960. Los conocimientos científicos logrados hasta el momento pueden ser aplicados para favorecer la evolución de nuevos procesos de fabricación de masas para productos comerciales.

De lo expuesto surge claramente que la industria local, así como la de otras partes del mundo, se enfrenta con la necesidad de procesar trigos de diferente calidad y atender un mercado cada vez más exigente en cuanto a las especificaciones nutricionales, tecnológicas y relacionadas con la salud.

El bromato de potasio es un aditivo muy eficaz en los métodos de fermentación larga y fue muy utilizado en Argentina y en el Mercosur. Debido a su acción carcinógena fue prohibido y aún no se ha logrado un aditivo o mezcla de aditivos que reúna las virtudes para que sea capaz de reemplazarlo en forma eficiente y tengan un precio accesible para los productores pequeños. Para abordar esta problemática de interés para las industrias molinera y panificadora es indispensable conocer los mecanismos de acción de los aditivos que en forma

continúa se liberan al mercado. Actualmente para reemplazar al bromato de potasio se utilizan enzimas cuyos mecanismos de acción son desconocidos o confusos, existiendo en la bibliografía para varios de ellos diferentes hipótesis de acción.

Para comprender el efecto de los diferentes aditivos en el proceso de amasado y panificación, es necesario previamente conocer adecuadamente el sistema en estudio; el grano de trigo y sus componentes.

## 1. GRANO DE TRIGO

Existen muchos tipos de trigo, pero tres son los más importantes comercialmente. El trigo común o pan (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *aestivum*) es el más ampliamente cultivado y produce harinas de calidad superior para elaborar productos leudados; el trigo club (*Triticum Aestivum* (L) Thell. subesp. *compactum* (Host) MacKey) posee granos blandos y con bajo contenido de proteína, por lo que produce harinas aptas para elaborar ciertos tipos de bizcochuelos y galletitas donde se necesita un gluten débil; y el trigo duro (*Triticum Turgidum* (L) Thell. conv. *durum* (Desf.) MacKey) (MacKey 1975), que en nuestro país se denomina candeal, se utiliza principalmente para la producción de sémolas que se utilizan en la elaboración de pastas.

El grano de trigo, como en todos los cereales, está compuesto por: el salvado, el germen o embrión, y el endosperma. El salvado está formado por las capas más externas del grano y sus células tienen un alto contenido de celulosa y hemicelulosa. El germen es rico en grasas no saturadas y por esta razón es eliminado de la harina con el fin de evitar el enranciamiento. Por último, el endosperma cuyas células almacenan proteínas de reserva y energía en forma de almidón (Hoseney 1994a).

Las proteínas son uno de los componentes de mayor importancia; su concentración está influida por la relación entre el endosperma, el pericarpio y la capa de aleurona; por lo tanto, un aumento en el llenado del grano mediado por factores ambientales aumenta el contenido de almidón y altera esta relación disminuyendo la concentración de proteínas (Skovmand *et al.* 1984).

La composición del trigo puede variar según la zona y el año de cosecha. En la Tabla 1 se presenta el rango de variación de los principales componentes en la composición química del grano de trigo (Matz 1999).

**Tabla 1.** Composición química del grano entero de trigo.

Componentes	Composición química (%)*
Humedad	8,0 –18,0
Proteínas	7,0 – 18,0
Lípidos	1,5 – 2,0
Almidón	60,0- 68,0
Fibra Cruda	2,0 –2,5
Cenizas	1,5 – 2,0

\*Valores mínimos y máximos de cada componente en porcentaje

## 2. HARINA DE TRIGO

La harina de trigo blanca proviene del endosperma del grano. La composición química respecto del grano varía durante el proceso de molienda y la modificación más importante que se produce es la disminución del contenido proteico y un aumento en la concentración del almidón (Hoseney 1994d). La composición en base seca de una harina es aproximadamente un 70% de almidón, 9-18% de proteínas, 2% de lípidos y 2,5% de polisacáridos no almidonosos.

Las harinas de trigo y en menor grado las de centeno son las únicas que resultan panificables. Las propiedades únicas de la harina de trigo de formar una masa viscoelástica al ser mezclada con agua se deben a las características de las proteínas, gliadinas y gluteninas, presentes en el grano (Lindsay & Skerritt 1999, Shewry *et al.* 2001). Estas proteínas pueden absorber prácticamente dos veces su peso en agua y constituir una red deformable, elástica y extensible capaz de retener CO<sub>2</sub> durante la fermentación y posterior cocción. Por lo tanto, la calidad de la harina de trigo está determinada principalmente por la estructura molecular de

las proteínas presentes, y de ellas dependen las interacciones que se establecen durante la panificación. En el amasado se producen numerosas interacciones, no sólo entre las proteínas y el agua para formar la red de gluten sino también interacciones con otros componentes presentes en la harina: almidón, polisacáridos no almidonosos (arabinosilanos, arabinogalactanos) y lípidos (neutros y polares: fosfo y glicolípidos) (Carr *et al.* 1992, Bettge & Morris 2000, Lee *et al.* 2001). De todas las interacciones que se establecen resulta luego de la cocción un producto con características únicas, el pan.

## 2.1. Proteínas

Osborne (1907) fue el primero en separar sistemáticamente las proteínas del trigo en cuatro fracciones. Él definió cuatro fracciones de las proteínas del trigo basándose en las diferencias de solubilidad: así llamó *albúminas* a las proteínas solubles en agua, *globulinas* a las proteínas solubles en soluciones salinas diluidas, *gliadinas* a las solubles en alcohol y *gluteninas* a las solubles en soluciones ácidas o básicas diluidas.

Chen y Bushuk (1970) revelaron que sólo una parte de las gluteninas son solubles en ácido acético diluido, y así diferenciaron dos fracciones proteicas: una soluble y una insoluble. Posteriormente, Orth y Bushuk (1972) encontraron una correlación positiva entre la cantidad de gluteninas insolubles en ácido acético y el volumen de pan, por lo que ésta fracción se transformó en la clave para explicar diferencias en la fuerza de la masa y en la calidad panadera (Khan & Bushuk 1979). El uso de detergentes (Graveland 1980) y solventes orgánicos permitió una mejor separación concluyendo que la insolubilidad de las proteínas era debido al tamaño y al alto grado de polimerización de los agregados proteicos. Actualmente, dos métodos principales son utilizados para cuantificar y caracterizar esta fracción. En uno de los métodos, esta fracción corresponde a proteínas poliméricas no extraíble con isopropanol (UPP), que posteriormente mediante sonicación se solubilizan en SDS y pueden ser analizadas por cromatografía de exclusión molecular (Gupta *et al.* 1993). El otro método es el desarrollado por Graveland *et*

*al.* (1980), en el que se obtiene un gel de proteínas insolubles luego de una extracción de proteínas de la harina con dodecil sulfato de sodio (SDS) y una centrifugación a elevada velocidad. Este gel de proteínas fue denominada posteriormente como macropolímero de gluteninas (GMP) (Weegels *et al.* 1996).

Existen otros procedimientos de solubilización de las proteínas del trigo de alto peso molecular, con tris-(hidroximetil)-aminometano/ácido clorídrico (TRIS/HCl), buffer fosfato/dodecil sulfato de sodio (Graveland *et al.* 1979, Bottomley *et al.* 1982, Ng & Bushuk 1987, Larroque *et al.* 2000). Todos estos procedimientos de fraccionamiento conducen a un solapamiento de las distintas fracciones.

En un principio, Finney y Barmore (1948) observaron una correlación positiva entre el contenido de proteínas de la harina de trigo y el volumen de pan. Posteriormente se observó que el volumen de pan depende mayormente de la calidad de las proteínas de la harina que de la cantidad en sí. La calidad proteica se refiere no sólo al tipo de proteínas identificadas según Osborne, sino también a la influencia de cada fracción en la funcionalidad de la masa, y consecuentemente, en la calidad del pan. En base a estos hechos, se utiliza más frecuentemente otra clasificación de las proteínas de la harina de trigo: *proteínas que no forman gluten* y *proteínas formadoras de gluten*.

**Las proteínas que no forman gluten** representan entre un 15 -20% del total de las proteínas del trigo, son solubles en soluciones salinas diluidas por lo tanto corresponden a las albúminas y globulinas del fraccionamiento de Osborne. Son proteínas monoméricas, metabólicamente activas y/o estructurales que se ubican en las capas más externas del grano de trigo. Su función en la panificación no está clara aún (Veraverbeke & Delcour 2002). Estas proteínas poseen un buen balance de aminoácidos, contienen proporciones relativamente altas de lisina, triptofano y metionina; tres aminoácidos que se encuentran en baja proporción en la mayoría de los cereales. La fracción de albúminas y globulinas incluye las proteínas solubles en cloroformo - metanol (CM-proteínas), enzimas, albúminas de alta masa molecular (HMW-albúminas), proteínas “triples” y otras proteínas que no son de almacenamiento. Las CM-proteínas poseen masas moleculares entre

11000-13000, y una composición de aminoácidos única con altos valores de lisina y aminoácidos no polares. Las proteínas “triples” o “triticins” son proteínas menores del endosperma depositadas en cuerpos proteicos que aparecen en las electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como un triplete de bandas de alto peso molecular (HMW) en fracciones no reducidas. Por reducción se obtienen cuatro subunidades de 58000, 52000, 23000 y 22000 de masa molecular (Singh *et al.* 1991). Mediante el fraccionamiento de las albúminas de harina de trigo por SDS-PAGE aparecen numerosos componentes proteicos. La mayoría de estas proteínas se pueden dividir en dos grupos: HMW-albúminas, y LMW-albúminas con un peso molecular aproximado de 60000 y de 14000 - 16000, respectivamente (Pogna *et al.* 1994).

**Las proteínas formadoras de gluten** se denominan también proteínas de almacenamiento (Kasarda *et al.* 1976), representan entre un 80 - 85% del total de las proteínas del trigo y sirven como fuente de nitrógeno durante la germinación de la semilla (Ng & Bushuk 1987, Larroque *et al.* 2000). Se encuentran en el endosperma del grano de trigo maduro donde forman una matriz continua alrededor de los gránulos de almidón. Las proteínas del gluten son insolubles en agua o en soluciones salinas diluidas y pueden ser divididas en dos grupos de acuerdo a su funcionalidad: las gliadinas monoméricas y las gluteninas poliméricas (extraíbles o no extraíbles). La composición de aminoácidos de las gliadinas y de las gluteninas es similar, se caracterizan por tener altas concentraciones de glutamina (un tercio o más del residuo total de aminoácidos) y de prolina (una séptima parte o más del residuo total de aminoácidos). Se considera en general que las gliadinas son las responsables de la viscosidad del gluten, mientras que las gluteninas son las encargadas de conferirle fuerza y elasticidad (Hoseney 1994b).

### **2.1.1. Gliadinas**

Como se mencionó anteriormente, las gliadinas son mayormente proteínas monoméricas ricas en glutamina y prolina, y además poseen un bajo nivel de

aminoácidos cargados. Constituyen un tercio de las proteínas de la harina (Lindahl 1990) y son clasificadas en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas en base a su movilidad en electroforesis a pH ácido (Shewry *et al.* 1986). Estas proteínas poseen una masa molecular entre 30000 - 80000 y están formadas por un dominio no repetitivo rico en estructura secundaria  $\alpha$ -hélice y por un dominio repetitivo heterogéneo rico en estructura  $\beta$ -turn (Tatham & Shewry 1985).

Comparaciones del genoma y de las secuencias de amino ácidos muestran que las  $\alpha$ - y  $\beta$ -gliadinas están estrechamente relacionadas y se suele referir a ambas como gliadinas tipo- $\alpha$ . Las  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas son estructuralmente distintas (Shewry & Tatham 1990). Las  $\alpha$ - y  $\gamma$ -gliadinas son proteínas monoméricas y consisten de 250 a 300 residuos de amino ácidos. Poseen un dominio N-terminal repetitivo que representa entre 1/3 y 1/2 de la secuencia de la proteína, que es rica en residuos de prolina y glutamina, y un dominio C-terminal no repetitivo que posee residuos de cisteínas (Shewry & Tatham 1990). Las  $\omega$ -gliadinas están formadas por aproximadamente 350 residuos de aminoácidos y contienen repeticiones sucesivas de un octapeptido (Pro.Gln.Gln.Pro.Phe.Pro.Gln.Gln) y no contienen residuos de cisteína, por lo que están limitadas para formar interacciones covalentes en la masa (Tatham 1995). Las  $\gamma$ -gliadinas poseen ocho residuos de cisteínas que se encuentran localizados en el dominio C-terminal y forman cuatro enlaces disulfuro intramoleculares, por lo que no son capaces de formar nuevos enlaces covalentes con otras proteínas del gluten. Las  $\alpha$ -gliadinas poseen seis residuos de cisteínas igualmente ubicados como en las  $\gamma$ -gliadinas que forman tres enlaces disulfuro también intermolecularmente. Sin embargo, estos enlaces disulfuro son importantes para retener el plegado de la estructura de las gliadinas que determina la naturaleza de las interacciones no covalentes con la red de gluteninas (Wrigley *et al.* 1998). Las fracciones de mayor masa molecular (entre 100000 y 200000) están compuestas de subunidades más pequeñas (Bietz & Wall 1980). Las gliadinas fueron modeladas como estructuras elípticas con conformaciones extendidas mediante difracción de rayos-X a pequeño ángulo y diámetros de aproximadamente 3,2 nm (Thomson *et al.* 1999). Las gliadinas pueden también ser separadas por su hidrofobicidad mediante cromatografía

líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC): las  $\gamma$ -gliadinas son el grupo más hidrofóbico (Wieser *et al.* 1987). Algunos investigadores proponen que son las responsables de la cohesividad de las masas (Hoseney 1994b), aunque otros sugieren que controlan el potencial de volumen de pan (Khatkar *et al.* 2002), por lo que cobra interés el estudio de la composición y la estructura de esta fracción proteica.

### **2.1.2. Gluteninas**

Las *gluteninas* se encuentran formando agregados proteicos unidos por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes intermoleculares. Su masa molecular varía desde 500000 a más de 10 millones (Wieser *et al.* 2006). Luego de la reducción de los puentes disulfuros las subunidades de gluteninas resultantes poseen una solubilidad en alcohol similar a las gliadinas y pueden ser divididas en dos tipos: las subunidades de alta masa molecular (HMW-GS) y las subunidades de baja masa molecular (LMW-GS) (Shewry *et al.* 1992).

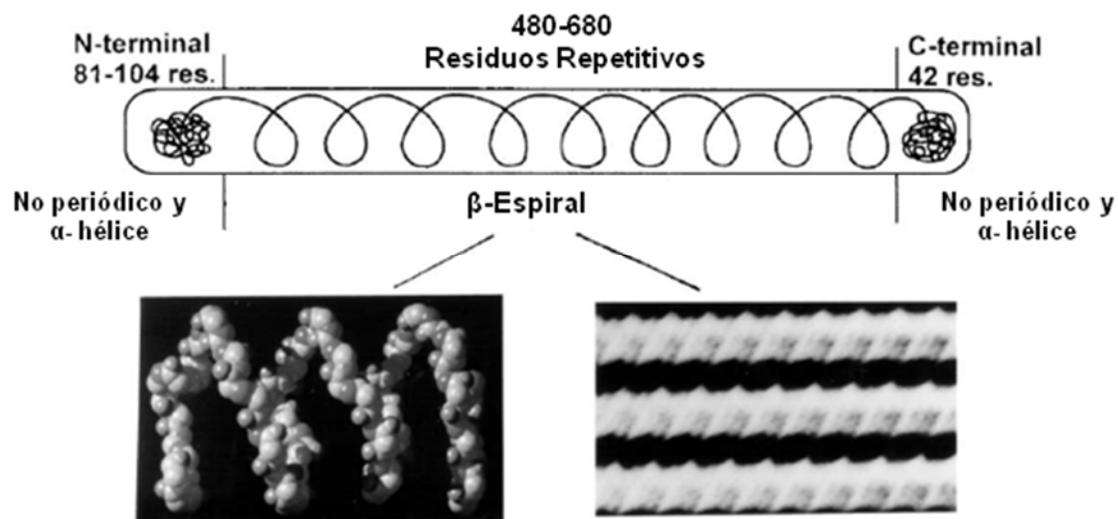
En un principio, las gluteninas fueron clasificadas en tres grupos (A, B y C) de acuerdo a su movilidad en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE): en el primer grupo (A) se encuentran las HMG-GS con masas moleculares entre 95000 - 136000 y en el segundo y tercer grupo (B y C) se encuentran las LMW-GS con masas moleculares entre 42000 - 51000 y 31500 - 35500, respectivamente (Payne & Corfield 1979). Posteriormente, Jackson *et al.* (1983) observaron (también de acuerdo a su movilidad electroforética) que las LMW-GS podían dividirse en tres grupos, por lo que adicionó un grupo más al que denominó grupo D.

LMW-GS son un grupo complejo de proteínas que poseen la habilidad de formar enlaces disulfuro que permiten su incorporación dentro de los polímeros de gluteninas. La mayoría de las LMW-GS contienen entre siete y ocho residuos de cisteínas (Grosch & Wieser 1999, Wieser 2003), seis residuos están en una posición homóloga a las gliadinas, y por lo tanto formarían puentes disulfuro

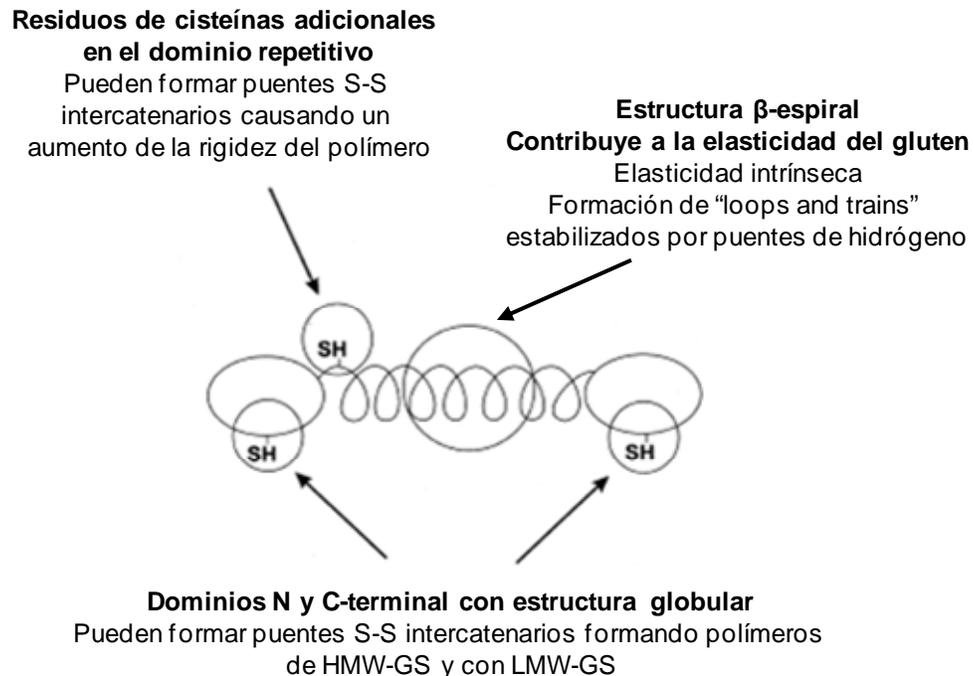
intramoleculares. Los residuos de cisteínas adicionales no son capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares, probablemente por impedimento estérico, por lo que formarían puentes disulfuro intermoleculares formando agregados proteicos entre ellas y con HMW-GS (Pogna *et al.* 1994). En general las LMW-GS tipo-B actúan como extensores de las cadenas poliméricas crecientes ya que pueden formar dos puentes disulfuro intermoleculares, mientras que la mayor parte de las LMW-GS tipo C y D actúan como terminadores de las cadenas poliméricas crecientes ya que solo poseen una cisteína disponible para formar un puente disulfuro intermolecular (Kasarda 1989). Muy poco se conoce sobre la estructura de LMW-GS. Tatham *et al.* (1987) propusieron que en el dominio N-terminal se encuentran distribuidas irregularmente estructuras secundarias  $\beta$ -turn, mientras que en el dominios C-terminal predomina la estructura  $\alpha$ -hélice. Lindsay y Skerrit (2000) basado en imágenes de microscopia electrónica de transmisión determinaron que las LMW-GS forman estructuras agrupadas discretas, pero no fue posible determinar si esas asociaciones son covalentes o no covalentes. Aunque HMW-GS son el grupo principal de proteínas del gluten que determinan las características panaderas de la masa, LMW-GS también cumplen un importante rol. En general, LMW-GS se relacionan con la resistencia y la extensibilidad de la masa (Metakovskii *et al.* 1990, Andrews *et al.* 1994, Cornish *et al.* 2001) e incluso algunas formas alélicas causan mayores efectos sobre las propiedades de la masa que las HMW-GS (Payne *et al.* 1987, Gupta *et al.* 1989, 1994).

Las subunidades de gluteninas de alta masa molecular (HMW-GS) presentan fuertes similitudes estructurales entre ellas, pero también diferencias características. Una de las diferencias es el comportamiento en la polimerización y se relaciona con el número de grupos sulhidrilo. En base a esta diferenciación, HMW-GS son clasificadas en dos subgrupos: subunidades tipo-x y tipo-y. El dominio N-terminal de las subunidades tipo-x contienen cuatro residuos de cisteínas y el dominio N-terminal de las subunidades tipo-y contienen cinco residuos de cisteínas. Además, las subunidades tipo-x tienen una menor movilidad electroforética que las subunidades tipo-y (Tatham 1995).

En la Figura 1 se muestra un modelo estructural basado en datos espectroscópicos detallados por Shewry *et al.* (2001). Los estudios muestran a las subunidades de gluteninas de alto peso molecular, como moléculas alargadas que posee una estructura  $\beta$ -espiral en la región central repetitiva. Mientras que los dominios N- y C-terminal poseen una estructura similar a las proteínas globulares, presentado  $\alpha$ -hélices y estructura desordenada (Figura 2). En los dominios terminales se encuentran la mayoría de los residuos de cisteínas que proveen de los sitios para la formación de puentes disulfuros intermoleculares. La estructura  $\beta$ -espiral de la región central presenta elasticidad intrínseca, pero la contribución a las propiedades elastoméricas del polímero no está dilucidada aún.



**Figura 1.** Modelo estructural de una subunidad de glutenina de alto peso molecular (HMW-GS) basado en estudios predictivos, espectroscópicos e hidrodinámicos (Shewry *et al.* 2001).



**Figura 2.** Resumen de los conocimientos estructurales de las HMW-GS que pueden determinar la elasticidad del gluten y de la masa (Shewry *et al.* 2001).

Don *et al.* (2003c) postularon como hipótesis que la fracción de proteínas insolubles (principalmente HMW-GS) son partículas con tamaños típicos de entre 5–30 nm. Estas partículas están relacionadas con los cuerpos proteicos en el trigo, por lo que describen en su trabajo al gluten como un sistema particulado. Esta hipótesis es consistente con las conclusiones de Lefebvre *et al.* (2003). Lefebvre y van Vliet (2003) asumieron que la insolubilidad de las gluteninas se debe a que el agua es un "mal solvente", por lo que los polímeros de glutenina no serían cadenas entrelazadas si no partículas coloidales formadas por el colapso concatenario. Según la sentencia de Flory, que el agua sea un "mal solvente" indica que la insolubilidad de las partículas en el agua se debe a interacciones débiles proteína - solvente. Sin embargo esto es erróneo según lo publicado por Shewry *et al.* (2003), ya que postularon que la baja solubilidad de las gluteninas se debe a las fuertes interacciones proteína - proteína entre las proteínas del gluten y no a las débiles interacciones proteína - solvente. Según Belton (2005), no hay una fuerte evidencia para sostener la hipótesis de que las gluteninas son

partículas, ya que en las determinaciones espectroscópicas realizadas por Don *et al.* (2003a,b,c) las proteínas fueron dispersadas en una solución de SDS al 1,5% antes de determinar sus características. El SDS es un poderoso detergente y su función comercial es suspender material por lo que no sorprende que las gluteninas luego de ser tratadas con SDS se observen como partículas en suspensión (Belton 2005).

### **2.1.3. Macropolímero de gluteninas**

Parte de las gluteninas poliméricas pueden ser separadas como una capa de gel insoluble en SDS llamado macropolímero de gluteninas (GMP). El GMP está compuesto de agregados proteicos de gran tamaño formados por gluteninas de alto y bajo peso molecular (HMW-GS y LMW-GS) (Don *et al.* 2003a). Weegels *et al.* (1996, 1997) estudiaron esta fracción en detalle, y presentaron firme evidencia de una alta correlación positiva entre la cantidad de GMP de la harina y el volumen de pan. Pritchard (1993) sugirió que el módulo elástico ( $G'$ ) del gel de proteínas (GMP) puede ser utilizado como un indicador de la calidad de la harina. Cornec *et al.* (1994) y Lefebvre *et al.* (2000) mostraron una correlación positiva entre el tamaño de los agregados insolubles de gluteninas y la elasticidad de la masa. El GMP producido a partir de la harina es diferente al obtenido a partir de la masa. Durante el amasado el contenido de GMP disminuye debido a una depolimerización del mismo. Durante el reposo se restablecen las interacciones y el GMP es re-polimerizado (Weegels *et al.* 1996, 1997).

Varios modelos, basados principalmente en la habilidad de las subunidades en formar puentes disulfuro intermoleculares, han sido propuestos para la estructura del GMP, pero no se ha logrado consenso aún. Hamer y van Vliet (2000) propusieron que el GMP es un gel formado tanto por interacciones físicas como químicas. Don *et al.* (2003a,b,c) afirmaron que el GMP está compuesto por partículas esféricas de gluteninas de distintos tamaños. Estos autores postulan que el tamaño de las partículas de gluteninas determina la energía requerida en el amasado para el óptimo desarrollo de la masa. El amasado modifica la forma y el

tamaño de las partículas de gluteninas afectando sus propiedades físicas. Como se mencionó anteriormente, Belton (2005) sostiene que las HMW-GS no son partículas, si no que componen una red enramada y físicamente entrecruzada.

#### **2.1.4. Estructura del gluten**

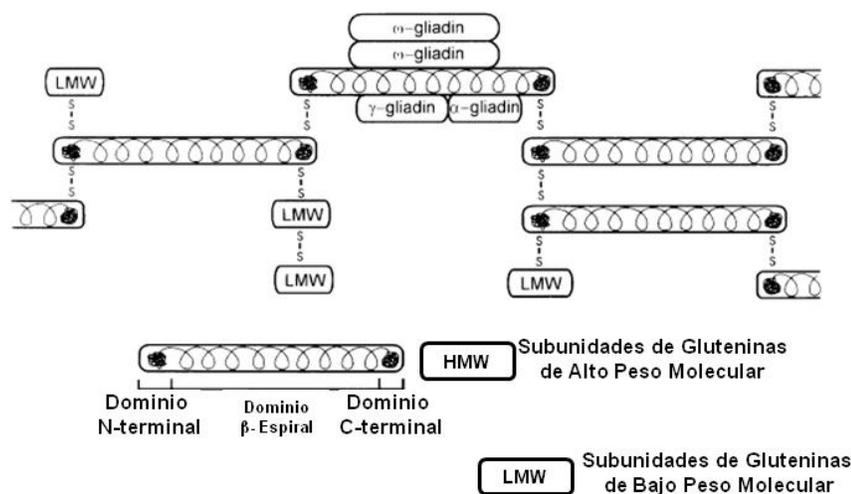
Las proteínas que integran el gluten se encuentran localizadas en cuerpos proteicos en el endosperma del grano; durante el amasado se produce la ruptura de estos cuerpos y su hidratación, formando una red tridimensional continua en donde se encuentra embebido el almidón. Las interacciones de tipo covalentes y no covalentes entre los polipéptidos más grandes que forman la masa producen una matriz elástica y extensible. El gluten es una mezcla compleja de proteínas que varían en su proporción, estructura y propiedades.

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre la estructura de las proteínas del gluten y la base molecular existente, su rol en el procesamiento del pan aún no es totalmente comprendido (Shewry *et al.* 2001). Como ya se mencionó anteriormente, las subunidades de glutenina de alto peso molecular están presentes en forma de polímeros (macropolímero de gluteninas). La importancia de tales polímeros en determinar la viscoelasticidad del gluten ha sido apreciada durante muchos años, aunque su tamaño, complejidad y baja solubilidad limita el estudio detallado. La importancia de los puentes disulfuro en estabilizar estos polímeros ha sido extensamente demostrada. Hay evidencia de la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre gluteninas de alto peso molecular, y de estas con LMW-GS (Shewry & Thatham 1997, Kasarda 1999). Los enlaces disulfuro son entonces considerados esenciales para la viscoelasticidad del gluten.

La composición de aminoácidos de las proteínas del gluten muestra que aproximadamente la mitad de los constituyentes son glutamina y prolina, por lo que se supone que hay gran cantidad de puentes de hidrógeno en el sistema. Otro aporte importante son las interacciones hidrofóbicas, ya que aproximadamente el

35% de los aminoácidos poseen cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica (Hoseney 1994c).

En la Figura 3 se presenta un esquema de la estructura del gluten (Shewry *et al.* 2001) en el cual las gluteninas de alto peso molecular forman la columna vertebral del polímero, estas HMW-GS se encuentran unidas entre sí a través de puentes disulfuro intermoleculares ubicados en los extremos. Esta columna vertebral de gluteninas de alto peso molecular sirve de base para que se unan a ella las subunidades de bajo peso molecular (LMW-GS) mediante puentes disulfuro formando puntos de ramificación. Las gliadinas, consideradas tradicionalmente por contribuir a la viscosidad del gluten, interactúan principalmente con los polímeros de gluteninas mediante interacciones no covalentes. En el dominio central de las HMW-GS ocurren fuertes interacciones puentes de hidrógeno probablemente entre las amidas de los residuos de glutamina. Estas interacciones son muy importantes porque contribuyen a la viscoelasticidad de la masa (Ewart 1989, Jeffrey & Saenger 1994, Belton 1999).

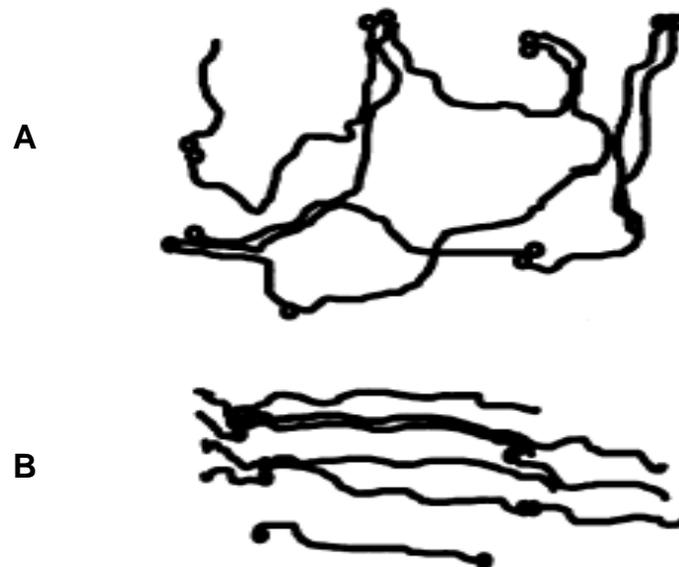


**Figura 3.** Esquema general de la estructura de la red de gluten.

Popineau *et al.* (1994) demostraron que en el gluten las cadenas de los polímeros de gluteninas forman estructuras β-sheet alineadas en una red extendida de puentes de hidrógeno. Posteriormente, Belton (1999) propuso un

modelo para explicar la elasticidad del gluten (Figura 4). Este investigador describe al gluten formado por una estructura de bucles y colas, “loop and train”, regiones donde existen interacciones polímero - solvente y regiones con interacciones polímero - polímero, respectivamente (Figura 4A). En este modelo las proteínas del gluten están estabilizadas por interacciones no covalentes entre moléculas paralelas. HMW-GS inicialmente presentan una conformación en forma de bucle (loop) que son extendidas durante la extensión del gluten para formar polímeros alineados en los cuales la formación de altas proporciones de estructuras  $\beta$ -sheet se encuentra favorecida. Por esta razón tales polímeros son altamente resistentes a la extensión. El estiramiento de los polímeros (Figura 4B) produce primero la deformación de los bucles (“loops”) y posteriormente de las colas (“train”), a la vez que se rompen las interacciones no covalentes. Durante la extensión, los puentes disulfuro se rompen y se restablecen derivando en una red alineada en dirección a la extensión. Sin embargo, puede producirse la restauración del equilibrio de bucles y colas espontáneamente, resultando en la relajación de la estructura del polímero. Estos modelos estructurales fueron extensamente relacionados con la viscoelasticidad del gluten y con la estabilidad de los polímeros (Belton 2005, Wellner *et al.* 2005). Wellner *et al.* (2005) postularon que en algunos casos la extensión no resultaría en alineamientos favorables y por lo que la relajación de las conformaciones de los bucles ( $\beta$ -turn) sería más rápida dependiendo del tamaño del polímero. Mediante microscopía atómica se demostró que las moléculas de HMW-GS se alinean para formar un gran polímero ramificado previamente a la formación de puentes disulfuro, sugiriendo en parte que la habilidad de formar puentes disulfuro está direccionada por las interacciones no covalentes (Humphris *et al.* 2000). Previamente, Pèzolet *et al.* (1992) ya habían sugerido que la elasticidad del gluten resultaría de interacciones intermoleculares que involucran estructuras  $\beta$ -sheet. Sin embargo, Belton *et al.* (1995) postularon que los puentes disulfuro pueden incrementar la probabilidad de la formación de interacciones intermoleculares. Más tarde, Shewry *et al.* (2003) observaron que el número y el patrón de puentes disulfuro en los polímeros de gluteninas del trigo afectan la fuerza de la masa. Por lo tanto,

estructuras  $\beta$ -sheet y puentes disulfuro contribuyen a la estabilización de los polímeros como fue propuesto por Belton (2005).



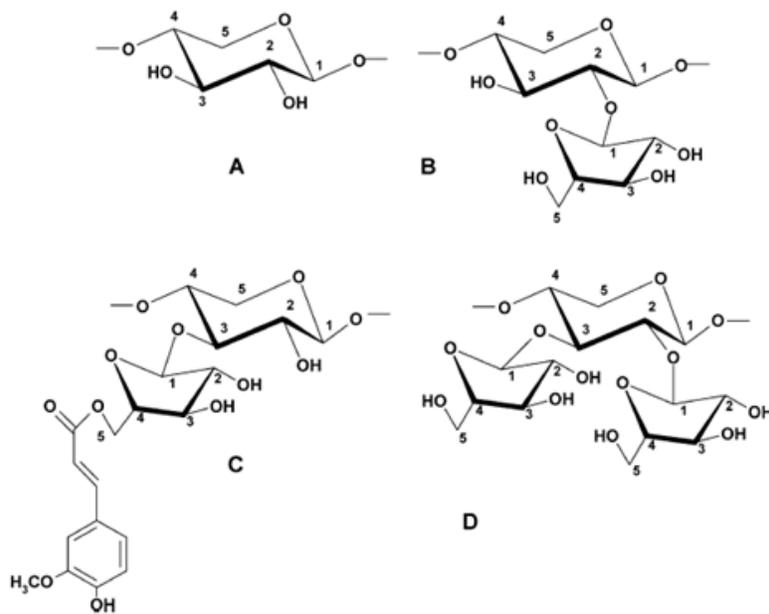
**Figura 4.** Modelo estructural del ordenamiento de las gluteninas antes (A) y después (B) de la extensión. ● Representan regiones de uniones puentes disulfuro.

## 2.2. Polisacáridos no almidonosos

En el grano existen polisacáridos no almidonosos denominados pentosanos (básicamente arabinosilanos y arabinogalactanos) que tienen influencia tanto en la molienda del grano como en el proceso posterior de panificación. Los pentosanos pueden dividirse en solubles en agua (PS) y pentosanos insolubles en agua (PI), comprenden, respectivamente, el 25 y 75% del total de estas sustancias presentes en la harina de trigo (Meuser & Suckow 1986). Su estructura y su aspecto resultan en propiedades fisicoquímicas únicas que afectan fuertemente su funcionalidad en la panificación.

Los arabinosilanos (Figura 5) son residuos de D-xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 que están sustituidas en el carbono tres (C(O)-3) y/o en el carbono dos

(C(O)-2) por monómeros de L-arabinosa (Perlin 1951a,b), por lo que la relación arabinosa / xilosa es variable. Pueden tener ácido ferúlico unido al carbono cinco (C(O)-5) de la L-arabinosa mediante una unión tipo ester (Fausch *et al.* 1963).



**Figura 5.** Elementos estructurales de los arabinoxilanos. (A) Residuo de D-Xilosa no sustituida. (B) Residuo de D-Xilosa sustituida en el C(O)-2 con un residuo de D-arabinosa. (C) Residuo de D-Xilosa sustituida en el C(O)-3 con un residuo de D-arabinosa que tiene unido al C(O)-5 una molécula de ácido ferúlico. (D) Residuo de D-Xilosa sustituida en el C(O)-2 y C(O)-3 con residuos de D-arabinosa.

La diferencia estructural entre arabinoxilanos solubles en agua y los insolubles en agua radica principalmente en el peso molecular (Meuser & Suckow 1986) y en la relación arabinosa / xilosa (Gruppen *et al.* 1993).

La habilidad de los pentosanos para retener agua y formar soluciones viscosas o geles por uniones covalentes probablemente afecte la distribución de la humedad entre los constituyentes de la masa, alterando la formación del gluten y las propiedades reológicas de la masa (Kim & D'Appolonia 1977a).

Bajo condiciones oxidativas, los arabinoxilanos solubles en agua pueden formar geles mediante el establecimiento de enlaces covalentes entre residuos de

ácido ferúlico (Vinkx *et al.* 1991, Figueroa-Espinoza & Rouau 1998). Los arabinosilanos insolubles en agua poseen una alta capacidad de retener agua. Esta propiedad es igualmente atribuida a los arabinosilanos solubles en agua. Se ha estimado que durante la preparación de la masa, un cuarto (1/4) del agua agregada es retenida por los arabinosilanos (Atwell 1998).

El ácido ferúlico de los arabinosilanos también está involucrado en la formación de enlaces con los residuos de cisteínas de las proteínas del gluten. Asimismo, la presencia de oxidantes que generan radicales libres como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puede provocar una reacción entre el grupo fenol de la tirosina del gluten y el ácido ferúlico de los arabinosilanos y formar complejos proteína-arabinosilanos (Stauffer 2007).

Durante el proceso de panificación, los arabinosilanos insolubles en agua causan un impacto negativo ya que actúan limitando la agregación del gluten debido a impedimentos estéricos (van Oort *et al.* 1995), absorben una gran cantidad de agua que deja de estar disponible para el desarrollo del gluten y causan la coalescencia de las celdas de gas resultando en una pobre calidad del pan (Courtin *et al.* 1999, Courtin & Delcour 2002).

Por el contrario los arabinosilanos solubles en agua, causan un impacto positivo porque actúan disminuyendo la velocidad de difusión del CO<sub>2</sub> en la masa estabilizando las celdas de gas. Además, incrementan la viscosidad de la fase acuosa de la masa aumentando su estabilidad e incluso mejoran las características del pan: como el volumen de pan y la firmeza y estructura de la miga (Hoseney 1984, Gan *et al.* 1995).

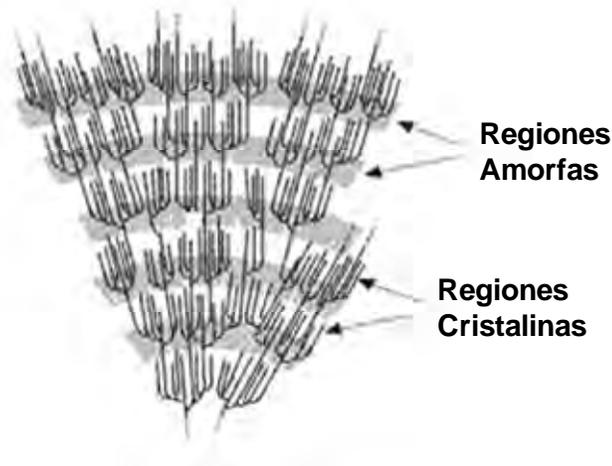
Por último, la presencia de arabinosilanos puede interferir estéricamente en las asociaciones intermoleculares del almidón disminuyendo la retrogradación (Kim & D'Appolonia 1977a,b). Aunque otros autores atribuyen principalmente el efecto de los arabinosilanos sobre el envejecimiento del pan, a su incidencia sobre la redistribución del agua en la masa (Gudmundsson *et al.* 1991, Eliasson & Larsson 1993a, Biliaderis *et al.* 1995).

### **2.3. Almidón**

Los granos de cereales almacenan energía en forma de almidón. El almidón se acumula en gránulos que se sintetizan dentro de los amiloplastos. Los gránulos de almidón en la harina de trigo y de otros cereales muestran una distribución de tamaño bimodal, los gránulos más pequeños (tipo-B) son esféricos con un diámetro menor a 10  $\mu\text{m}$ , en tanto que los grandes (tipo-A) son lenticulares con un diámetro cercano a 20  $\mu\text{m}$ . El interior de los gránulos está formado por regiones cristalinas y amorfas alternadas, por lo que el almidón es descrito como un polímero semicristalino o parcialmente cristalino (Eliasson & Gudmundsson 1996).

El almidón, componente y por consiguiente carbohidrato mayoritario de la harina de trigo es una macromolécula que está compuesta por dos fracciones: la *amilosa* y la *amilopectina*. La amilosa es definida como una molécula esencialmente lineal, compuesta por 500-6000 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4), con escasos puntos de ramificación formados por enlaces  $\alpha$ -(1-6) (Shibanuma *et al.* 1994); y la amilopectina está formada por una cadena central similar a la de la amilosa pero posee ramificaciones con enlaces  $\alpha$ (1-6) cada 9 a 20 unidades de D-glucosa (Whistler & Daniel 1984). El enlace  $\alpha$ -1,4 imparte a la molécula un giro natural, con lo que la conformación de las cadenas es helicoidal (Greenwood 1976). Dentro del gránulo se puede diferenciar una zona con cierto grado de cristalinidad debido a regiones ordenadas de cadenas de amilopectina y una zona amorfa compuesta principalmente por las regiones ramificadas de la amilopectina y las cadenas de amilosa (Figura 6).

Una fracción significativa de los gránulos de almidón (aproximadamente 8%) es dañado durante la molienda. Este daño mecánico de los gránulos generalmente afecta las propiedades del almidón. El almidón dañado tiene pérdida de la birefringencia, alta absorción de agua y es más susceptible a la hidrólisis enzimática (Hoseney 1994d).

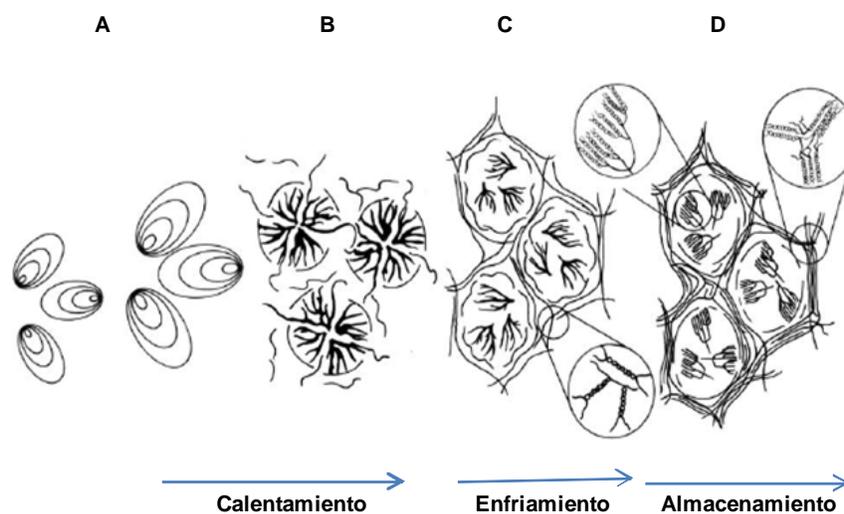


**Figura 6.** Regiones amorfas y cristalinas del almidón.

El almidón cumple distintas funciones en la preparación de los productos de panificación; diluye el gluten dando consistencia a la masa, proporciona azúcares para la fermentación, aporta una superficie para que el gluten se adhiera fuertemente, ayuda en la retención del gas formado y deja menos agua disponible durante la gelatinización; este último proceso favorece la fijación de la película del gluten para que sea más rígido e impermeable al gas, evitando el colapso de la miga durante el enfriamiento del pan (Sandstendt 1961).

Cuando los gránulos de almidón son sometidos a tratamientos térmicos, debido a su estado nativo parcialmente cristalino, experimentan distintas transiciones de fase, llamadas gelatinización y retrogradación (Belitz & Grosch 1999). Como consecuencia de la combinación de calor, humedad y tiempo durante la cocción del pan, los gránulos de almidón se hinchan y gelatinizan (Figura 7A). La gelatinización es la destrucción irreversible del orden molecular de los gránulos de almidón (Atwell *et al.* 1988). Para que ocurra este fenómeno es necesario un nivel mínimo de agua y una determinada temperatura. Durante la gelatinización, una pequeña cantidad de almidón, principalmente amilosa, es liberada en la región intergranular lo que conduce a un aumento de la viscosidad (Figura 7B). Además se produce el desorden de las regiones cristalinas dentro de los gránulos. Parte de la amilosa solubilizada forma complejos de inclusión con los lípidos polares de la harina de trigo. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se usa generalmente

para estudiar la gelatinización y la retrogradación del almidón. 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 *et al.* 1987). Altas temperaturas de transición han sido reportadas como resultado de un alto grado de cristalinidad, indicando estabilidad estructural y resistencia de los gránulos a la gelatinización (Barichelo *et al.* 1990).



**Figura 7.** (A) Hinchamiento de los gránulos de almidón a medida que absorben agua. (B) Gelatinización durante el calentamiento, 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 de la amilopectina durante el almacenamiento, ordenamiento de las moléculas de amilopectina.

Durante el enfriamiento y el almacenamiento del pan las moléculas de almidón se reasocian dando lugar a un estado más ordenado o cristalino, proceso llamado retrogradación (Atwell *et al.* 1988). La estructura y la firmeza 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 rodeando los gránulos de almidón hinchados y deformes

(Figura 7C), (Eliasson & Larsson 1993a). La retrogradación de la amilopectina ocurre a una velocidad mucho menor que la amilosa por lo que se postula como uno de los fenómenos responsables del envejecimiento del pan durante su almacenamiento.

El envejecimiento de los productos panificados está definido como la disminución de la aceptación por parte del consumidor causada por cambios que no resultan de la acción de microorganismos dañinos (Betchel 1955). Durante el almacenamiento, el pan pierde gradualmente su frescura, las alteraciones más notorias son: la pérdida de la crujibilidad de la corteza, el aumento de la firmeza y disminución de la elasticidad de la miga y los cambios en el 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 los dos mecanismos admitidos como válidos (Figura 7D) (Kulp & Ponte 1981, Gray & BeMiller 2003).

Se han propuesto otros esquemas para explicar lo que sucede en el pan durante su almacenamiento debido a que existen algunos resultados contradictorios entre la recristalización del almidón y el endurecimiento de la miga del pan (Dragsdorf & Varriano-Marston 1980). Martin *et al.* (1991) postularon a la formación de puentes de hidrógeno entre el gluten y los gránulos de almidón como la principal causa del endurecimiento de pan. Sin embargo, más tarde Ottenhof y Farhat. (2004) postularon que mediante estudios de calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y por resonancia magnética nuclear, el agregado de gluten (9%) a almidón de trigo no modifica la retrogradación de la amilopectina durante el almacenamiento.

En general se utilizan amilasas en la formulación del pan que disminuyen notablemente la velocidad de endurecimiento de la miga. La acción de las amilasas causa modificaciones en la estructura del almidón alterando las

propiedades de reagrupamiento, además las dextrinas producidas por la hidrólisis enzimática dificultan la reorganización de las moléculas de amilopectina durante el almacenamiento (León *et al.* 1997, Defloor & Delcour 1999, Durán *et al.* 2001). También se utilizan endoxilanasas para disminuir la firmeza y la velocidad de envejecimiento de la miga del pan, sin embargo este efecto aún está en discusión y el mecanismo por el cual ejercen su acción no es claro (Martínez-Anaya & Jiménez 1997, Gil *et al.* 1999, Courtin *et al.* 2001, Haros *et al.* 2002).

## **2.4. Lípidos**

Los lípidos de la harina de trigo constituyen un grupo heterogéneo de compuestos con diferentes estructuras químicas y composición. Se pueden encontrar libres o unidos a algún constituyente de la harina, principalmente almidón y proteínas.

Los lípidos asociados al almidón comprenden en gran parte lisofosfolípidos que forman complejos de inclusión con la amilosa durante la gelatinización del almidón, sin embargo estos complejos también se encuentran en el almidón nativo del cereal (Morrison *et al.* 1993). Esta fracción de lípidos se encuentra dentro de los gránulos de almidón y solo queda disponible cuando se alcanzan las condiciones de gelatinización durante la cocción, por lo que estos lípidos tienen poco efecto sobre la panificación.

La fracción de lípidos no asociados al almidón está comprendida por cantidades similares de lípidos polares y no polares. Parte de ésta fracción corresponde a lípidos que se encuentran libres y parte asociados principalmente a proteínas. Los lípidos que se encuentran libres son polares, principalmente glicol y fosfolípidos, mientras que los que se encuentran asociados son lípidos no polares mayormente triglicéridos (Chung 1986, Eliasson & Larsson 1993b). La fracción de lípidos no asociados al almidón contribuye significativamente en la calidad panadera.

Los lípidos no polares de la harina de trigo tienen un efecto negativo sobre el proceso de panificación (MacRitchie 1981), mientras que los lípidos polares

ejercen un efecto positivo principalmente sobre las propiedades reológicas de la masa (Graybosch *et al.* 1993) y sobre el volumen de pan (Eliasson & Larsson 1993b).

En el patrón de ácidos grasos de los lípidos de la harina de trigo se encuentran el ácido linoleico y en menor cantidad el ácido palmítico y el ácido oleico (Eliasson & Larsson 1993b).

Probablemente la funcionalidad de los lípidos está relacionada con su efecto sobre la estabilización de las celdas de gas. La influencia positiva de los lípidos polares está atribuida a su habilidad en formar monocapas lipídicas en las interfaces gas / líquido de las celdas de gas en la masa de pan, y así incrementar la retención del CO<sub>2</sub> en la fermentación (Gan *et al.* 1995).

Durante el desarrollo de la masa, los lípidos que se encuentran libres se asocian a las proteínas del gluten mediante interacciones específicas y modifican las propiedades reológicas de la masa (Addo & Pomeranz 1991). Además, incrementan el volumen de pan, disminuyen la firmeza de la miga y mejoran la uniformidad de la estructura de la miga.

Se conoce también que los mono y diglicéridos actúan retardando la velocidad de endurecimiento del pan, ya que forman complejos de inclusión con la amilosa disminuyendo la retrogradación de la misma (Johnson & Welch 1968, Olesen *et al.* 1994).

### **3. ELABORACIÓN DEL PAN**

Los productos de panificación han ido evolucionando a diferentes formas y características distintivas. Cada país fue desarrollando su método de panificación tradicional de acuerdo a la calidad de la materia prima y a las características exigidas por los consumidores. Muchos países utilizan el método de panificación tradicional, mientras que otros han ido cambiando sus metodologías drásticamente. El término “pan” es utilizado para describir un amplio rango de productos con diferentes formas, tamaños, textura, corteza, color, aroma y sabor.

El pan es un producto leudado obtenido gracias a la fermentación del azúcar de la harina de trigo producto de la hidrólisis del almidón por la acción de las enzimas naturales de la harina. Durante la fermentación los gases son generados como parte de la actividad metabólica de las levaduras. Muchos microorganismos pueden fermentar azúcares para producir CO<sub>2</sub>, pero el organismo que mejor funciona en masas es el *Saccharomyces cerevisiae*. Los principales productos de la fermentación son, en este caso, el CO<sub>2</sub> y el alcohol etílico, resultado de una serie compleja de reacciones controladas por enzimas. El dióxido de carbono es el responsable del aumento de volumen de la masa, mientras que el alcohol ayuda a producir el aroma complejo de los productos horneados.

Diferentes tecnologías de panificación fueron desarrolladas para responder mejor a las nuevas demandas de la industria (Decock & Cappelle 2005). Además nuevos ingredientes fueron introducidos a medida que se investigaba, generando un constante progreso de la industria panadera. Sin embargo, se pueden destacar algunos pasos comunes a todas las metodologías de elaboración del pan:

- Mezcla de la harina de trigo y el agua, junto con la levadura, la sal y otros ingredientes específicos en proporciones adecuadas.
- Desarrollo del gluten de la masa por la aplicación de energía durante el amasado.
- Incorporación de aire durante el amasado.
- Reposo de la masa.
- División de la masa y moldeado para darle forma a las distintas piezas de masa de pan.
- Fermentación y expansión de las piezas.
- Fijación de la estructura final del pan durante la cocción.
- Enfriamiento y almacenamiento del producto antes de su consumo.

Continuamente se está investigando en el mejoramiento de la tecnología de panificación ya sea para mejorar la calidad de los productos, desarrollar productos

con mayor valor nutricional y para evitar pérdidas económicas. Con el tiempo, la industria panadera fue disminuyendo el tiempo de fermentación y automatizando todo el proceso, por lo que actualmente las metodologías de panificación son más rápidas y menos laboriosas.

Una de las tecnologías más recientemente incorporada en la industria panadera es la producción de panes a partir de masas congeladas. El pan fresco posee una corta vida útil, ya que durante el almacenamiento ocurren distintos cambios físicos y químicos conocidos como envejecimiento del pan. La metodología de masas congeladas permite evitar grandes pérdidas económicas causadas por el envejecimiento de los productos panificados y ofrece al consumidor un producto fresco, recién elaborado a toda hora del día (Matuda *et al.* 2005). Esta tecnología se aplica a la producción de una gran variedad de productos como pan tipo francés, medialunas, panes de Viena y de hamburguesas.

El congelamiento de la masa incluye principalmente el cambio de estado físico (solidificación) del agua; sin embargo, ésta es apenas uno de los componentes de la masa de pan. En la masa de pan puede identificarse una fase líquida (el agua libre) dispersa en una matriz sólida predominantemente amorfa, con eventuales estructuras cristalinas remanentes que provienen de la organización estructural de las moléculas de almidón. También dispersas se encuentran las células de levadura. Ésta es la estructura que será sometida a enfriamiento hasta temperaturas de congelación.

En la metodología de masas congeladas, luego de desarrollar la masa y formar las piezas de pan, éstas son congeladas hasta que el centro de las mismas alcanza los  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En los puntos de venta, las piezas de masa de pan son descongeladas, fermentadas y horneadas a medida que los productos son consumidos (Giannou *et al.* 2003).

Sin embargo, durante el almacenamiento en estado congelado la calidad de la masa de pan se deteriora gradualmente (Inoue & Bushuk 1992, Ribotta *et al.* 2001). Dos factores han sido identificados como posibles razones de la pérdida de calidad observada en los panes obtenidos a partir de masas congeladas:

- 1) Disminución de la producción de CO<sub>2</sub> debido a la pérdida de la viabilidad y actividad de las levaduras
- 2) Disminución de la fuerza de la masa.

La congelación de la masa reduce considerablemente la actividad de las levaduras. Diferentes autores mostraron que el congelamiento rápido redujo la capacidad de producción de gas y el número de células viables (Wolt & D'Appolonia 1984a,b, Autio & Sinda 1992, Inoue *et al.* 1994, El-Hady *et al.* 1996). Si bien gran parte del daño a las células se produce durante el proceso de congelación, las condiciones y el tiempo de almacenamiento en estado congelado afectan también las levaduras.

El debilitamiento de la masa durante el almacenamiento en estado congelado puede deberse a una pérdida del grado de entrecruzamiento de la red de gluten, causada ya sea por las sustancias reductoras liberadas por las levaduras durante la congelación o por la acción mecánica de los cristales de hielo; o por una redistribución del agua.

La estructura del gluten está sujeta a estrés físico durante la congelación y descongelación. Varriano-Marston *et al.* (1980) indicaron que la formación de hielo contribuye al debilitamiento de la red de gluten, por lo que parte de la red proteica es escindida por la acción mecánica de los cristales.

Además del daño que causa la congelación a la membrana celular de las levaduras, este proceso provoca la liberación de sustancias químicas componentes de las levaduras, particularmente sustancias reductoras, como el glutatión que pueden tener efectos nocivos sobre la estructura del gluten (Ribotta *et al.* 2003). Estas sustancias reductoras causan la reducción de los puentes disulfuro entre las proteínas del gluten (Belitz & Grosch 1999).

Otros mecanismos propuestos como causantes del debilitamiento de la masa son la redistribución del agua debido a la formación de hielo y la recrystalización durante la congelación y el almacenamiento congelado (Inoue & Bushuk 1991). Durante el proceso de congelación el agua es separada como hielo mientras que el gluten se deshidrata lentamente. Cuando la masa es descongelada y su temperatura supera 0 °C, los cristales de agua funden pero el

agua no regresa a su estado y lugar original en la matriz de gluten. La deshidratación del gluten tiene efectos negativos sobre la estructura de la masa y la calidad de los productos horneados (Nicolas *et al.* 2003).

Si bien se sugirieron varias causas para explicar el debilitamiento de la masa, es muy probable que los cambios sean debido a una combinación de todas ellas.

#### **4. ENZIMAS**

Las enzimas son catalizadores biológicos específicos capaces de actuar bajo condiciones moderadas de pH y temperatura, químicamente son proteínas. Actúan en pequeñas cantidades, acelerando la velocidad de una determinada reacción sin consumirse, son muy específicas ya que pueden modificar un único sustrato de una mezcla de moléculas similares; y muy selectivas porque pueden modificar un único enlace.

El uso de enzimas es una opción muy interesante para mejorar la calidad panadera de las harinas y la conservación del pan porque son consideradas naturales, seguras y un componente alimenticio no tóxico. Sin embargo, es importante que los microorganismos que producen las enzimas no sean patógenos, ni sinteticen a la vez toxinas o antibióticos. Las enzimas se pueden utilizar para modificar el almidón, las proteínas, los pentosanos y los lípidos de la harina de trigo con el objetivo de modificar su estructura y mejorar su funcionalidad en el pan; ya sea durante la elaboración como en el producto final.

Las primeras enzimas usadas en panificación fueron las amilasas que son adicionadas rutinariamente a la harina pese a que están presentes naturalmente en el grano. La enzima  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1), hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 del almidón, produciendo  $\alpha$ -dextrinas de bajo peso molecular (Bowles 1996). Es sabido que su efecto 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<sub>2</sub>, 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 & Godon 1987, Bowles 1996). Además las  $\alpha$ -amilasas disminuyen la velocidad de endurecimiento de la miga del pan ya que proporcionan dextrinas que dificultan la retrogradación de la amilopectina (León *et al.* 1997, Min *et al.* 1998, Defloor & Delcour 1999).

A continuación se describen las características principales de las enzimas utilizadas en este trabajo de Tesis.

#### **4.1. Pentosanasa**

Las pentosanases o endoxilanasas microbianas (EC 3.2.1.8), actúan sobre los polisacáridos no almidonosos específicamente sobre los arabinoxilanos de la masa de harina de trigo. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 de la cadena central de D-xilosas (Figura 8) de los arabinoxilanos, reduciendo su tamaño molecular (Courtin & Delcour 2001).

Según la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico, la mayoría de las endoxilanasas son agrupadas dentro de las familias 10 y 11 de las hidrolasas glicosídicas (Coutinho & Henrissat 1999). Las enzimas pertenecientes a estas familias muestran diferencias en estructura y características catalíticas. Las endoxilanasas de la familia 10 poseen estructuras complejas, tienen alto peso molecular, son menos específicas y catalíticamente más versátiles. Estas enzimas prefieren hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4 de la cadena de D-xilosas cercanos a los puntos de ramificación con L-arabinosa. Por el contrario, las endoxilanasas de la familia 11 poseen una estructura más simple, bajo peso molecular, son más específicas e hidrolizan principalmente los enlaces  $\beta$ -1,4 de las regiones no sustituidas de la cadena de D-xilosas (Jeffries *et al.* 1996, Biely *et al.* 1997).

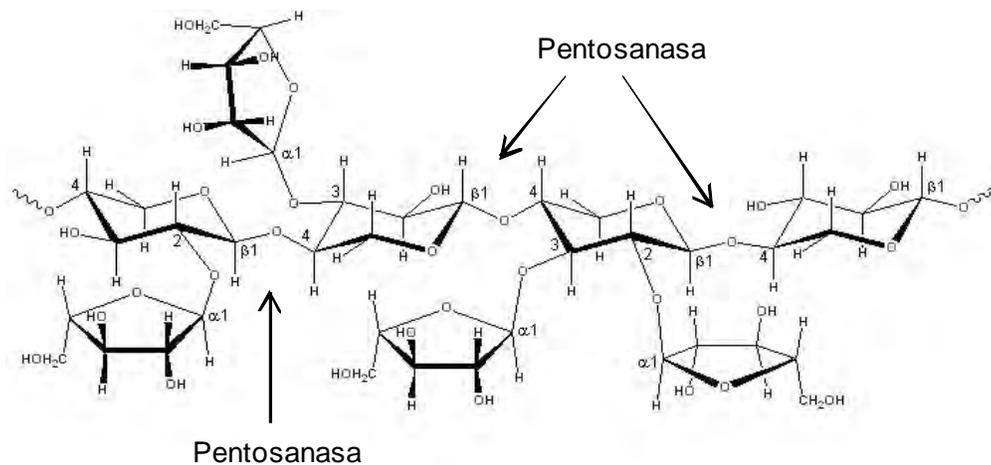
Muchos microorganismos, tales como especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Bacillus* son buenos productores de diferentes tipos de endoxilanasas y muchas de estas preparaciones enzimáticas están disponibles comercialmente y son ampliamente utilizadas en la industria (Polizeli *et al.* 2005).

Las endoxilanasas microbianas más específicas son las más comúnmente usadas en la panificación para mejorar las propiedades de la masa y el volumen de pan (Courtin *et al.* 2001).

La funcionalidad de las endoxilanasas en la panificación depende fuertemente de la selectividad de las enzimas a los sustratos (arabinoxilanos solubles en agua o arabinoxilanos insolubles en agua). La acción de las endoxilanasas sobre los arabinoxilanos insolubles en agua causa una disminución del tamaño de los polímeros, transformándolos en solubles. Los arabinoxilanos solubles causan un efecto positivo sobre las propiedades de la masa y del pan, actúan disminuyendo la velocidad de difusión del CO<sub>2</sub> en la masa estabilizando las celdas de gas. Además, incrementan la viscosidad de la fase acuosa de la masa ya que aumentan su estabilidad e incluso mejoran las características del pan: como el volumen de pan, la firmeza y estructura de la miga (Hoseney 1984, Gan *et al.* 1995). Por último, la presencia de arabinoxilanos solubles puede interferir estéricamente en las asociaciones intermoleculares del almidón disminuyendo la retrogradación (Kim & D'Appolonia 1977b). Sin embargo, otros autores atribuyen la acción de los arabinoxilanos sobre el envejecimiento del pan, principalmente a su efecto sobre la redistribución del agua en la masa (Gudmundsson *et al.* 1991, Eliasson & Larsson 1993a, Biliaderis *et al.* 1995). El impacto de estas enzimas sobre la firmeza inicial y el envejecimiento del pan aún está en discusión (Martínez-Anaya & Jiménez 1997b, Gil *et al.* 1999, Courtin *et al.* 2001, Haros *et al.* 2002).

Por el contrario, endoxilanasas que preferencialmente actúan sobre los arabinoxilanos solubles en agua reduciendo su peso molecular causan poco o ningún efecto positivo en la calidad del pan (Courtin *et al.* 1999, 2001). En ambos casos, excesivos niveles de endoxilanasas producen una masa floja y pegajosa que resulta en panes de mala calidad. Esto es debido a que una extensa degradación de los arabinoxilanos conduce a una pérdida de la capacidad de retener agua de la masa (McCleary *et al.* 1986, Rouau *et al.* 1994, Courtin *et al.* 1999, 2001)

La utilización de endoxilanasas es especialmente recomendable en la elaboración de panes con alto contenido de fibra y cuando se utilizan harinas de centeno, pero ha demostrado mejorar la calidad de panes blancos también. Jiang *et al.* (2005) observaron un efecto positivo de una xilanasa termoestable recombinante sobre la calidad del pan, pero sólo cuando fue agregada en una dosis óptima.



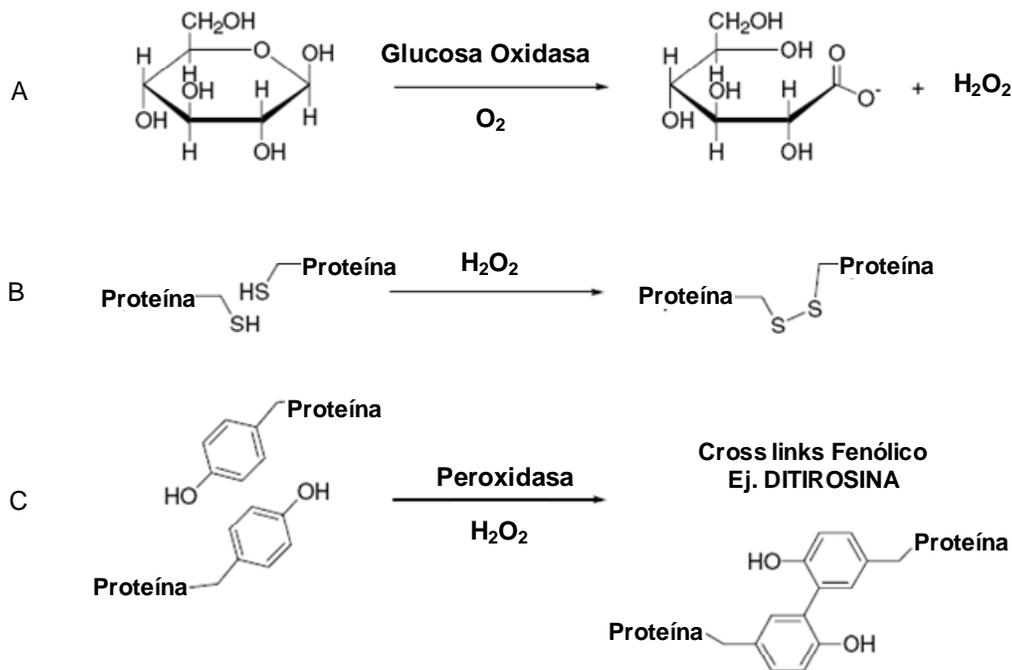
**Figura 8.** Reacción catalizada por la enzima Pentosanasa, hidrólisis de enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 entre moléculas de xilosa.

El conocimiento del mecanismo por el cual las endoxilanasas ejercen su efecto es aún limitado, probablemente porque los pentosanos de la harina de trigo cambian de una variedad a otra, y porque la especificidad de las enzimas también es diferente frente a los distintos sustratos (Courtin & Delcour 2001, Vardakou *et al.* 2003).

#### 4.2. Glucosa Oxidasa

La enzima glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) en presencia de oxígeno cataliza la oxidación de  $\alpha$ -D-glucosa a  $\alpha$ -D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

(Figura 9A). La gluconolactona es hidrolizada a ácido glucónico por un mecanismo no enzimático.



**Figura 9.** (A) Reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa. (B) y (C) Dos posibles mecanismos propuestos para la acción de la enzima glucosa oxidasa, vía puentes disulfuro (Vemulapalli *et al.* 1998) o uniones tipo fenolicas (Ameille *et al.* 2000), respectivamente.

El mecanismo por el cual la glucosa oxidasa mejora la calidad del pan aún no es completamente comprendido. Diversos autores (Haarasilta *et al.* 1991, Primo-Martin *et al.* 2003, Rosell *et al.* 2003, Gujral & Rosell 2004) 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 9B) y la gelación de los pentosanos solubles modificando las propiedades reológicas de la masa de harina de trigo. Esta hipótesis fue confirmada por Vemulapalli y Hosney (1998) quienes encontraron que los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas solubles disminuían en presencia de glucosa oxidasa. Posteriormente, se describió que

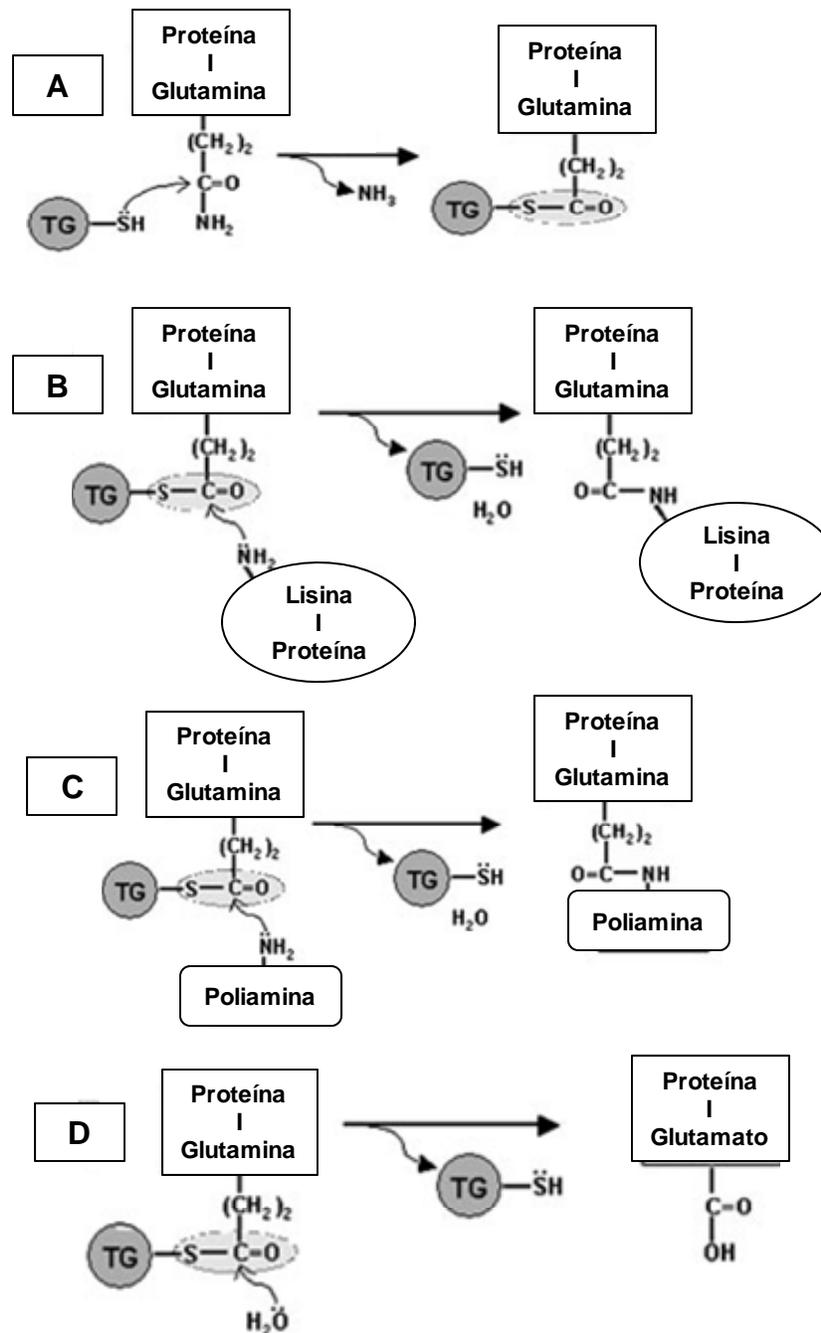
simultáneamente a la formación de puentes disulfuros, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causaría la formación de enlaces ditirosina (Figura 9C) entre las proteínas de la masa de trigo (Singh 1991, Oudgenoeg *et al.* 2001, Tilley *et al.* 2001). Recientemente, Rasiah *et al.* (2005) informaron que el tratamiento de la harina de trigo con glucosa oxidasa resultaba en el entrecruzamiento de la fracción de proteínas solubles en agua mediante enlaces disulfuro y no-disulfuro.

Durante el proceso de panificación, la adición de glucosa oxidasa produce un cambio en la textura de la masa afectando su consistencia y aumentando el volumen de pan (Martinez-Amaya & Jiménez 1998). Sin embargo, otros autores (Vemulapalli *et al.* 1998, Rasiah *et al.* 2005) no observaron grandes diferencias en la textura de la miga y no obtuvieron un incremento en el volumen de pan. Bonet *et al.* (2006) postularon que el efecto de la enzima dependía de la dosis y de la calidad de la harina utilizada.

El mecanismo por el cual la glucosa oxidasa mejora la calidad del pan no está completamente entendido. No se sabe si los efectos beneficiosos de esta enzima se deben únicamente a la formación de puentes disulfuro o si son también debidos a la gelificación de los pentosanos o a la interacción proteína - pentosanos. La importancia relativa de estos eventos oxidativos no ha sido estudiada aún.

### **4.3. Transglutaminasa**

La enzima transglutaminasa (EC 2.3.2.13) es una aciltransferasa que cataliza tres tipos de reacciones diferentes. La reacción más importante que cataliza la transglutaminasa es la formación de una unión peptídica entre residuos de lisina y glutamina, sin afectar el valor nutricional de la lisina (Seguro *et al.* 1996). En ausencia de aminas primarias, el agua puede actuar como aceptor de grupos acilos y la glutamina es deaminada y transformada en glutamato. Por último la transglutaminasa también cataliza la incorporación de poliaminas en las proteínas mediante un enlace tipo amida con residuos de glutamina (Nielson 1995) (Figura 10).



**Figura 10.** Reacciones catalizadas por la enzima transglutaminasa. (A) y (B) Formación de enlaces isopeptídicos entre residuos de glutamina y lisina de las proteínas. (A) y (C) Incorporación de poliaminas mediante la formación de un enlace tipo amida con residuos de glutamina. (A) y (D) Deaminación de residuos de glutamina.

Entre las proteínas del gluten, las gliadinas y las gluteninas de alto peso molecular fueron reportadas como sustratos de la transglutaminasa (Alexandre *et al.* 1993, Larré *et al.* 2000). La transglutaminasa cataliza entrecruzamiento entre la proteínas mediante enlaces isopeptídicos intra e intermolecular, la polimerización de las proteínas del gluten puede conducir a un incremento de la elasticidad de la masa y por lo tanto mejorar la calidad panadera. La transglutaminasa puede producir efectos benéficos durante la panificación, mayores aun que los mejoradores oxidantes, ya que su acción no está limitada por la cantidad de grupos sulfhidrilo libres. En el gluten esta enzima induce la formación de polímeros de alto peso molecular (Larré *et al.* 1998) y produce modificaciones en la elasticidad (Losche 1995) y en la fuerza de la masa (Gerrard *et al.* 1998). El efecto más importante fue observado en medialunas leudadas y en pasteles esponjosos (Gerrard *et al.* 2000). Otros autores, observaron que a medida que se incrementaba la dosis de transglutaminasa disminuía el índice de gluten y todos los parámetros alveográficos (Rosell *et al.* 2003). Finalmente, se reportó que el efecto de la enzima depende de la dosis utilizada, bajos niveles de transglutaminasa causan efectos positivos en el pan, mientras que altos niveles disminuyen notoriamente la calidad del pan (Basman *et al.* 2002, Bauer *et al.* 2003, Autio *et al.* 2005). Sin embargo, no se conoce bien aún cuál es el mecanismo por el cual la dosis óptima de TG produce una comprobada mejora en la calidad panadera. A su vez, en la elaboración de masas congeladas, el agregado de estas enzimas podría contrarrestar el daño causado en la red de gluten por el almacenamiento en estado congelado. Por esta razón, resulta importante estudiar el mecanismo de acción de esta enzima en la mitigación del daño estructural durante la congelación.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los mecanismos de acción de enzimas como aditivos de panificación mediante el análisis de las interacciones que se establecen entre los componentes de la formulación del producto.

### **5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto de las enzimas como aditivos sobre la calidad de los productos y la conservación del pan elaborado mediante el método tradicional y mediante la tecnología de masas congeladas.
  
- Estudiar el efecto de las enzimas sobre el comportamiento reológico y la microestructura de la masa de harinas de trigo.
  
- Estudiar la modificación de la estructura del gluten por efecto de las enzimas, mediante tecnologías de análisis comúnmente utilizadas para la caracterización de proteínas.
  
- Estudiar en sistemas modelo *enzima-proteína*, el mecanismo de acción de las enzimas sobre los cambios estructurales producidos en las moléculas constituyentes de las harinas.
  
- Optimizar formulaciones de productos de panificación empleando las enzimas estudiadas.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. MATERIALES.

**Harina.** Se utilizó una harina de trigo comercial 000, sin aditivos provista por el Molino Campodónico Ltda. (La Plata, Argentina). En la Tabla 1 se presentan las características de la harina.

**Tabla 1.** Características de la harina de trigo comercial utilizada en todos los ensayos.

Parámetros	
Proteínas (%)	10,90
Humedad (%)	13,10
Cenizas (%)	0,64
Fibra Cruda (%)	0,21
Pentosanos (%)	3,57
Ab (%)	63
TD (min)	10
E (min)	16,88
P (mm)	98
L (mm)	72
W (Jx10 <sup>4</sup> )	266
P/L	1,36

Farinograma: Ab= absorción farinográfica, TD= tiempo de desarrollo de la masa, E= estabilidad de la masa. Alveograma: P= tenacidad, L= extensibilidad, W= energía de deformación.

**Enzimas.** Se trabajó con glucosa oxidasa (Gox, Gluzyme mono 10000 U/g, de Novozyme, Dinamarca), 1,4 endoxilanas (Pn, Pentopan mono 2500 U/g, de Novozyme, Dinamarca) y transglutaminasa microbiana activa (TG, 100 U/g, de Apliena Ajinomoto, Japón),  $\alpha$ -amilasa fúngica (AM, 10000 skb, Dinamarca). Todos los agentes químicos fueron de grado analítico.

## 2. MÉTODOS.

➤ **Proteínas.** El contenido de nitrógeno de las muestras se determinó por medio del micro método de 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, España). El amonio resultante se destiló (Destilador UDK 126, Velp Scientifica SRL, Italia) sobre ácido bórico y se tituló con HCl. El porcentaje de proteína total se calculó como  $N \times 5,7$  (Método 46-13, AACC Internacional 2000).

➤ **Humedad.** El contenido de humedad se determinó por diferencia de pesada 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 pesada en 2 g de harina exactamente medidos, antes y después de calentar en mufla a 600 °C hasta masa constante (Método 08-03, AACC Internacional 2000).

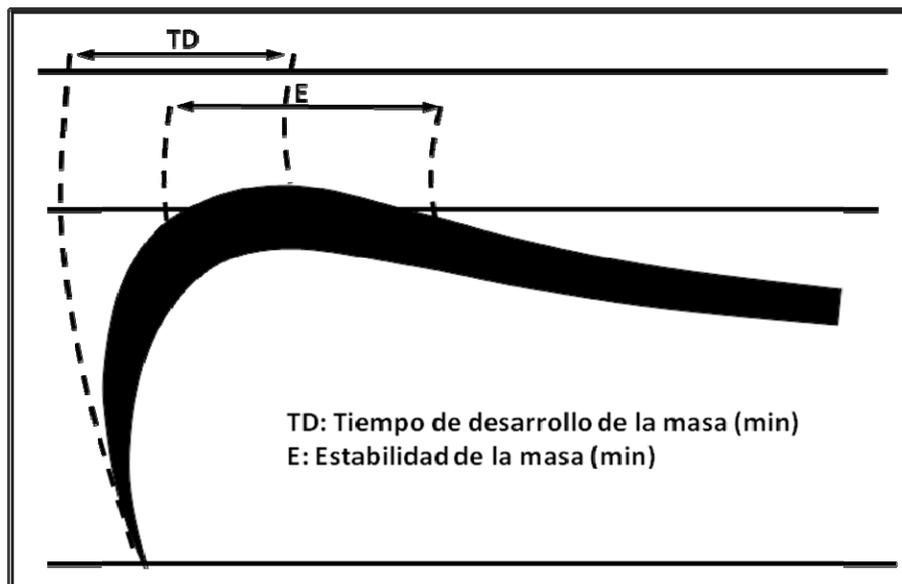
➤ **Fibra Cruda.** Se determinó de acuerdo al método 32-10 (AACC Internacional 2000), por medio de una digestión ácida ( $H_2SO_4$  1,25%) seguida de una digestión alcalina (NaOH 1,25%).

➤ **Características reológicas.** Se utilizó un Alveógrafo (Chopin, Francia). Se preparó una masa de harina y solución de cloruro de sodio (2,5 %) con la que se obtuvieron cinco piezas en forma de disco. Después de un período de reposo (20 min) en cámara de fermentación a 25 °C, se insufló aire a cada una de las piezas. Se formó una burbuja de aire que extendió la masa hasta su ruptura. Se midió la presión dentro de la burbuja que se registró como la tenacidad, P en función de la extensibilidad, L. Se determinaron los parámetros, P, L, P/L y la resistencia de la masa a la deformación a través del trabajo W (Método 54-30A, AACC Internacional 2000).

➤ **Absorción de agua, tiempo de desarrollo y estabilidad de la masa.**

Para evaluar el comportamiento de la masa durante el amasado se empleó un Farinógrafo Brabender (C.W. Brabender Instruments, Inc., Alemania). Para ello en una amasadora se incorporó una determinada cantidad de agua y harina y se amasó a velocidad constante registrando la resistencia que opone la masa al trabajo mecánico continuo en función del tiempo. En primer lugar se determinó la capacidad de absorción de agua como la cantidad de agua necesaria para que la masa alcance una consistencia determinada (500 unidades brabender). Luego a partir del diagrama (Figura 1) se obtuvieron los siguientes parámetros relacionados con la aptitud industrial de la harina:

- Tiempo de desarrollo (TD) es el tiempo comprendido entre el inicio del amasado y el punto de la curva de máxima consistencia.
- Estabilidad (E) es el tiempo transcurrido entre el punto en el que la parte superior de la curva alcanza la línea de las 500 unidades brabender (valor estandarizado de consistencia máxima) y el punto en el que la misma parte superior de la curva cruza nuevamente la línea de 500 unidades (Método 54-21, AACC Internacional 2000).



**Figura 1.** Diagrama de un farinograma característico.

## **2.1. Elaboración del pan.**

**2.1.1. Formulación de la masa.** Los panes se elaboraron utilizando la siguiente formulación: 100% de harina, 3% de levadura prensada comercial (Calsa, Argentina), 2,2% de sal de mesa (Dos Anclas, Argentina), 58,5% de agua (cantidad óptima) determinada experimentalmente de acuerdo a las condiciones de trabajo, ajustando la absorción farinográfica a las características de la amasadora.

Se utilizaron las siguientes dosis de cada enzima en base harina:

- Gox 0,001% (**G1**); 0,005% (**G2**) y 0,01% (**G3**)
- Pn 0,006% (**P1**); 0,012% (**P2**) y 0,018% (**P3**)
- TG 0,01% (**T1**); 0,1% (**T2**) y 0,5% (**T3**)

Las dosis de glucosa oxidasa y pentosanasa fueron tomadas a partir de las recomendadas por los fabricantes y las dosis de transglutaminasa fueron seleccionadas de acuerdo a publicaciones previas.

## **2.1.2. Ensayos de Panificación**

**Método tradicional.** Los ingredientes fueron mezclados y amasados durante 9 min con una amasadora Argental L-20 (Argentina). La levadura y la sal se disolvieron previamente en agua, en forma separada, y los demás ingredientes se agregaron sólidos. La temperatura del agua se calculó para obtener una masa final a  $24 \pm 1$  °C. La masa resultante se dejó reposar 15 min a 30 °C y posteriormente fue desgasificada y laminada en una sobadora Mi-Pan vf roller (Mi-Pan, Córdoba, Argentina) con dos rodillos de 50 x 12,7 cm. Seguidamente la masa fue dividida en trozos de 150 g los cuales fueron pasadas a través de una armadora (Braesa, Brasil) para formar las piezas de pan. Posteriormente las piezas fueron fermentadas a una atmósfera de 96% de humedad relativa y 30 °C y el tiempo necesario para alcanzar su máximo volumen, determinado por

mediciones de volumen óptimo. Para el registro de la fermentación se colocaron piezas de masa (50 g) en vasos de fermentación graduados y se midió el aumento de volumen de la masa cada 15 min. El tiempo para alcanzar el volumen óptimo de las piezas se determinó como el momento en el que disminuyó la velocidad de incremento del volumen. Por último las piezas se hornearon a 210 °C por 18 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Argentina) previa vaporización de agua en la superficie de las piezas de pan. Cada ensayo de panificación fue realizado por duplicado.

**Método Pan Francés.** Para la elaboración de panes a partir de masas congeladas se utilizó el método de pan francés. Se aplicó la misma formulación antes mencionada. Los ingredientes fueron mezclados y amasados durante 9 min con una amasadora Argental L-20 (Argentina). La levadura y la sal se disolvieron previamente en agua, en forma separada, y los demás ingredientes se agregaron sólidos. La temperatura del agua se calculó para obtener una masa final a  $24 \pm 1$  °C. La masa resultante se dejó reposar durante 15 min a 30 °C y luego se dividió en trozos de 120 g. Los trozos de masa se bolearon a mano, se dejaron reposar 15 min más y se pasaron por la armadora (Braesa, Brasil) para formar las piezas de pan. Inmediatamente después fueron colocadas en bolsas de polietileno de 20 x 30 cm con un espesor de 50  $\mu$ m selladas térmicamente y almacenadas en un congelador a -18 °C durante 3 y 9 semanas. En el momento de obtener pan, las piezas se sacaron del envoltorio y se mantuvieron por una hora en cámara de fermentación a 30 °C con baja humedad relativa para evitar la condensación del agua sobre la superficie de la masa fría. Seguidamente, las masas se fermentaron en cámara a 30 °C con un 96% de humedad relativa, hasta volumen óptimo. Las piezas fermentadas se hornearon a 210 °C por 18 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Argentina) previa vaporización de agua. Cada ensayo de panificación fue realizado por duplicado.

**Método Pan de Molde.** Para hacer el análisis de superficie de respuesta los panes se elaboraron mediante la metodología de pan de molde utilizada en programas de mejoramiento de trigo según norma IRAM 15858-1. Se utilizó una formulación base diferente a la mencionada anteriormente: 100% de harina de trigo, 3% de levadura prensada (Calsa, Argentina), 2,5% de azúcar (Fronterita, Argentina), 1% de sal (Dos Anclas, Argentina), 0,15% de estearil lactilato de sodio (SSL, Alpha emulsionantes, Argentina) y 58,5% de agua (valor óptimo). La levadura y la sal se disolvieron previamente en agua, en forma separada, y los demás ingredientes se agregaron sólidos. La temperatura del agua se calculó para obtener una masa final a  $27\pm 1$  °C. Los ingredientes fueron mezclados y amasados durante 3 min a baja velocidad para formar el bollo de masa, luego se amasó durante 9 min a alta velocidad (amasadora Argental L-20, Argentina). Seguidamente se llevó a cabo la prefermentación durante un total de 80 min: la masa se colocó en la cámara de fermentación a 30 °C y 98% de HR, transcurridos los primeros 45 min se prosiguió a desgasificar la masa manualmente sobre la mesada. Posteriormente se llevó de nuevo a la cámara de fermentación. El proceso de desgasificación se repitió después de dos periodos de 15 y 20 min de prefermentación. Inmediatamente después la masa fue laminada con una sobadora Mi-Pan vf roller (Mi-Pan, Córdoba, Argentina) con dos rodillos de 50 x 12,7 cm y separada en trozos de 130 g. Los trozos de masa fueron pasados por una armadora (Braesa, Brasil), colocados en moldes y llevados a la cámara de fermentación durante 75 min a 30 °C y 98% de HR. Por último las piezas se hornearon a 215 °C por 24 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Argentina) previa vaporización de agua en la superficie de las piezas de pan. Cada ensayo de panificación fue realizado por duplicado.

## ***2.2. Determinación de la calidad del pan***

**2.2.1. Volumen específico del pan.** El volumen de la hogaza de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza, después de 1 h de horneado. El volumen específico se obtuvo dividiendo el volumen de la muestra por su peso.

Se realizaron 3 determinaciones de cada lote, se informaron el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de los dos ensayos de panificación de cada muestra.

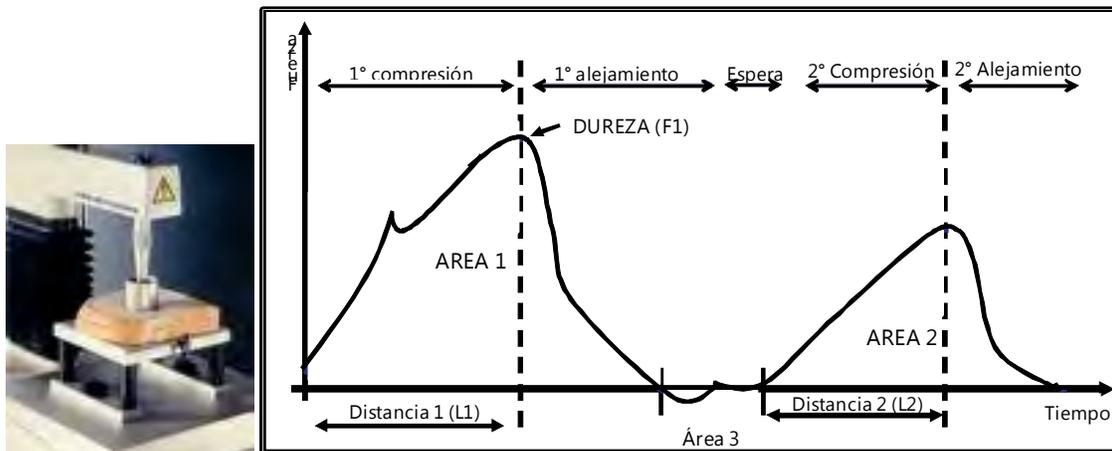
**2.2.2. Textura de la miga de pan.** El perfil de textura de la miga de pan fue determinado usando un Texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, UK) bajo las siguientes condiciones: celda de compresión de 25 kg, velocidad del cabezal: 100 mm/min, deformación máxima: 40%, diámetro del émbolo de penetración: 25 mm.

Para el análisis de la textura de la miga, las hogazas de pan fresco, 1 h después de horneados, fueron guardadas en bolsas de polietileno y almacenadas a 25 °C por distintos intervalos de tiempo (0, 1 y 3 días). En cada intervalo de tiempo, dos hogazas de pan fueron cortadas en rodajas de 25 mm de espesor (2 rodajas de cada hogaza), descartándose los extremos de cada pan. El centro de cada rodaja de pan se sometió a dos ciclos de compresión - descompresión para obtener la curva de TPA (Análisis de Perfil de Textura) característica (Figura 2) a partir de la cual se obtuvieron tres parámetros texturales calculados por el software del texturómetro:

➤ **Firmeza:** es la fuerza máxima que tiene lugar, en cualquier tiempo, durante el primer ciclo de compresión (Bourne 1978). Definida también como la fuerza, en g fuerza o newton, necesaria para comprimir una rodaja de pan hasta un 40% del espesor original (Método 74-09, AACC Internacional 2000). En el caso de la miga, se obtuvo para el primer ciclo, un solo pico que coincidió con la dureza o firmeza de la misma.

➤ **Elasticidad:** es una medida de cuanto recupera su altura o forma original el alimento luego de ser sometido a una deformación. Estrictamente se define como la altura que el alimento recupera durante el lapso transcurrido entre el final de la primera mordida y el comienzo de la segunda (Bourne 1978). Se calcula como el cociente entre la distancia 2 (L2) y la distancia 1 (L1). Por lo tanto, la elasticidad =  $L2/L1$ .

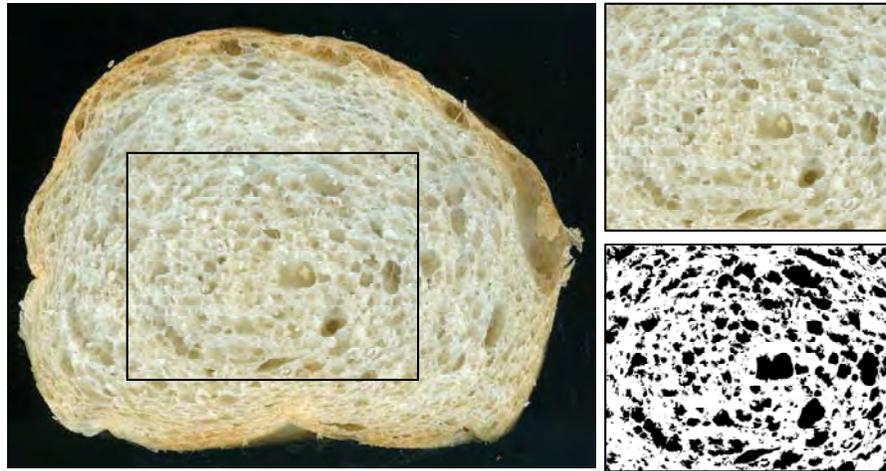
➤ **Masticabilidad:** sensorialmente se define como la fuerza requerida para desintegrar un alimento sólido hasta que esté listo para ser deglutido (Civille y Szczesniak 1973). Se determina como el producto de firmeza x cohesividad (definida como el cociente entre  $A2/A1$ ) x elasticidad.



**Figura 2.** Curva característica de Análisis de Perfil de Textura (TPA). **F1** (Pico máximo de la primera compresión) = Dureza o Firmeza. **A2/A1** (Área 2 / Área 1) = Cohesividad. **L2/L1** (Distancia 2 / Distancia 1) = Elasticidad. **F1 x A2/A1 x L2/L1** (Dureza x cohesividad x elasticidad) = Masticabilidad.

**2.2.3. Estructura de la miga.** La estructura de la miga, se puede evaluar a través de medidas de tamaño de alveolo, mediante análisis de imágenes de la miga de pan. La imagen entera es fragmentada por un valor de gris para crear una imagen binaria, todos los píxeles con nivel de gris por encima del umbral se muestran en blanco y por debajo en negro (Figura 3). Se puede generar una imagen binaria óptima por la selección de un simple umbral de gris. Los píxeles (puntos de la pantalla del monitor de un sistema PC que se combinan para formar una imagen) con valores de gris más bajos que el valor umbral, se consideran objeto (miga de pan) y los valores de gris por encima del valor umbral se consideran aire (alveolo). Se puede encontrar interactivamente un nivel apropiado de umbral de gris, variando el nivel de gris hasta que la imagen conserve los

rasgos fundamentales de la contraparte monocromática (Sapirstein *et al.* 1994, Tan *et al.* 1997).



**Figura 3.** Fotografía de una rodaja de pan, mostrando el área seleccionada. A su lado el área seleccionada transformada en imagen binarizada con un umbral de 180. Todos los pixel 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 (alveolos).

Para analizar la estructura de la miga se obtuvieron dos rodajas (2 cm de espesor) de la región central de cada pan y cada rodaja fue escaneada con un escáner fotográfico (HP Scanjet G3010, Palo Alto CA, USA). La imagen en formato de archivo JPEG se analizó con el programa de análisis de imágenes Image-J 1.38n (National Institutes of Health, Estados Unidos de América). 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. La imagen de color se convirtió a imagen de 8-bits y se analizó en escala de grises (0 negro, 255 blanco). La segmentación de la imagen (conversión a imagen binaria) la hizo el programa por selección automática del valor del umbral. Este método de selección del valor umbral representó mejor los rasgos fundamentales de las imágenes que la selección de un valor de umbral único e igual para todas las imágenes, debido a que existen pequeñas diferencias en los fondos de cada imagen. La imagen binaria tiene sólo dos niveles de grises: 0 para las áreas vacías (negro, alveolosde gas) y 255 para las paredes de los alveolos(blanco,

miga de pan). Se asignó la categoría de objeto (celdas de gas) a aquellas zonas de la imagen que tenían una intensidad de gris entre 0 y el valor umbral que correspondiera a cada imagen. Del análisis de las imágenes se obtuvieron los siguientes parámetros:

- **Área media de alveolo, AM:** área promedio de los alveolos. Área de un alveolo = número de píxeles que hacen al alveolo multiplicado por el área de un píxel.
- **Número total de alveolos, N:** cantidad de por unidad de superficie de miga de pan.
- **Fracción de Área, FA:** es el porcentaje del área total que corresponde al área ocupada por alveolos. Relación entre el área total ocupada por alveolos y el área total seleccionada.
- **Uniformidad:** es la relación entre el número de alveolos menores a 0,04 mm<sup>2</sup> y el número de alveolos mayores a 0,04 mm<sup>2</sup>.

**2.2.4. Color de la corteza del pan.** En las determinaciones de color se utilizó un espectrofotómetro CM-508d Minolta (Ramsey, NJ, USA) 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. A cada muestra de pan se le 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 & Brimelou 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. 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, en el desplazamiento sobre el eje  $a^*$  hacia valores positivos del punto acromático se observan los rojos y para valores negativos los verdes. El valor  $b^*$  es una medida de la intensidad de color amarillo, en el desplazamiento sobre el eje  $b^*$  hacia valores positivos del punto acromático se observan los amarillos y para valores negativos los azules (Figura 4).

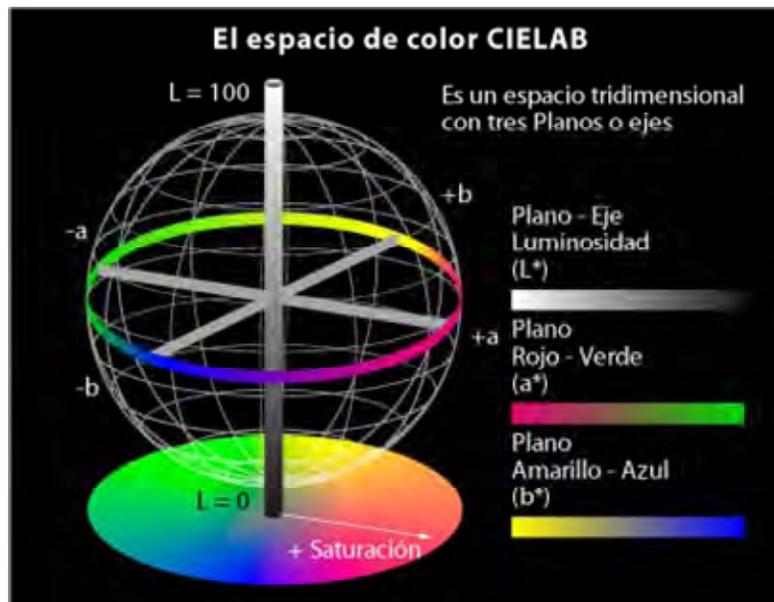


Figura 4. Representación gráfica del espacio Cie-lab.

### 2.3. Determinación de las propiedades reológicas y estructurales de la masa.

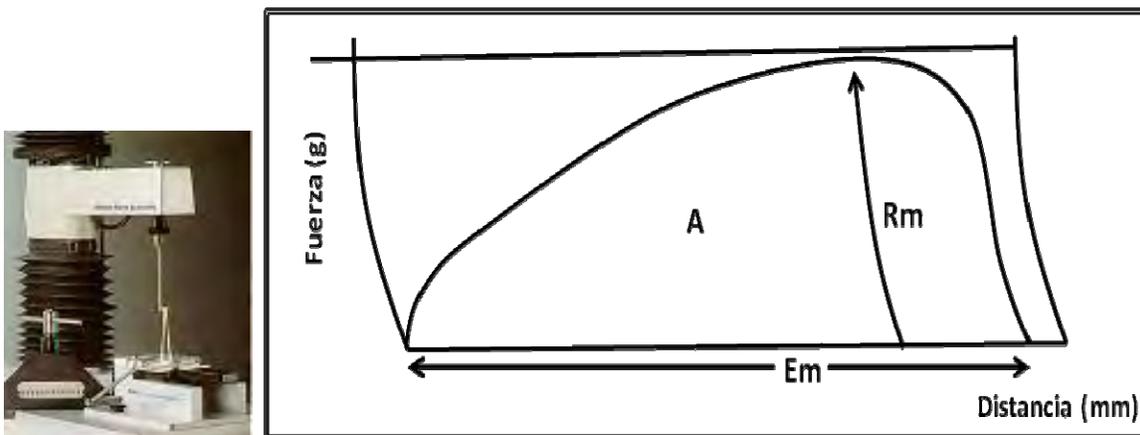
La reología estudia el flujo y la deformación de la materia cuando se somete a la acción de una fuerza externa. Es una herramienta importante ya que brinda información sobre la estructura del alimento y sobre las interacciones entre los diversos componentes (Steffe 1996).

**2.3.1. Ensayo farinográfico.** Se empleó un Farinógrafo Brabender (C.W. Brabender Instruments, Inc., Duisburg, Alemania). Se obtuvo un diagrama de la resistencia que opone la masa al trabajo mecánico continuo en función del tiempo. Dicho diagrama permitió determinar la absorción farinográfica de agua, el tiempo

de desarrollo de la masa y la estabilidad, según ensayo descrito en la sección 2.1) (Método 54-21, AACCC Internacional 2000).

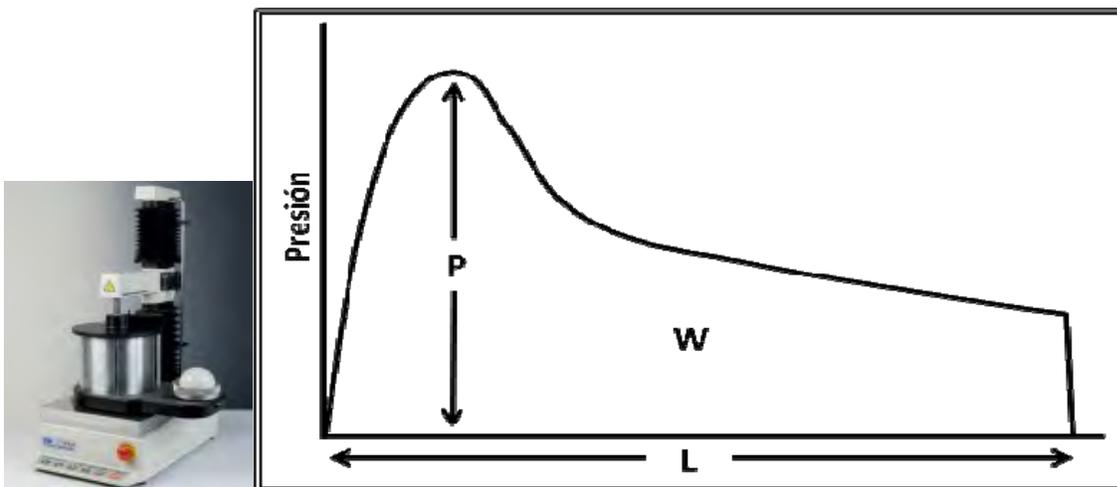
**2.3.2. Ensayos de extensión uniaxial y biaxial.** Los ensayos de extensión fueron realizados con un TA.XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems, Surrey, UK) utilizando el accesorio SMS/Kiefer Rig para la extensión uniaxial (Figura 5) y el de Dobraszczyk/Roberts para las mediciones de extensión biaxial (Figura 6). Las masas se elaboraron utilizando una formulación sencilla: 1,8% de sal, 58,5% de agua y las mismas dosis de enzima que las usadas en el ensayo de panificación. Los ingredientes fueron mezclados y amasados por 2,5 min utilizando una amasadora Philips HR 1495 (Philips, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente la masa se dejó reposar por 15 min a 30 °C antes del análisis.

➤ **Ensayo de extensión uniaxial.** La masa fue prensada en forma de tiras por 40 min. Las tiras obtenidas fueron extendidas a 3,3 mm/s hasta su ruptura. Se registraron curvas de fuerza vs. distancia (Figura 5). Mediante el programa Texture Expert 1.22 (Stable Micro Systems, Surrey, UK) se determinaron: la máxima resistencia a la extensibilidad ( $R_m$ , resistencia máxima, g), la distancia de extensión hasta ruptura ( $E_m$ , extensibilidad máxima, mm) y el área bajo la curva ( $A$ ).



**Figura 5.** Diagrama de la curva de extensión uniaxial.  $R_m$  = resistencia máxima a la extensión (g),  $E_m$  = extensibilidad máxima hasta ruptura (mm),  $A$  = área bajo la curva.

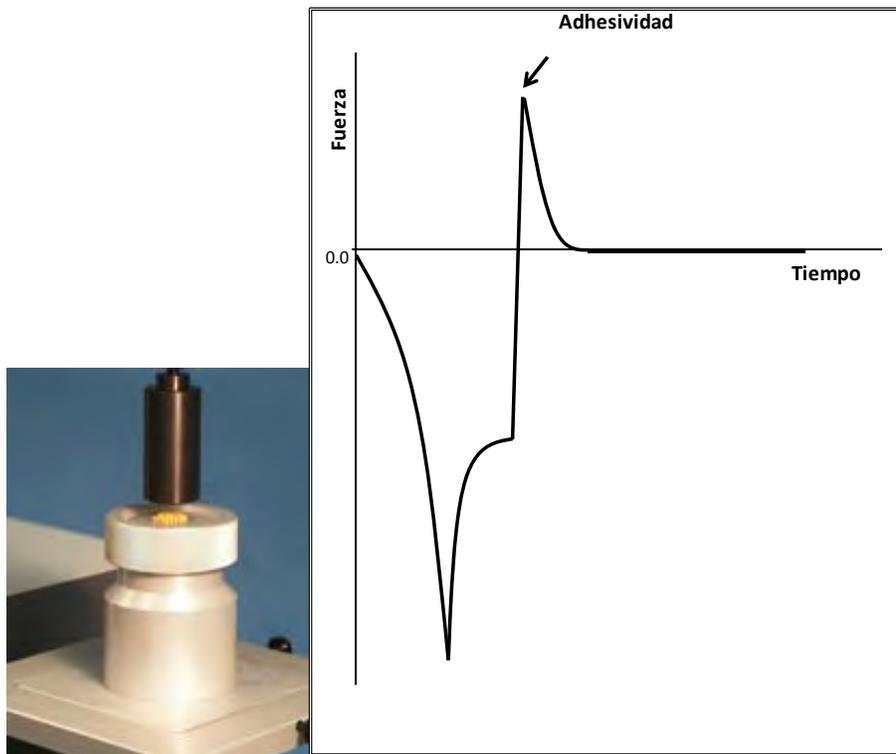
➤ **Ensayo de extensión biaxial.** Las determinaciones de extensibilidad biaxial son similares a las realizadas mediante un alveografo de Chopin. La masa fue dividida en discos de 27 mm de espesor y 55 mm de diámetro. Los discos fueron inflados a una velocidad de deformación constante de 0,1 mm/seg (Figura 6). Los resultados fueron graficados y analizados por el programa Dobraszcyk/Roberts sistema de inflación de masa. La curva obtenida es similar un alveograma (Figura 6), por lo que a partir de este ensayo se obtienen los mismo parámetro: el valor P (tenacidad o presión máxima de la burbuja), valor L (extensibilidad o la distancia en el punto de rotura de la masa), valor W (energía de deformación como el área bajo la curva de presión vs. distancia) y la relación P/L. Cabe destacar que los valores absolutos de cada uno de los parámetros obtenidos en los ensayos de extensión biaxial realizados con el texturómetro son más altos que los obtenidos a partir del alveógrafo de Chopin, sin embargo estos valores son comparables y permiten explicar las mismas propiedades de la masa.



**Figura 6.** Diagrama de la curva de extensión biaxial. **Valor P** = tenacidad, **valor L** = extensibilidad, **valor W** = trabajo.

**2.3.3. Ensayo de Adhesividad de la masa.** Las masas fueron elaboradas mediante el mismo procedimiento utilizado en los ensayos de extensión uniaxial y biaxial. La adhesividad de la masa fue medida por triplicado mediante TA.XT2i

Texture Analyzer (Stable Microsystems, Surrey, UK) equipado con una celda para adhesividad de masa SMS/Chen-Hoseney y con una sonda cilíndrica perspex de 25 mm acoplada (Figura 7). La masa fue colocada dentro de la celda y extruida tres veces eliminando los restos, posteriormente la masa fue comprimida 4 mm con la sonda cilíndrica utilizando una fuerza de 40 gf a una velocidad de pre-ensayo de 2 mm/s, una velocidad de ensayo de 2 mm/s y una velocidad de post-ensayo de 5 mm/s. Se registraron curvas de fuerza vs. tiempo (Figura 7) y la adhesividad de la masa fue medida como la fuerza requerida para despegar la sonda de la masa.



**Figura 7.** Diagrama de la curva de adhesividad. **Adhesividad:** fuerza requerida para despegar la sonda de la masa.

**2.3.4. Análisis de perfil de textura de la masa.** La curva de análisis de perfil de textura de la masa se determinó mediante TA.XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Surrey, Reino Unido) usando una sonda de 36 mm de diámetro y aplicando una deformación del 60%. Se fijó la misma velocidad de pre-

ensayo, ensayo y post-ensayo a 1mm/s y 75 s de tiempo de espera entre los ciclos de compresión. Las masas fueron elaboradas mediante el mismo procedimiento utilizado en los ensayos de extensión uni y biaxial. Dos trozos de masa planos de aproximadamente 50 g fueron sometidos a dos ciclos de compresión sucesivos. Se obtuvo la curva de TPA característica a partir de la cual se obtuvieron los mismos parámetros que en el análisis de perfil de textura de la miga de pan (Ensayo 2.2.2).

**2.3.5. Ensayos de reología dinámica.** Las masas elaboradas con harina de trigo poseen un comportamiento denominado viscoelástico. En los ensayos reométricos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante, las masas viscoelásticas responden a la deformación aplicada almacenando parte de la energía (componente elástica) y disipando la energía restante en forma de calor (componente viscosa).

La deformación oscilatoria aplicada al material es una función del tiempo y puede ser definida como:

$$\gamma = \gamma_0 \text{ sen } \omega t$$

donde  $\gamma_0$  es la deformación máxima o amplitud y  $\omega$  la velocidad angular o frecuencia.

Para un material perfectamente elástico, la onda de deformación se encontrará en fase con el esfuerzo aplicado. Considerando la respuesta de un sólido ideal, representada por la ecuación:

$$\sigma = G \gamma$$

donde  $\sigma$  es el esfuerzo aplicado,  $\gamma$  es la deformación relativa, y  $G$  es la constante de proporcionalidad. El esfuerzo correspondiente que se obtiene al reemplazar en dicha ecuación la deformación oscilatoria será:

$$\sigma = G \gamma_0 \text{ sen } (\omega t)$$

En una forma más general, esta ecuación puede escribirse como:

$$\sigma = \sigma_0 \text{ sen } (\omega t + \delta)$$

donde  $\sigma_0$  es el esfuerzo máximo que se alcanza y  $\delta$  el ángulo de desfase entre la respuesta y la perturbación aplicada. Por lo tanto comparando las ecuaciones anteriores puede decirse que para un sólido ideal el ángulo de desfase ( $\delta$ ) entre el esfuerzo aplicado y la deformación será de  $0^\circ$ .

Si en cambio, el ensayo se realiza sobre un material viscoso ideal, éste se deforma continuamente bajo la acción de un esfuerzo de corte siguiendo la ley de Newton.

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} = \eta d\gamma/dt$$

Si la deformación oscilatoria aplicada se deriva respecto del tiempo se obtiene la velocidad de deformación:

$$d\gamma/dt = \gamma_0 \omega \cos(\omega t)$$

Esta velocidad de deformación se introduce en la ecuación de Newton:

$$\sigma = \eta \omega \gamma_0 \cos(\omega t)$$

La ecuación anterior también puede escribirse como:

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t)$$

La ecuación anterior permite deducir que cuando se aplica una deformación sinusoidal, la respuesta obtenida también es sinusoidal ya que teniendo en cuenta las propiedades del seno y el coseno, la ecuación puede reescribirse como:

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta)$$

Al comparar la deformación sinusoidal aplicada con el esfuerzo obtenido se puede deducir que para un líquido viscoso ideal, la onda que representa la deformación oscilatoria se encuentra exactamente fuera de fase ( $\delta = 90^\circ$ ) con respecto a la correspondiente al esfuerzo (Steffe 1996).

Como se ha mencionado previamente, los materiales viscoelásticos presentan un comportamiento intermedio entre el correspondiente al viscoso ideal y al elástico ideal, por lo tanto las funciones trigonométricas que representan la deformación y el esfuerzo presentan ángulos de desfase entre  $0$  y  $90^\circ$  (Steffe 1996).

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

$$G^* = \sigma_0 / \gamma_0$$

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,  $G''$ .

$$G' = G^* \cos \delta$$

$$G'' = G^* \sin \delta$$

donde  $\delta$  es el ángulo de desfasaje 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  $G' = 0$ .

El módulo elástico ( $G'$ ) se encuentra vinculado a la energía que se almacena elásticamente en el sistema y puede ser recuperada cuando el esfuerzo aplicado es removido. El módulo de pérdida ( $G''$ ) es una medida de la energía perdida en forma de calor asociada al comportamiento viscoso.

Por último, de la relación de  $G'$  y  $G''$  surge otro parámetro importante y muy utilizado para caracterizar la naturaleza viscoelástica de un material: la tangente del ángulo de desfasaje ( $\tan \delta$ ).

$$\tan \delta = G''/G'$$

La tangente del ángulo de desfasaje también es función de la frecuencia y está directamente vinculada con la relación entre la energía perdida con respecto a la energía recuperada en cada ciclo. Puede variar entre 0 e infinito y cuanto menor su valor, mayor carácter elástico tiene el material estudiado.

Las propiedades reológicas dinámicas de las masas fueron determinadas utilizando un reómetro dinámico (Haake RS600, Karlsruhe, Germany). Los ensayos se efectuaron a 25 °C con una geometría de platos paralelos rugosos (PP30) y 1 mm de apertura. Las masas fueron elaboradas mediante el mismo procedimiento utilizado en los ensayos de extensión uni y biaxial. Una porción de masa fue colocada sobre el plato inferior mantenido a 25 °C. Se bajó el cabezal y

se eliminaron los bordes sobrantes de masa con una hoja de bisturí, se adicionó silicona de baja viscosidad alrededor de los bordes de los platos para evitar la deshidratación de la masa. La muestra se dejó descansar durante 5 min para relajar las tensiones producidas en la compresión antes de iniciar el ciclo de deformación.

Para determinar el rango de viscoelasticidad lineal de las masas se realizaron barridos de deformación (0,5 – 200 Pa) a frecuencia constante (1 Hz). Determinado el rango lineal, se eligió un esfuerzo en un rango dentro del cual fuera lineal con la deformación. Ese esfuerzo correspondió a una deformación,  $\gamma = 0,016\%$ . Sobre porciones nuevas de masas se realizaron barridos de frecuencia (0,03 – 10 Hz) a temperatura (25 °C) y deformación constante (0,016%) para analizar el comportamiento viscoelástico de las masas. A partir de los ensayos se obtuvieron el módulo de almacenamiento (módulo elástico,  $G'$ ), módulo de pérdida (módulo viscoso,  $G''$ ) y la  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ).

**2.3.6. Capacidad de expansión de la masa durante la fermentación.** La capacidad de expansión de la masa fue determinada según Ribotta *et al.* (2003). Se elaboraron masas con 1,8% de sal, 58,5% de agua (valor óptimo), 3% de levadura y enzimas. Se amasó durante 2,5 min con una amasadora Philips HR 1495 (Philips, Buenos Aires, Argentina), se dejó reposar 15 min y se extendió manualmente con el objeto de laminar y desgasificar la masa. Dos piezas de masa fueron colocadas en probetas graduadas de 1 L, dentro de una cámara de fermentación a 30 °C y cada 15 min se midió el aumento de volumen. Se graficaron curvas de volumen de crecimiento de la masa en función del tiempo de fermentación. Se analizaron el volumen máximo desarrollado y el tiempo necesario para obtener dicho volumen.

**2.3.7. Microestructura de la masa.** La microestructura de la masa se evaluó por microscopía electrónica de barrido. Las masas fueron preparadas como se describió previamente (Método 2.3.2), sin incluir levadura en su formulación, para prevenir cualquier cambio en la disposición estructural producida por la

fermentación. Pequeñas porciones de muestra fueron cortadas y fijadas en glutaraldehído (1:30) por 2 h y embebidas en un serie de soluciones de acetona en gradiente (25, 50, 75 y 80%) por 20 min en cada graduación. Luego las muestras fueron embebidas en 100% de acetona por tres intervalos consecutivos de 20 min para asegurar la completa deshidratación; para finalmente desecarlas por punto crítico. El secado por este método con CO<sub>2</sub>, que se efectúa en condiciones de temperatura y presión en la que el líquido y el vapor tienen la misma densidad, remueve la acetona sin provocar tensiones superficiales, ya que estas fuerzas pueden deformar la ultra estructura de la muestra. Las masas desecadas fueron cubiertas con partículas de oro formando una película de 300 Å con un metalizador Sputter Coater (Energy Beam Sciences, East Granby, Connecticut, Estados Unidos de América). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de barrido electrónico Jeol 35 CF (Jeol, Tokio, Japón) a 6 kV, utilizando una magnificación de 1000x, 5000x y 10000x.

#### **2.4. Caracterización química de los componentes de la masa.**

**2.4.1. Preparación de masas liofilizadas.** Se prepararon masas con harina de trigo, 58,5% de agua (valor óptimo) y las dosis de cada enzima mencionadas anteriormente (sección 2.1.1). Los ingredientes fueron amasados (amasadora HR 1495, Philips, Buenos Aires, Argentina) durante 2,5 min y la masa resultante se dejó reposar durante 1 h a 25 °C. Inmediatamente después las masas fueron congeladas, liofilizadas y almacenadas a -18 °C hasta su posterior análisis.

**2.4.2. Determinación del contenido de pentosanos.** La cuantificación de pentosanos totales y solubles se realizó siguiendo el método del Orcinol - HCl con las modificaciones realizadas por Hashimoto *et al.* (1987). La curva estándar para cuantificar pentosanos se determinó con una solución de xilosa (80 - 200 µg / 3 mL).

➤ **Pentosanos totales (PT).** Se pesaron 10 mg de masa liofilizada en tubos de 15 mL a los que se le adicionaron 2 mL de HCl 2 N. Se colocaron los tubos en baño de agua a 100 °C por 2,5 h. Pasado este tiempo se dejaron enfriar y las muestras se neutralizaron con 2 mL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 N. Se agregaron 2 mL de una suspensión (25 mg/mL) de levadura prensada (*Saccharomyces cerevisiae*) en buffer fosfato de sodio, pH 7. Los tubos se dejaron fermentar durante 2 h a 30 °C para eliminar los azúcares fermentables. La mezcla fue centrifugada a 1000 x g por 10 min. A 2 mL del sobrenadante se le adicionó 1 mL de agua destilada, 3 mL de FeCl<sub>3</sub> en HCl concentrado (0,1% p/v) y 0,3 mL de orcinol en etanol (1% v/v). La mezcla resultante se colocó 30 min en un baño a 100 °C. Posteriormente se dejaron enfriar los tubos y se determinó el contenido de pentosanos totales midiendo la absorbancia a 670 nm.

➤ **Pentosanos solubles en agua (PS).** A 100 mg de masa liofilizada se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se colocaron en un baño de agua a 30 °C por dos horas con agitación cada 30 min. Luego se centrifugó a 1000 x g por 15 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se sometió a hidrólisis con 1 mL de HCl 4 N durante 2 h a 100 °C. Después de este tiempo se dejó enfriar y se tomó una alícuota de 1 mL a la cual se le adicionó 1 mL de agua destilada, 3 mL de FeCl<sub>3</sub> en HCl concentrado (0,1% p/v) y 0,3 mL de orcinol en etanol (1% v/v). La mezcla resultante se colocó 30 min en un baño a 100 °C. Posteriormente se dejaron enfriar los tubos y se determinó el contenido de pentosanos solubles midiendo la absorbancia a 670 nm.

**2.4.3. Concentración de grupos sulfhidrilo libres (SHL).** La concentración de SHL fue determinada de acuerdo a Bak *et al.* (2000) con modificaciones de Hanft y Köeler (2006). La masa liofilizada (50 mg) fue mezclada con 50 µL buffer de reacción (8 M urea, 3 mM EDTA, 1% SDS, 0,2 M Tris – HCl y 10 mM 5,5-dithio-bis (2-acido nitro benzoico) (DTNB), pH 8); y 1,5 mL del mismo buffer sin DTNB, durante 25 min bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión fue centrifugada por 10 min a 3000 x g y la absorbancia del sobrenadante se midió a

412 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado fue  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La concentración de *SHL* fue expresada como  $\mu\text{mol}$  de *SHL* por g de masa liofilizada.

**2.4.4. Obtención del macropolímero de gluteninas (GMP).** El GMP fue obtenido de acuerdo a Don *et al.* (2003a,b,c). Las masas liofilizadas fueron suspendidas (1:20) en 1,5 mL de una solución de SDS 1,5% p/v. Las suspensiones se agitaron por 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron por 30 min a  $80000 \times g$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . El sobrenadante, denominado fracción de proteínas solubles en SDS (FPS-SDS), fue separado y almacenado a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. El precipitado resultante estuvo compuesto por una capa de gel de proteínas insolubles, denominado GMP, depositada sobre el almidón. El contenido total de proteínas del precipitado fue determinado por el método de Kjeldahl ( $N \times 5,7$ ) (Método 46-10, AACC Internacional 2000) y expresado como **porcentaje de proteínas del GMP** (g proteína GMP/100 g de masa liofilizada). Una alícuota de 400 mg del gel de proteínas (GMP) fue usado para determinar la **concentración de proteínas del GMP** expresada como mg de proteínas/g de GMP.

**2.4.5. Distribución de tamaño de partículas de GMP.** La distribución del tamaño de partículas de las dispersiones de GMP fue determinada mediante un analizador de la distribución de tamaño de partícula por láser (Analysette 22, F.A. Fritsch, Alemania) en un rango de 0,1 a  $1000 \mu\text{m}$ , por medidas del volumen superficial promedio,  $D_{3,2}$ .

Los instrumentos para la determinación del tamaño de partícula se basan en la difracción láser y utilizan el principio físico de la dispersión de las ondas electromagnéticas. Las partículas expuestas a un rayo láser paralelo desvían la luz con un ángulo sólido fijo que depende del diámetro de las partículas. Una lente enfoca la luz dispersada en los anillos de un sensor montado en el plano focal de la lente. La luz no difractada converge en el punto focal del eje óptico. Con la ayuda de matemáticas complejas, la distribución de la intensidad de la luz

dispersada puede utilizarse para calcular la distribución del tamaño de partícula del conjunto de partículas. La imagen difractada en el plano focal puede describirse de forma matemática con la ayuda de la óptica de Fourier. El principio de medición se basa en la propiedad de las lentes colectoras de realizar una transformada de Fourier bidimensional en el campo focal. Se obtiene como resultado, un diámetro de partícula que corresponde a la difracción láser de una partícula esférica con un diámetro equivalente. Se mide el promedio volumétrico de diámetros y la distribución del tamaño de partícula resultante es una distribución en función del volumen.

El GMP, para el análisis de la distribución del tamaño de partículas, fue obtenido como la capa de gel que fue encontrada sobre la fracción de almidón. Aproximadamente 1 g de GMP fue resuspendido en 10 mL de 1,5% de SDS (p/v) y homogeneizado por agitación durante 3 h sobre un agitador horizontal a temperatura ambiente.

**2.4.6. Propiedades reológicas dinámicas del GMP.** Las propiedades reológicas dinámicas del GMP fueron determinadas mediante un reómetro RS600 Haake (Karlsruhe, Alemania).

Los geles, las soluciones concentradas y las soluciones diluidas presentan comportamientos diferentes cuando son sometidos a barridos de frecuencia. Cuando se trata de un gel,  $G'$  es mayor que  $G''$  en todo el rango de frecuencia. En una solución concentrada (dispersión macromolecular entrelazada)  $G''$  es mayor que  $G'$  y ambas curvas se cruzan en el medio del rango de frecuencia mostrando una clara tendencia de un comportamiento más sólido cuando la frecuencia es alta. La frecuencia del cruce muchas veces es un criterio útil para evaluar al producto. Y por último en las soluciones diluidas (solución macromolecular)  $G''$  es mayor que  $G'$  en todo el rango de frecuencia y ambas curvas se acercan una a la otra a altas frecuencia (Steffe 1996)

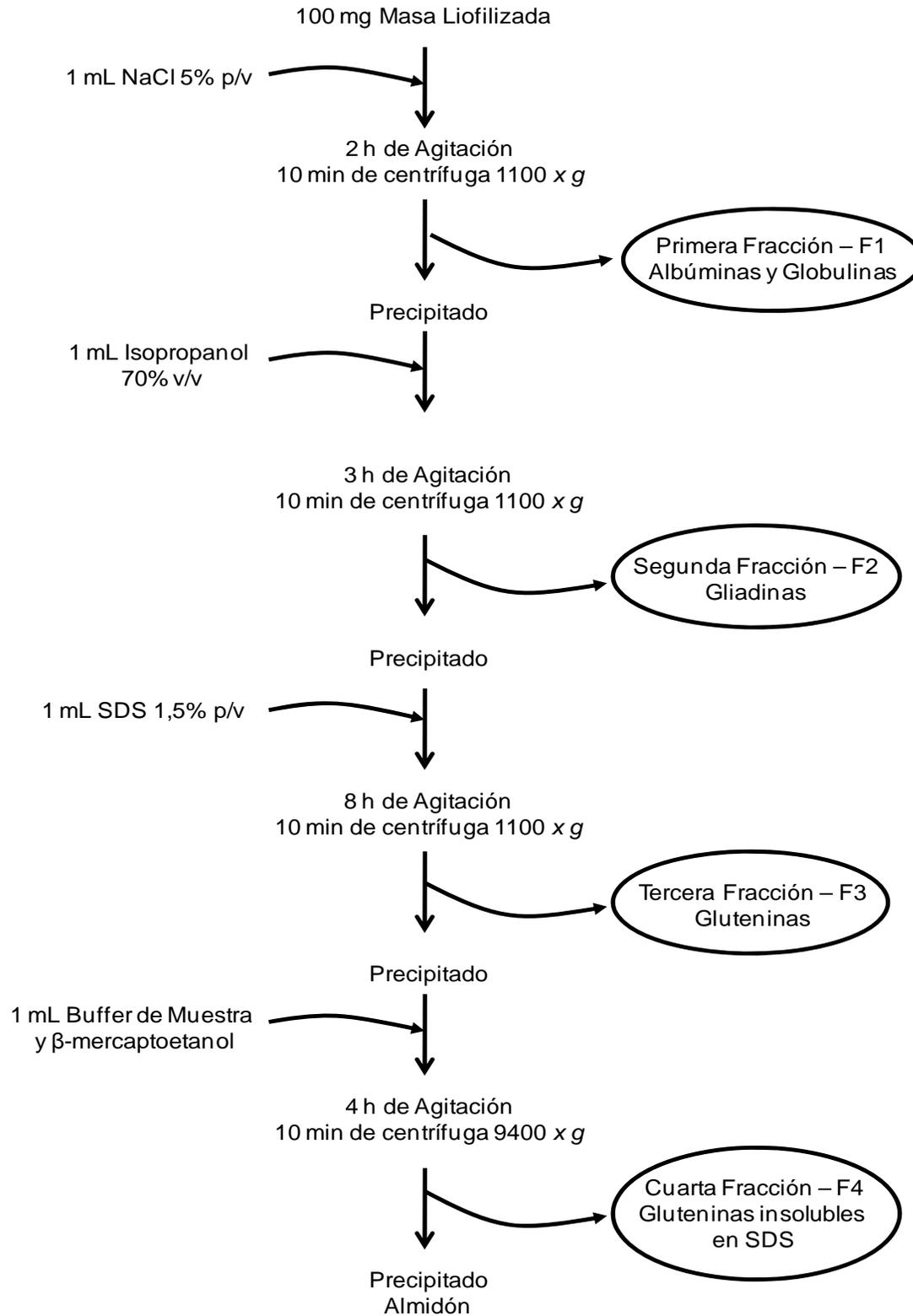
Para mediar las propiedades reológicas dinámicas del gel de proteínas se utilizó una geometría de platos paralelos rugosos (PP30) y 1 mm de apertura. El GMP obtenido a partir de las masas liofilizadas fue reposado por 24 h a 4 °C antes

de las mediciones. En primer lugar se realizó un barrido de deformación de 0,5 – 200 Pa a una frecuencia constante de 1 Hz para determinar el rango de viscoelasticidad lineal. Posteriormente se prosiguió a realizar los barridos de frecuencia de 0,03 – 10 Hz a una deformación fija de 0,032% (dentro del rango de viscoelasticidad lineal). A partir de estos ensayos se obtuvieron las variaciones del módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) y la  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) con respecto a la frecuencia aplicada.

**2.4.7. Proteínas del GMP.** A 100 mg de masa liofilizada se la suspendió en 1,5 mL de agua con agitación constante por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a  $3500 \times g$  por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue sometido dos veces más al mismo procedimiento. Por último, a partir del precipitado hidratado se extrajo el macropolímero de gluteninas mediante suspensión en 1,5 mL de SDS al 1,5% p/v, agitación durante 1 h y centrifugación a  $15600 \times g$  durante 30 min. Luego se descartó el sobrenadante y el precipitado resultante fue denominado 3H-GMP el cual fue posteriormente analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida.

El GMP obtenido según ensayo 2.4.4 y 3H-GMP fueron resuspendidos en buffer de muestra (0,063 M Tris - HCl pH 6,8; 1,5% p/v de SDS, 3% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromo fenol) para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida.

**2.4.8. Proteínas de la masa.** Las proteínas se extrajeron secuencialmente a partir de 100 mg de masa liofilizada (Figura 8). Cada paso de la extracción se realizó bajo agitación constante y las centrifugaciones se realizaron durante 10 min a  $1100 \times g$  y  $9400 \times g$  en el último paso.



**Figura 8.** Extracción secuencial de proteínas a partir de masa liofilizada.

La primera extracción se realizó con 1 mL de NaCl 0,5% p/v (F1) con agitación durante 2 h. El segundo paso de la extracción fue con 1 mL de isopropanol al 70% v/v (F2) con 3 h de agitación. El tercer paso fue con 1 mL de SDS 1,5% p/v (F3) con agitación por 8 h. El cuarto y último paso de extracción se realizó con 1 mL de buffer (0,063 M Tris - HCl pH 6,8; 1,5% p/v de SDS, 3% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromo fenol) (F4) con 4 h de agitación. El contenido de proteínas de cada fracción fue determinado por el método de Kjeldahl ( $N \times 5,7$ ) (Método 46-10, AACC Internacional 2000) y se expresó como porcentaje de proteínas de cada fracción, es decir, g proteína fracción / 100 g de masa liofilizada.

**2.4.9. Electroforesis bajo condiciones reductoras.** Cada fracción de la extracción secuencial de proteínas (F1-F4) y las proteínas del GMP fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. Las proteínas fueron resuspendidas en buffer de muestra (0,063 M Tris - HCl, pH 6,8; 1,5% p/v SDS, 3%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromofenol).

Las electroforesis se realizaron en placa (70 x 80 mm) en geles de 75 mm de espesor, de acuerdo al sistema de buffer 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 Estados Unidos de América). 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 (200000),  $\beta$ -galactosidasa (116250), fosforilasa b (97400), albúmina sérica (66200), ovoalbúmina (45000), anhidrasa carbónica (31000), inhibidor de tripsina (21500) y lisozima (14400) (Bio-Rad laboratories, Filadelfia, Estados Unidos de América).

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.

**2.4.10. Cuantificación de fracciones proteicas en los geles.** El análisis de las bandas proteicas en los geles se llevó a cabo por densitometría utilizando un equipo Pharmacia Biotech (Pharmacia Biotech, Estados Unidos de América) provisto con el programa Image Master VDS. Se usaron unas líneas tomadas en el gel a analizar para obtener los valores de “background”. El volumen de las bandas proteicas (IOD: densidad óptica integrada) es representado por el valor de intensidad media de la banda menos el valor obtenido del background multiplicado por el área de la banda.

La proporción de proteínas se informó como IOD relativa a la cantidad total de proteínas en la línea del gel, es decir, como la relación entre el valor de IOD de la banda y el valor de IOD total de la línea. Se realizaron al menos 3 determinaciones por punto, informándose el valor promedio.

## **2.5. Sistemas modelo glutenina-enzima**

**2.5.1. Extracción de gluteninas.** En primer lugar, a partir de la harina de trigo se extrajeron las gluteninas de acuerdo al fraccionamiento de proteínas según Osborne. La harina (4,5 g) fue suspendida en 45 mL de NaCl al 5% p/v con agitación constante durante 2 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3500 x g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue sometido a dos enjuagues con agua destilada. Sucesivamente se le adicionaron 45 mL de isopropanol al 70% v/v agitando constantemente durante 2 h, luego se centrifugó nuevamente a 3500 x g por 10 min y el precipitado resultante fue enjuagado nuevamente con agua destilada. Por último, se agregaron 45 mL de ácido acético 0,05 M, se agitó durante 2 h y se centrifugó a 3500 x g durante 10 min. Las gluteninas presentes en el sobrenadante ácido fueron liofilizadas y se almacenaron a -18 °C para su posterior análisis.

**2.5.2. Incubación glutenina-enzima.** Debido a que la transglutaminasa cataliza reacciones de polimerización de gluteninas y es la enzima que más cambios introduce en las proteínas de gluten se prosiguió a incubar las gluteninas con TG y analizar la reacción de polimerización mediante SDS-PAGE. Las gluteninas (30 mg) fueron suspendidas en 0,9 mL de agua destilada con agitación constante durante 1 h. Luego se adicionó 0,1 mL de una solución de transglutaminasa al 1,5% p/v y la mezcla se incubó en estufa a 40 °C durante 24 h. La relación enzima - gluteninas fue 5% p/p. Se tomaron alícuotas de la mezcla a distintos tiempos (0, 15 y 30 min, y 1, 6 y 24 h) y cada una de ellas se le adicionó buffer de muestra (0,063 M Tris - HCl pH 6,8; 1,5% p/v de SDS, 3% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromo fenol) para detener la reacción enzimática. Las gluteninas incubadas con transglutaminasa fueron posteriormente analizadas por electroforesis SDS-PAGE, según procedimiento descrito en sección 2.4.9.

**2.5.3. Propiedades reológicas de mezclas gluten-enzima.** Se trabajó con gluten vital de trigo comercial (CBH Qingdao, China), y se utilizó una relación 1:1,8 de sólido-líquido la cual permitió un correcto desarrollo del gluten. Las mezclas gluten-enzima-agua fueron amasadas durante 2,5 min (amasadora HR 1495, Philips, Buenos Aires, Argentina) y se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente. Una porción de las muestras fue prensada y se dejó relajar por 45 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se cortaron 4 discos con un espesor 27 mm y un diámetro de 55 mm. Cada muestra fue sometida a un ensayo de deformación y recuperación (TA.XT2i Texture Analyzer, Surrey, Reino Unido), donde cada disco fue comprimido por una fuerza constante de 1,39 kPa durante 45 s. De las curvas obtenidas (deformación vs. tiempo) se analizaron la deformación máxima alcanzada, que es una medida de la resistencia que opone el sistema al esfuerzo aplicado, y la diferencia entre la deformación máxima y la deformación alcanzada luego de retirar el esfuerzo aplicado sobre la masa. Este último parámetro es una

medida del nivel de recuperación del sistema luego de retirar el esfuerzo aplicado (Texture Expert 1.22, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido).

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el software estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y se informó el promedio. Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). En el caso de presentar diferencias, la comparación de las medias se realizó mediante el test de Fisher's (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  $p \leq 0,05$ .

Para la optimización de la formulación del pan se generó un diseño central compuesto rotatable con tres factores y cinco niveles utilizando un proceso de regresión de superficie de respuesta (Statgraphics plus 5.0). Mediante éste diseño se estudió el efecto de los tres factores (enzimas) en 18 panificaciones. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorio para evitar efectos de variables ocultas. Se hicieron cuatro réplicas del punto central para permitir la estimación del error puro mediante la suma de cuadrados. Los resultados fueron analizados mediante el método de regresión múltiple. La calidad de los modelos ajustados fueron evaluados mediante ANOVA (Statgraphics plus 5.0) y para el ajuste de cada modelo de los datos experimentales se obtuvo el coeficiente de determinación  $R^2$ . Se desarrollaron ecuaciones de regresión múltiple solo con coeficientes significativos ( $p \leq 0,05$ ). Para cada parámetro de calidad se generaron los gráficos de superficies de respuestas bidimensionales. El cálculo de las condiciones óptimas para el proceso de panificación combinando enzimas fue determinado usando un método de respuesta múltiple llamado "conveniencia".

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

PRIMERA SECCIÓN:  
**PENTOSANASA**

## **1. Efecto de la enzima pentosanasa sobre la calidad del pan**

En la Tabla 1.1 se presentan los valores de volumen específico (VE) de los panes elaborados con y sin enzima. El agregado de Pn en la formulación permitió el desarrollo de un mayor volumen específico de pan en ambas dosis analizadas. La dosis más elevada de enzima utilizada tuvo un incremento de un 12,2% del volumen respecto al control elaborado sin enzima. Jiang *et al.* (2005) utilizaron una xilanaso termoestable y observaron un incremento del volumen específico del pan a medida que se aumentaba la dosis de enzima utilizada, pero el incremento solo se produjo hasta una concentración óptima de 120 ppm. Estas observaciones ya habían sido consideradas por Courtin y Delcour (2002) quienes afirmaron que dependiendo de la concentración y de la especificidad de la enzima, las endoxilasas causan distintos efectos sobre los parámetros de calidad del pan. Basados en datos de literatura, se estimó que las diferencias observadas en el nivel de solubilización de los arabinosilanos durante el reposo de la masa entre harinas con alta y baja actividad de xilasas (asociadas a la harina) podían causar un incremento del volumen de pan de hasta un 14% o una disminución del 5% dependiendo de la selectividad de la enzima (Dornez *et al.* 2007). Por lo que se cree que el efecto mejorador de las xilasas es debido a la conversión de arabinosilanos insolubles en solubles de alto peso molecular. Una mayor disminución del peso molecular de los arabinosilanos causa efectos negativos sobre la calidad del pan (Courtin & Delcour 2005).

Otros parámetros de calidad muy utilizados para analizar el efecto de los aditivos en el pan son los obtenidos a partir del análisis de perfil de textura de la miga, ya que se relacionan frecuentemente con la percepción del consumidor. Por lo general, los consumidores prefieren panes con una corteza crujiente y con una miga tierna y aireada. La masticabilidad simula la cantidad de energía necesaria para desintegrar el alimento sólido hasta deglutirlo. Los panes elaborados con Pn presentaron una miga del pan fresco con menores valores de firmeza y de masticabilidad respecto al control (Tabla 1.1). Los coeficientes de correlación (Pearson) entre el volumen específico de pan y los parámetros de textura, tales

como firmeza y masticabilidad de la miga de pan fresco, fueron  $r = -0,96$  y  $r = -0,95$  ( $p \leq 0,05$ ) respectivamente. El agregado de enzima produjo un aumento del volumen de pan y concomitantemente productos con una miga más tierna y más fácil de desintegrar al momento de consumirla. Estos resultados fueron coincidentes con los publicados por otros autores (Martínez-Anaya *et al.* 1997, Laurikainen *et al.* 1998, Gil *et al.* 1999, Courtin *et al.* 2001, Haros *et al.* 2002, Jiang *et al.* 2005, Caballero *et al.* 2007).

**Tabla 1.1.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre las características del pan fresco.

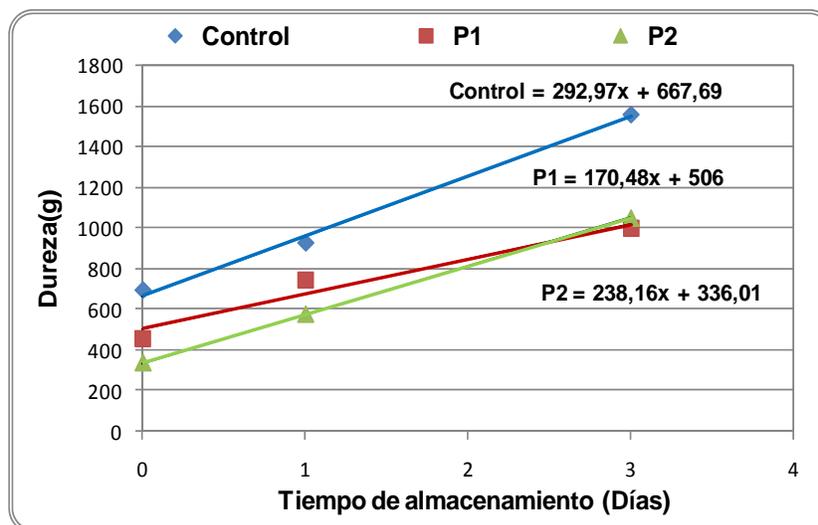
Variable	Control	P1	P2
<b>VE (cm<sup>3</sup>/g)</b>	4,67a	4,98b	5,24c
<b>Dureza (g)</b>	691,40c	459,84b	335,35a
<b>Masticabilidad (g)</b>	441,63c	308,74b	223,02a

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

Control: pan elaborado sin enzima. P1: pan elaborado con 0,006% de pentosanasa. P2: pan elaborado con 0,012% de pentosanasa.

La pérdida de frescura del pan durante el almacenamiento disminuye la aceptabilidad de los consumidores. Este fenómeno se conoce como envejecimiento del pan y consta de los siguientes efectos: endurecimiento de la miga, pérdida de crujibilidad de la corteza y deterioro de las propiedades organolépticas (Cauvian 1998). En las tres formulaciones, la firmeza de la miga de pan aumentó con el tiempo de almacenamiento. El cálculo de la pendiente de los puntos de dureza de la miga de pan de cada una de las muestras presentadas en la Figura 1.1 nos proporciona una idea de la velocidad de endurecimiento de la miga de pan. Por lo que se puede afirmar que la velocidad de endurecimiento de la miga fue levemente menor en los panes elaborados con Pn (Figura 1.1). Es generalmente aceptado que dos de las razones del envejecimiento son la pérdida

de humedad de la miga y la retrogradación de la amilopectina en el pan. El efecto de la xilanasa sobre la velocidad de endurecimiento de la miga de pan aún no está claro, algunos autores han postulado un efecto positivo (Martínez-Anaya *et al.* 1997, Laurikainen *et al.* 1998, Gil *et al.* 1999, Haros *et al.* 2002, Jiang *et al.* 2005, Caballero *et al.* 2007) debido a que los pentosanos de menor tamaño molecular, producto de la acción de la xilanasa, dificultan la retrogradación de la amilopectina, por lo que hacen más lento este proceso (Kim & D'Appolonia 1977b). Sin embargo otros autores (Courtin *et al.* 2001) observaron un marcado efecto sobre la firmeza del pan fresco, probablemente debido al mayor volumen desarrollado (Gil *et al.* 1999) y sólo una pequeña disminución de la velocidad de endurecimiento de la miga. Las diferencias encontradas con respecto a la velocidad de endurecimiento de la miga pueden ser atribuidas a la existencia de diferentes variedades de xilanasas entre los aditivos y a la variación de sustratos presentes de acuerdo a la materia prima y al tipo de producto.



**Figura 1.1.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre la dureza (g) de la miga de pan a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento. Control: pan elaborado sin enzima. P1: pan elaborado con 0,006% de pentosanasa. P2: pan elaborado con 0,012% de pentosanasa.

En la Figura 1.2 se muestran fotografías de los panes elaborados con pentosana y del pan control. En resumen, el uso de Pn en la formulación permite

obtener panes con alto volumen específico, baja firmeza y masticabilidad, y con una estructura de la miga más abierta con grandes alveolos. Estas diferencias con respecto al control pueden deberse al reforzamiento de la estructura de las celdas de gas por los pentosanos solubles de menor tamaño que permiten retener más CO<sub>2</sub> (Martínez-Anaya & Jiménez 1997, Jiménez & Martínez-Anaya 2001) y a cambios en la redistribución del agua.

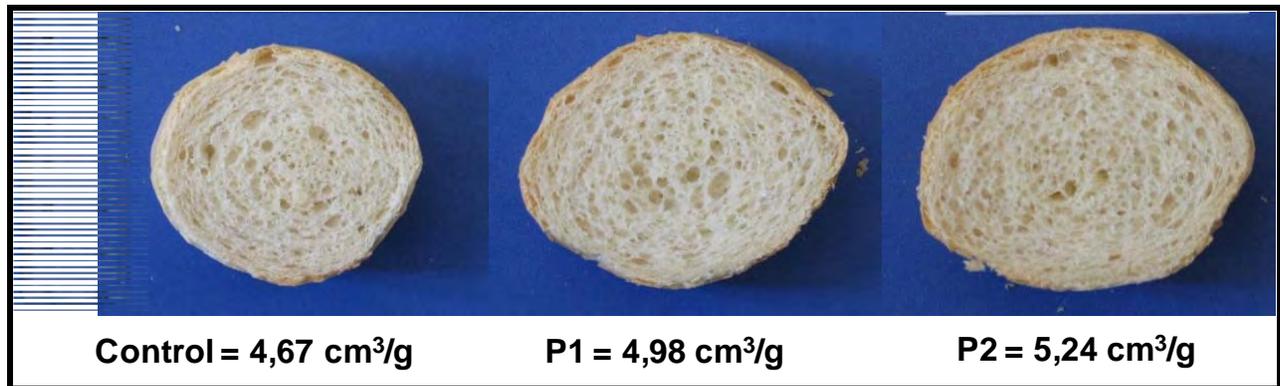


Figura 1.2. Fotos de panes sin (Control) y con pentosanasa 0,006% (P1) y 0,012% (P2).

## 2. Efecto de la enzima pentosanasa sobre las propiedades reológicas de la masa.

El análisis de las propiedades reológicas de la masa es muy importante, ya que permite prever su comportamiento durante el proceso de elaboración de los productos. Uno de los ensayos más comúnmente utilizado para analizar el comportamiento de la masa durante el amasado es el ensayo farinográfico.

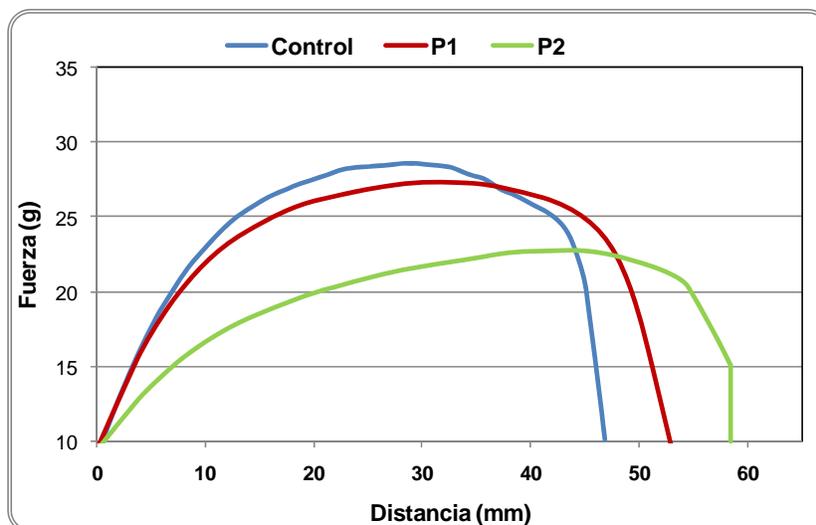
En el presente estudio no se observaron diferencias en los parámetros farinográficos entre las muestras elaboradas con Pn y el control (Tabla 1.2). Sin embargo, el agregado de la enzima pentosanasa promovió una leve disminución de la estabilidad y de la tolerancia de la masa al sobreamasado. Jiang *et al.* (2005) estudiaron el efecto de una enzima xilanasa recombinante termoestable y postularon que ésta causaba disminución de la absorción de agua, del tiempo de desarrollo y de la estabilidad de las masas.

**Tabla 1.2.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre los parámetros farinográficos.

Variable	Control	P1	P2
<b>Ab (%)</b>	63,4	63,3	63,4
<b>TD (min)</b>	10,0	10,5	9,5
<b>E (min)</b>	16,9	15,6	14,8

Ab: absorción farinográfica de agua, TD: tiempo de desarrollo de la masa, E: estabilidad de la masa. Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

Existen varios equipos que permiten estudiar el efecto de los aditivos sobre la maleabilidad de la masa durante la elaboración del producto y a su vez permiten hacer algunas predicciones de las características del producto final. Entre los más utilizados se encuentran el extensógrafo de Brabender y el alveógrafo de Chopin. En el primero de los ensayos se somete a la masa a una deformación uniaxial y a partir de la curva registrada se determina principalmente la resistencia máxima a la deformación ( $R_m$ ) o altura máxima de la curva y la extensibilidad máxima ( $E_m$ ) o longitud de la curva. En el segundo ensayo se somete a la masa a una deformación biaxial y de la curva resultante se determina el valor P o tenacidad, el valor L o extensibilidad, la relación entre ellos ( $P/L$ ) y el área de la curva o fuerza panadera ( $W$ ). En este trabajo, ambos ensayos se realizaron utilizando los accesorios específicos de un texturómetro TA-XT 2. Cabe destacar que los valores absolutos de cada uno de los parámetros obtenidos en ambos ensayos realizados con el texturómetro son más altos que los obtenidos a partir del extensógrafo de Brabender y del alveógrafo de Chopin, de todas maneras, estos valores son comparables y permiten explicar las mismas propiedades de la masa. Las masas fueron elaboradas según método 2.3.2 de la sección Materiales y Métodos.



**Figura 1.3.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre la extensibilidad de la masa. Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

En la Figura 1.3 se muestran las curvas obtenidas en los ensayos de extensión uniaxial de las masas elaboradas con Pn y el control. El agregado de la enzima en la formulación causó un aumento de la extensibilidad y una disminución de la resistencia a la deformación cuando la dosis fue alta (Tabla 1.3). Estos resultados son coincidentes con los parámetros obtenidos en el ensayo de extensión biaxial, donde las masas con 0,012% de Pn tuvieron menor valor de P y mayor de L que la masa control (Tabla 1.3). Resultados similares fueron presentados por Primo-Martín *et al.* (2003) y Selinheimo *et al.* (2006). En resumen, las masas elaboradas con la enzima Pn poseen menos tenacidad, pero son más extensibles, lo que indica que la enzima modificó las propiedades de agregación de la red de gluten. Van Oort *et al.* (1995) en su trabajo sugirieron que el menor tamaño de los pentosanos, resultado de la acción hidrolítica de la xilanasas, llevó a una mejor agregación de la red de gluten. Otros autores (Martínez Anaya & Jiménez 1998, Selinheimo *et al.* 2006) propusieron que el menor tamaño de los pentosanos conduce a una redistribución del agua de los pentosanos hacia el gluten, introduciendo modificaciones en la red, lo cual resulta en cambios en las propiedades viscoelásticas de la masa. Contrariamente, Wang *et al.* (2002)

postularon que el agregado de los pentosanos solubles en agua tiene un efecto negativo sobre el rendimiento del gluten interfiriendo en su formación. Por su naturaleza, los pentosanos solubles compiten por el agua modificando las condiciones de desarrollo del gluten aumentando la resistencia a la extensión y disminuyendo la extensibilidad. Sin embargo, éste mismo autor en un trabajo posterior (Wang *et al.* 2005) observó que el agregado de xilanasa causaba una disminución de la resistencia a la extensión y un incremento de la extensibilidad del gluten.

**Tabla 1.3.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre los parámetros de extensión uniaxial, biaxial y de reología dinámica.

Variable	Control	P1	P2
<b>Extensión uniaxial</b>			
Rm (g)	29,1a	28,6a	23,1b
Em (mm)	46,7a	52,7b	58,7b
Área (g mm)	1059a	1327b	1320b
<b>Extensión biaxial</b>			
Valor P (mm)	188b	170b	123 <sup>a</sup>
Valor L (mm)	64a	78a	108b
W (Jx10 <sup>4</sup> )	524a	573a	544 <sup>a</sup>
P/L	2,96b	2,25b	1,16 <sup>a</sup>
<b>Viscoelasticidad</b>			
G' (kPa)*	15,17c	13,12b	11,49 <sup>a</sup>
G'' (kPa)*	5,18c	4,45b	3,92 <sup>a</sup>
tan δ*	0,34a	0,34a	0,34 <sup>a</sup>

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

\*Fueron determinados a 0,1 Hz.

Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa.

P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

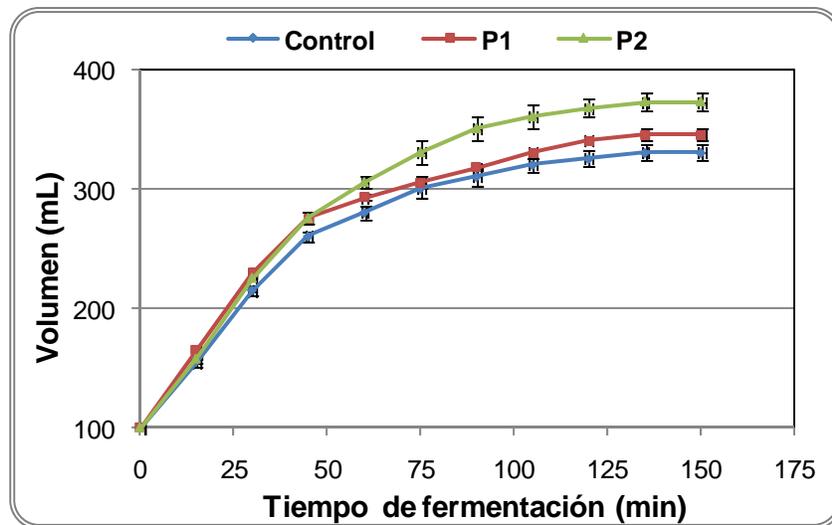
Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la disminución del impedimento estérico de los pentosanos insolubles, gracias a la acción de la enzima Pn, condujo a cambios en las interacciones entre las proteínas, el agua y los demás componentes de la masa haciendo que ésta sea más extensible.

Los ensayos reológicos dinámicos se han convertido en una herramienta valiosa para examinar la estructura y las propiedades fundamentales de la masa y de las proteínas de la harina de trigo, porque sus respuestas son sensibles a las variaciones en la estructura de la masa. El farinógrafo, extensógrafo y alveógrafo son instrumentos que brindan información práctica para la industria panadera, pero no brindan la información suficiente para interpretar el comportamiento fundamental de la masa. Los ensayos dinámicos, especialmente en la región viscoelástica lineal, se han usado para comprender la estructura y las propiedades de la masa y para estudiar la función de los ingredientes (Miller & Hosney 1999). Estos ensayos miden simultáneamente características viscosas y elásticas de la masa como módulo de pérdida ( $G''$ ), módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y la tangente  $\delta$  ( $\tan \delta$ ). Tanto en las masas elaboradas con Pn como en el control, los valores de  $G'$  fueron mayores que los de  $G''$  en todo el rango de frecuencia (0,03 a 100 Hz), indicando un comportamiento viscoelástico de las masas.

En la Tabla 1.3 se presentan los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  a 0,1 Hz obtenidos a partir de los barridos de frecuencia. Ambos módulos disminuyeron significativamente con el agregado y con el aumento del nivel de enzima. Miller y Hosney (1999) postularon que los pentosanos insolubles en agua afectan la agregación de la red de gluten. Sin embargo en un trabajo reciente (Fu-min Ma *et al.* 2009) se postuló que los pentosanos insolubles en agua mejoran las propiedades viscoelásticas del gluten con el incremento del porcentaje de agua. En éste trabajo las masas elaboradas con Pn presentaron menores valores del módulo elástico y viscoso comparados con la masa control indicando una disminución de la componente elástica y de la componente viscosa de la masa. Caballero *et al.* (2007) observaron que las masas elaboradas con Pn después de 180 minutos de reposo tenían menores valores del módulo elástico y viscoso comparado con la masa control. Martínez Anaya y Jiménez (1997, 1998) ya

habían publicado que las enzimas hidrolíticas que actúan sobre los carbohidratos causan una rápida respuesta (disminución de la viscosidad) en la reología de la masa y su efecto continúa durante el reposo. La transformación de pentosanos insolubles (PI) a pentosanos solubles (PS) por acción de la enzima conduce a una redistribución del agua, esto provoca cambios en las interacciones proteicas disminuyendo ambos módulos. En el comportamiento viscoelástico de las masas de harina de trigo, la cantidad de agua tiene un rol importante, ya que se comporta como un relleno inerte reduciendo las propiedades dinámicas proporcionalmente y como un lubricante mejorando la plasticidad (Masi *et al.* 1998). Generalmente se encuentra que masas de pobre calidad tienen valores de  $\tan \delta$  mayores que masas de buena calidad. Sin embargo en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los valores de  $\tan \delta$  indicando que las masas con Pn y la masa control poseen igual viscoelasticidad.

Durante la elaboración del pan, inicialmente se produce una pérdida de gas que se debe principalmente a la difusión del  $\text{CO}_2$  hacia la superficie externa de la masa para su evaporación. Hacia el final de la cocción las pérdidas de gas son mayores y se deben principalmente a la ruptura de la matriz proteína-almidón que rodea las celdas de gas (Gan *et al.* 1995). Una forma de medir la capacidad de expansión de las masas durante la fermentación es mediante un ensayo simple en donde se registra el aumento del volumen de las masas con respecto al tiempo transcurrido. En la Figura 1.4 se muestra el incremento de volumen de la masa vs. tiempo de fermentación de las muestras elaboradas con Pn y la muestra control. La enzima Pn permitió desarrollar una mayor expansión de la masa durante la fermentación sin perder la capacidad para retener el  $\text{CO}_2$  ya que no se observaron burbujas en la superficie de la masa. El mayor contenido de pentosanos de menor tamaño, debido a la acción de la enzima Pn, promueve su reubicación en las interfaces de las celdas de gas entre la matriz proteína-almidón y  $\text{CO}_2$  mejorando la capacidad de expansión de los alveolos sin que ocurran pérdidas de gas.



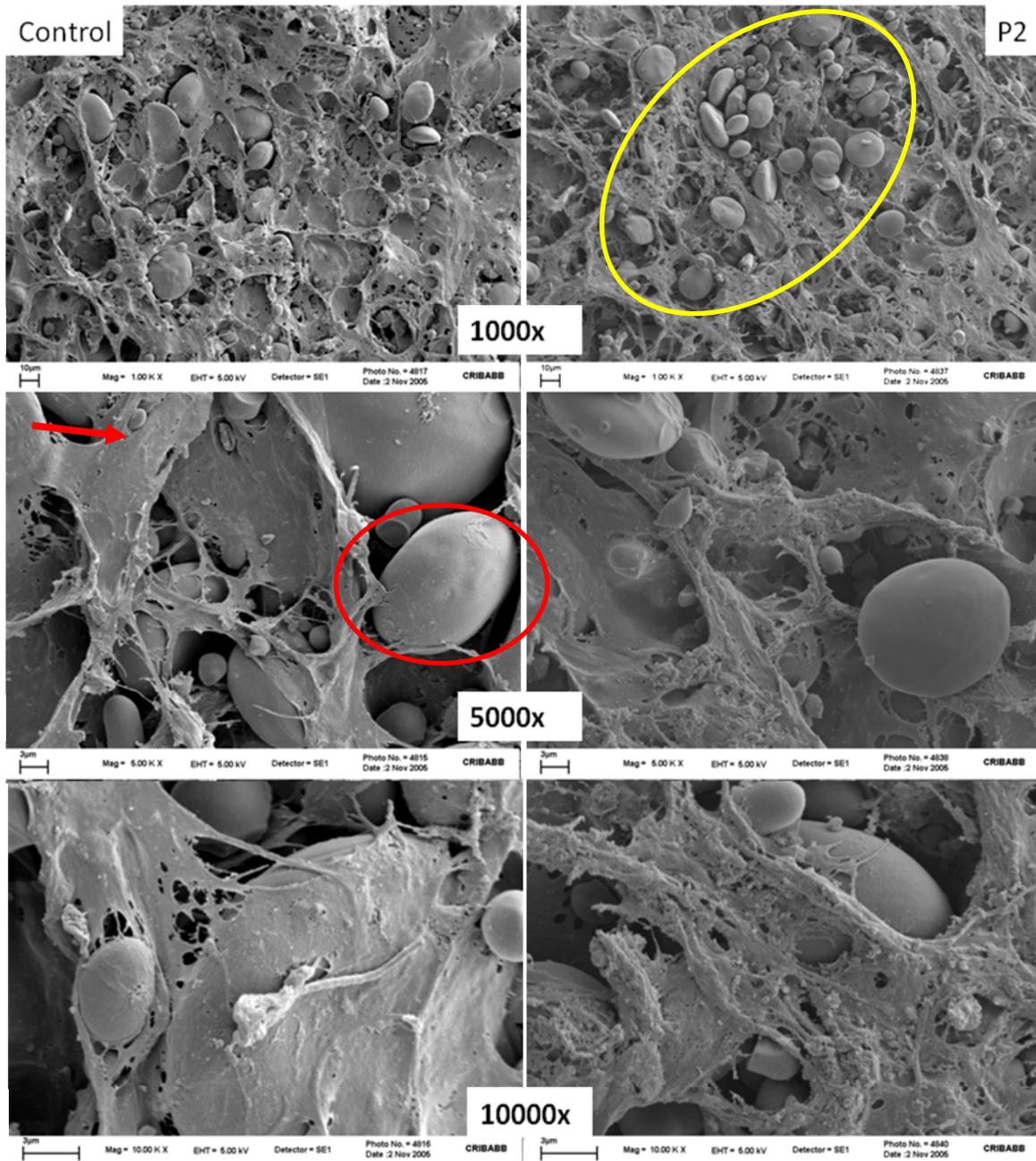
**Figura 1.4.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre expansión de la masa durante el tiempo de fermentación. Incremento del volumen (mL) de la masa vs. el tiempo (min) de fermentación. Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

### 3. Efecto de la enzima pentosanasa sobre la microestructura de la masa.

El análisis de la microestructura de las masas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido. Las masas fueron preparadas de acuerdo al método 2.3.2 de la sección Materiales y Métodos, sin incluir en la formulación levadura para prevenir cualquier cambio en la disposición estructural producida por la fermentación. Rojas *et al.* (2000) describieron a la masa de harina de trigo como una matriz continua correspondiente a la red de gluten que tiene inmersos los gránulos de almidón. En la Figura 1.5 se muestran las microfotografías de las masas elaboradas sin enzima (control) y con 0,012% de pentosanasa (P2) a diferentes aumentos (1000x, 5000x y 10000x). En la microfotografía del control (5000x) se señaló con un círculo rojo a un gránulo de almidón y con una flecha roja a las fibras de gluten.

En las microfotografías de las masas con un aumento de 1000 x se observó que el agregado de Pn promovió la formación de una microestructura levemente diferente a la masa control. La masa elaborada con 0,012% de Pn presentó una

matriz proteica más abierta con un mayor número y tamaño de poros que la masa control, donde los gránulos de almidón fueron más visibles (círculo amarillo).



**Figura 1.5.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre la microestructura de la masa. Microfotografías de masas elaboradas sin enzima (Control) y con 0,012% de pentosanasa (P2). Aumentos: 1000x, 5000x y 10000x.

Las microfotografías con aumento 5000x y 10000x permitieron ver más en detalle la microestructura de la red de gluten. En éstas se observó que la matriz proteica de la masa con Pn fue menos continua con fibras de gluten más porosas y menos uniformes en comparación con la matriz proteica de la masa control.

#### **4. Caracterización química de los componentes de la masa.**

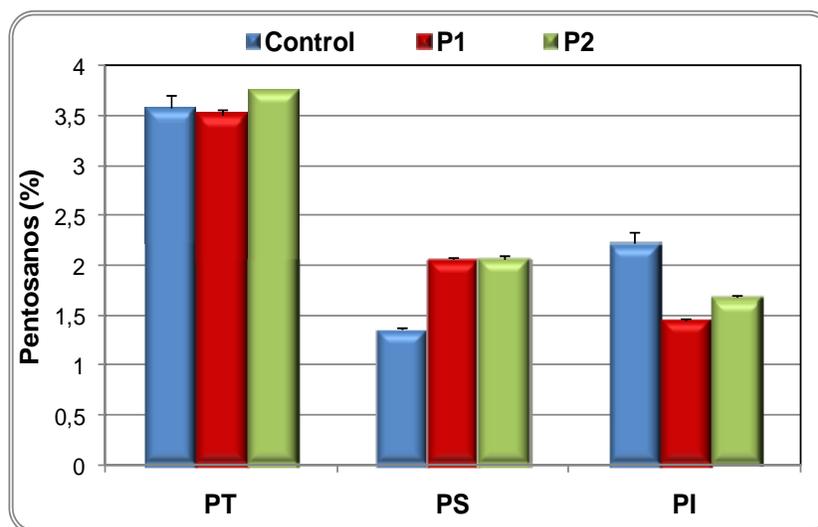
Con el objetivo de estudiar los cambios que sufren las proteínas y los pentosanos de la harina debido a la acción de la enzima Pn, las siguientes determinaciones se realizaron a partir de masas elaboradas, reposadas durante una hora simulando la fermentación (el tiempo de reposo favorece la acción de la enzima y permite que se restablezcan interacciones que durante el amasado fueron modificadas) y liofilizadas.

##### ***4.1. Efecto de la enzima pentosanasa sobre los pentosanos de la masa.***

Los pentosanos fueron los primeros componentes analizados, ya que ésta enzima actúa directamente sobre ellos. Los polisacáridos no-almidonosos representan entre 2,5 y 3,5% aproximadamente de la harina, sin embargo poseen mucha influencia sobre las propiedades de la masa. Se prosiguió entonces a determinar el contenido de pentosanos totales (PT) y pentosanos solubles en agua (PS) de las masas liofilizadas sin enzima (control) y con el agregado de ambas dosis de enzima. El contenido de pentosanos insolubles (PI) se determinó como la diferencia entre el contenido de PT y el contenido de PS ( $PI = PT - PS$ ).

No se observaron diferencias en el contenido de pentosanos totales entre las distintas muestras (Figura 1.6), ya que todas las masas fueron elaboradas utilizando la misma harina en la formulación básica. Las masas en las que se incluyó Pn en la elaboración presentaron mayor contenido de pentosanos solubles en agua que la masa control (sin enzima). Este resultado permitió comprobar la hidrólisis de los pentosanos insolubles en agua por acción de la enzima que gracias a su menor tamaño fue posible su extracción con agua. Las dos dosis de Pn presentaron el mismo contenido de PS, esto podría deberse a que cuando la enzima Pn es agregada en altas proporciones comienza a actuar sobre los

pentosanos ya solubles en agua disminuyendo aún más el peso molecular de los mismos, pero este efecto no modifica el contenido total de pentosanos solubles. En consecuencia, el contenido de pentosanos insolubles disminuyó significativamente en éstas muestras con respecto a la masa control.



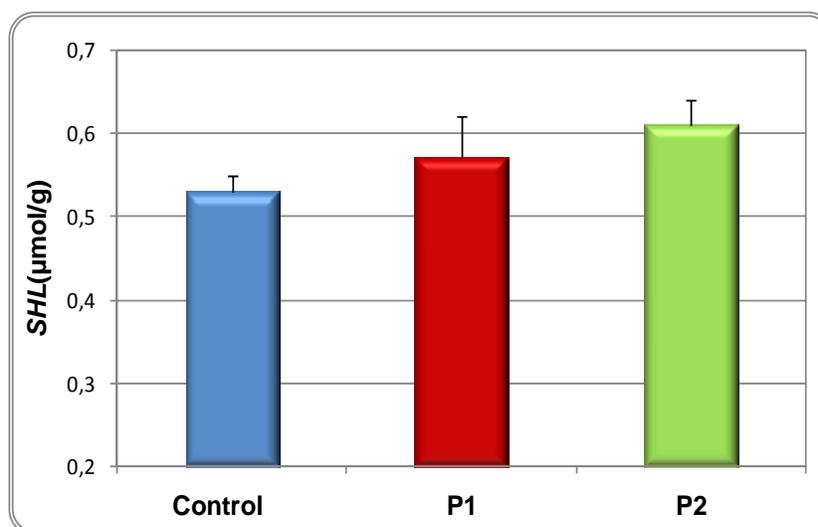
**Figura 1.6.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre los pentosanos de las masas liofilizadas. PT: Pentosanos Totales, PS: Pentosanos Solubles, PI: Pentosanos Insolubles. Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

#### **4.2. Efecto de la enzima pentosanasa sobre las proteínas de la masa.**

##### **4.2.1. Determinación de la concentración de grupos sulfhidrilo libres (SHL).**

La comparación de las concentraciones de grupos sulfhidrilo libres entre las muestras y la masa control permitió efectuar algunas conclusiones en referencia al grado de entrecruzamiento entre las proteínas que constituyen principalmente la red de gluten. Las masas elaboradas con Pn tuvieron un leve incremento de la concentración de SHL (Figura 1.7), solo la dosis de enzima más elevada utilizada (0,012%) causó un cambio significativo respecto a la masa control. El tamaño molecular de los pentosanos disminuyó debido a la acción de la enzima, como consecuencia del menor impedimento estérico hubo una mayor interacción entre

pentosanos solubles y proteínas lo que pudo haber dificultado la formación de puentes disulfuro o se pudo haber favorecido la exposición de aquellos grupos *SHL* que se encontraban ocultos en la masa control. Fessas y Schiraldi (2003) estudiaron las interacciones entre los arabinosilanos y las proteínas del gluten y observaron que los pentosanos solubles en agua de alto peso molecular causaban un aumento de los grupos sulfhidrilo libres (*SHL*) en las proteínas del gluten. Ellos sugirieron que los pentosanos solubles de alto peso molecular se ubican en posiciones intermedias entre las proteínas del gluten dificultando su entrecruzamiento, dando como resultado una red menos entrelazada.

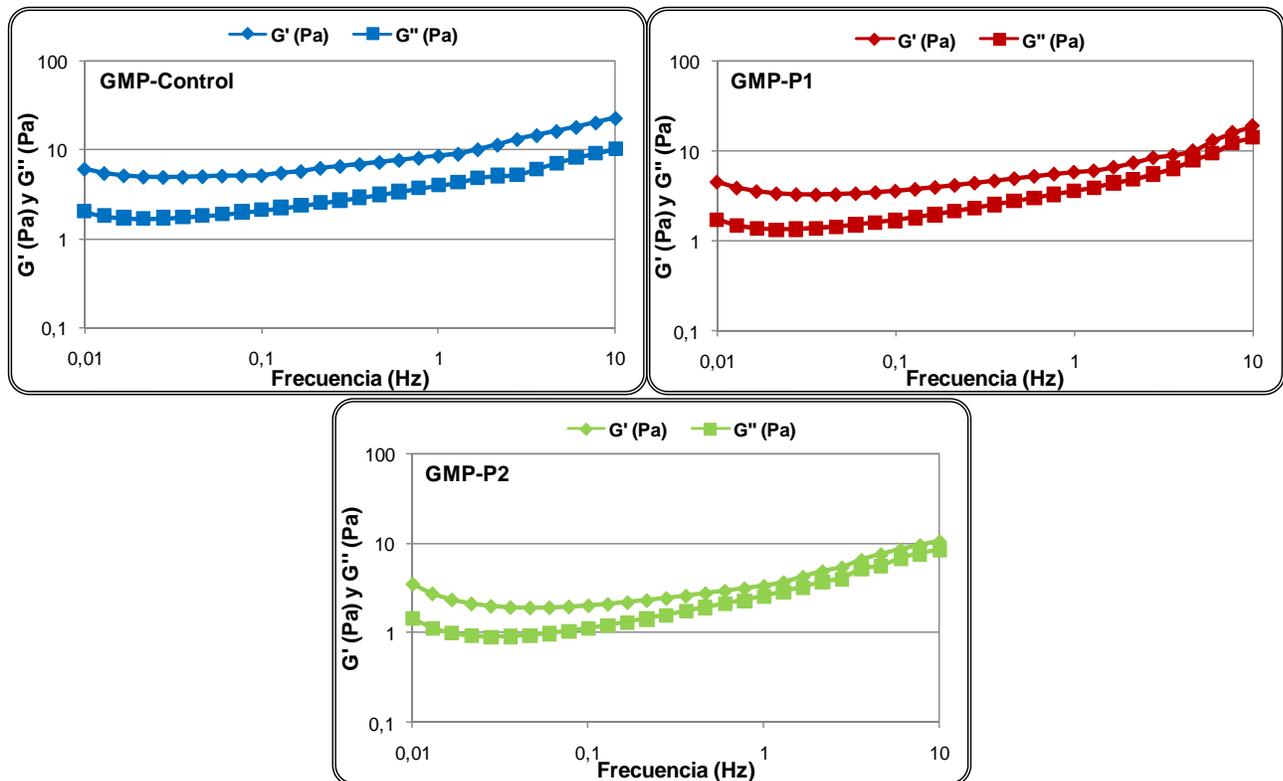


**Figura 1.7.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre los grupos sulfhidrilo libres (*SHL*) ( $\mu\text{mol/g}$  de masa liofilizada). Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

**4.2.2. Macropolímero de gluteninas (GMP).** Cuando se lleva a cabo una extracción de proteínas de la masa con una solución de SDS, la fracción insoluble puede ser recogida como un gel de proteínas luego de la centrifugación. Weegels *et al.* (1997) denominaron a este gel de proteínas como macropolímero de gluteninas, ya que está constituido principalmente de polímeros entre gluteninas de alto y bajo peso molecular. Por lo tanto, su cantidad y calidad se relaciona con las propiedades de la masa. La enzima Pn no modificó significativamente el

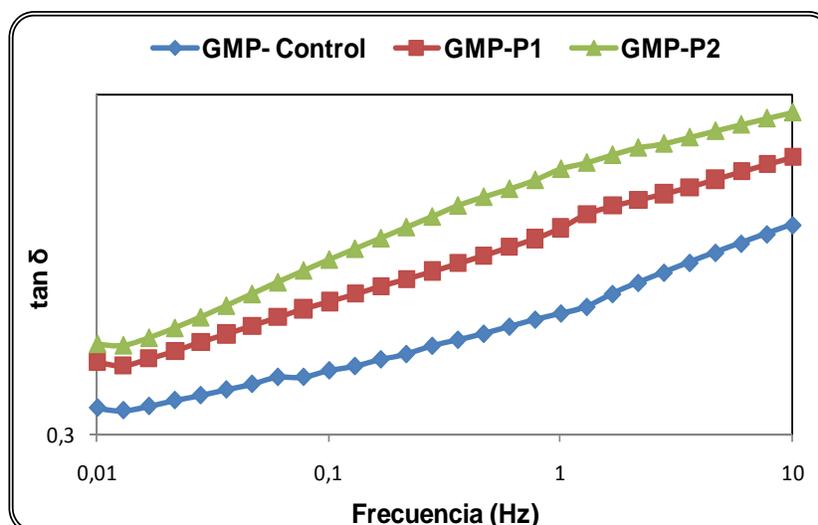
contenido de GMP con respecto al control (Tabla 1.4), pero si se observaron diferencias en las propiedades del gel formado.

El comportamiento viscoelástico de la masa de harina de trigo está determinado principalmente por el tipo y el contenido de gluteninas. En consecuencia, ensayos reológicos dinámicos del macropolímero de gluteninas podrían brindarnos información relacionada con las propiedades viscoelásticas de la masa. En la Figura 1.8 se presenta la variación en función de la frecuencia del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) del macropolímero de gluteninas obtenido a partir de las masas control y con el agregado de pentosanasa. Previamente se realizó un barrido de esfuerzo (0,5 - 200 Pa) para determinar el rango de viscoelasticidad lineal. Se eligió 0,032% de deformación, dentro del rango lineal, para realizar los barridos de frecuencia. El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) fue mayor que el módulo de pérdida ( $G''$ ) en todo el rango de frecuencia (0 – 10 Hz), indicando un comportamiento viscoelástico del gel proteico. Se observó una disminución significativa del módulo elástico ( $G'$ ) en las muestras con pentosanasa en todo el rango de frecuencia, por el contrario, la variación del módulo viscoso ( $G''$ ) entre las muestras con enzima y el control fue pequeña (Tabla 1.4). Ambos resultados estarían indicando que la enzima Pn causó la formación de un gel proteico menos elástico y más viscoso con valores de  $\tan \delta$  mayores que el gel proteico de la masa control (Figura 1.9). Wang *et al.* (2005) observaron que la enzima xilanasa causaba un incremento del peso húmedo y del contenido de proteínas del GMP, pero a pesar de las diferencias observadas con los resultados aquí presentados, las propiedades reológicas del gel de proteínas fueron similares a las obtenidas en éste trabajo, ya que la xilanasa disminuyó  $G'$  e incrementó  $\tan \delta$ . Por el contrario, Primo-Martín *et al.* (2003), reportaron que la enzima pentosanasa aumentó el contenido de proteínas del GMP y no modificó las propiedades reológicas del GMP con respecto al control esto podría deberse a que trabajaron con una harina más débil a la utilizada en este trabajo.



**Figura 1.8.** Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) con respecto a la frecuencia de los macropolímeros de gluteninas obtenidos a partir de las masas liofilizadas. Control: GMP de masa elaborada sin enzima. P1: GMP de masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: GMP de masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

En la Tabla 1.4 se presentan los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  de los geles proteicos a 0,1 Hz. El GMP de las muestras con Pn presentó menor valor de  $G'$  a medida que se incrementó la dosis de enzima utilizada. Debido a que la variación del módulo viscoso en estas muestras fue pequeña con respecto al control, el valor de  $\tan \delta$  obtenido fue significativamente mayor. Estos resultados indicaron la formación de un gel de proteínas más débil y menos elástico que el control. En resumen, la formación del GMP fue afectado por la acción de la enzima, los pentosanos de menor tamaño pueden estar influyendo en las interacciones entre las proteínas, haciéndolo menos fuerte y con un menor grado de entrecruzamiento entre las cadenas peptídicas.



**Figura 1.9.** Variación de la  $\tan \delta$  con respecto a la frecuencia de los macropolímeros de gluteninas obtenidos a partir de las masas liofilizadas. Control: GMP de masa elaborada sin enzima. P1: GMP de masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: GMP de masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

**Tabla 1.4.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre el porcentaje del macropolímero de gluteninas (GMP) y sus parámetros reológicos.

Variable	Control	P1	P2
<b>GMP (%)</b>	1,43a	1,25a	1,42a
<b>GMP- G' (Pa)</b>	4,77c	3,48b	2,28a
<b>GMP- G'' (Pa)</b>	1,86b	1,60ab	1,28a
<b>GMP- <math>\tan \delta</math></b>	0,39a	0,46b	0,56c

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

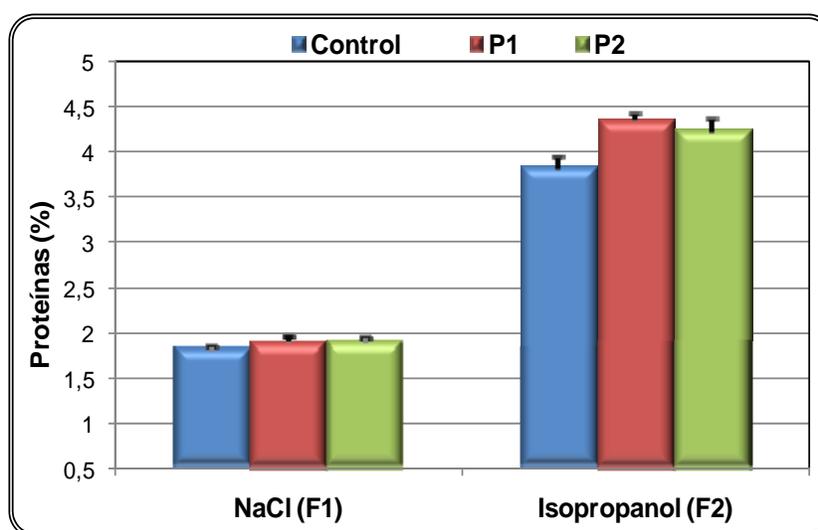
GMP-G': Módulo de almacenamiento a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

GMP-G'': Módulo de pérdida a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

GMP-  $\tan \delta$ : Tangente del ángulo  $\delta$  a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

**4.2.3. Estudio de las distintas fracciones proteicas modificadas por la enzima pentosanasa.** Las proteínas del trigo son una mezcla compleja que para

profundizar en su estudio muchas veces se requiere su fraccionamiento. Para analizar el efecto del agregado de Pn en la elaboración de la masa sobre las proteínas se prosiguió a fraccionarlas en base a su diferente solubilidad en distintos solventes. De cada fracción se determinó el contenido de proteínas (g proteínas / 100 g masa liofilizada) y el patrón electroforético en condiciones reductoras. La Figura 1.10 muestra el contenido de proteínas solubles en NaCl al 5% (F1) y en isopropanol al 70% (F2) de las masas elaboradas con Pn y la masa control.

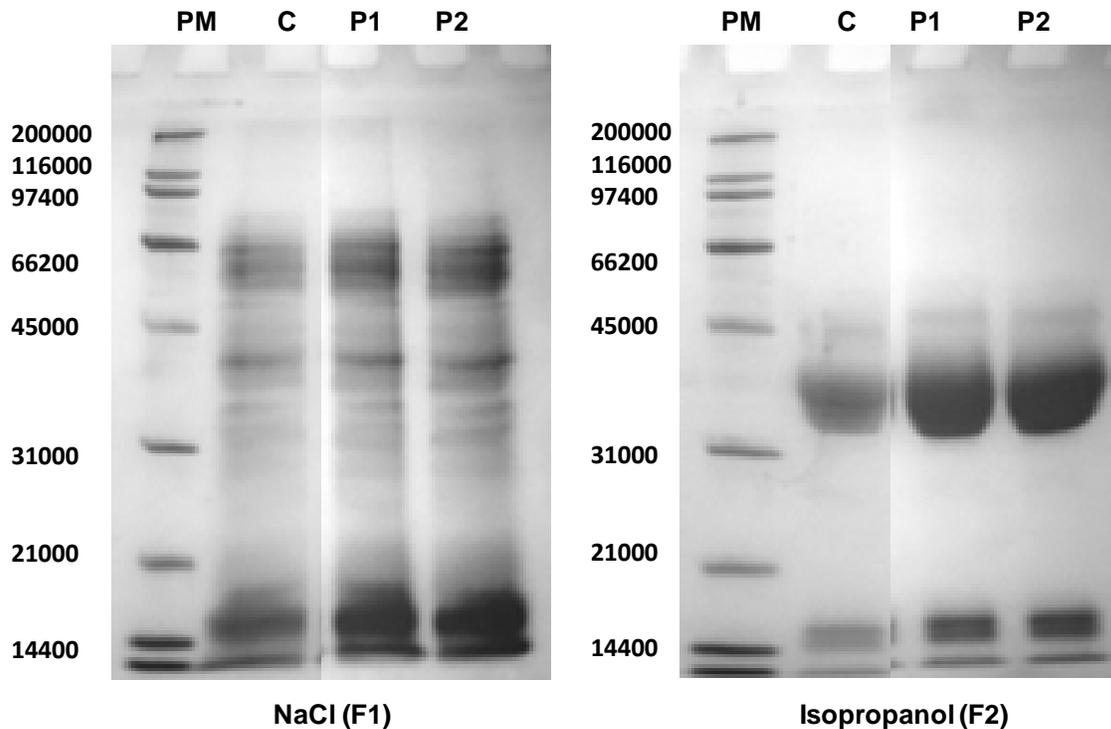


**Figura 1.10.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre la solubilidad de las proteínas de la masa en NaCl e Isopropanol. NaCl: porcentaje de proteínas solubles en NaCl al 5% (F1). Isopropanol: porcentaje de proteínas solubles en Isopropanol al 70% (F2). Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

En el primer paso de la extracción secuencial (F1) se solubilizaron con NaCl principalmente albúminas y globulinas. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de proteínas extraídas con NaCl entre la muestra control y las preparadas con Pn. Por lo que se concluye que el alto contenido de pentosanos solubles no influye en la solubilidad de las proteínas en solución salina. En la Figura 1.11 se presentan los patrones electroforéticos de las proteínas reducidas

del primer y segundo paso de la extracción secuencial (F1 y F2). Las albúminas y globulinas son principalmente enzimas de la harina, no están bien caracterizadas y existe poca información de cómo ésta fracción afecta el proceso de elaboración del pan. Las principales proteínas de ésta fracción son dos grupos de diferentes tamaños: las de masa molecular alta (entre 40000 - 65000) y las de masa molecular baja (entre 14000 - 16000) (Pogna *et al.* 1994). No se observaron diferencias entre el control y las muestras con Pn en los patrones electroforéticos reducidos de F1.

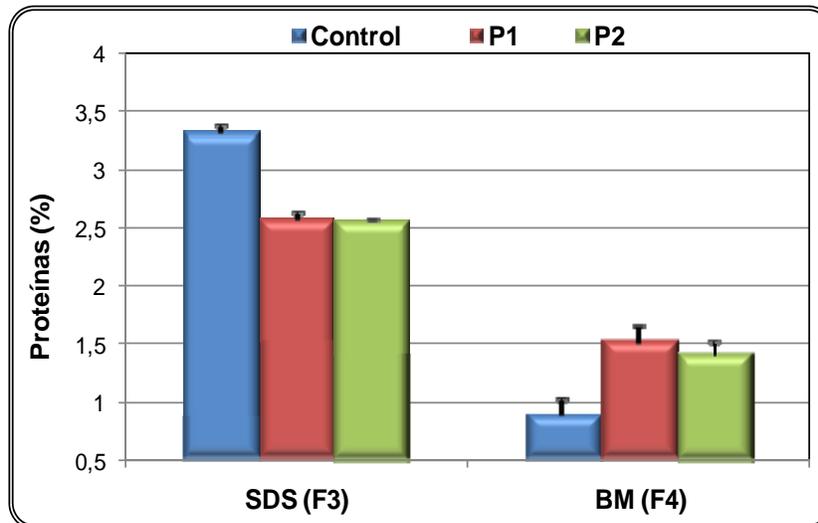
En el segundo paso (F2) se utilizó isopropanol al 70% donde se solubilizaron las gliadinas. Las muestras con Pn presentaron mayor contenido de proteínas en F2 comparado con el control (Figura 1.10), indicando que el menor tamaño de los pentosanos permitió extraer mayor cantidad de proteínas con isopropanol, mayoritariamente gliadinas. La hidrólisis de los pentosanos insolubles en agua, promueve una redistribución del agua, esto podría estar causando cambios en las interacciones dentro de las cadenas de gliadinas (interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y puentes de hidrógeno) facilitando su extracción con isopropanol. La Figura 1.11 muestra los patrones electroforéticos de F2 reducidas, en general se observó un incremento de la intensidad de todas las bandas. Las bandas de muy baja intensidad comprendidas entre 40000 y 50000 de masa molecular corresponderían a las  $\omega$ -gliadinas y se observaron un tanto más intensas en las muestras con Pn. Las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas se encuentran agrupadas en una mancha intensa que se encuentra entre 35000 y 40000 de masa molecular aproximadamente. Estos tres tipos de gliadinas no se pueden distinguir por SDS-PAGE común, pero pueden ser separados por electroforesis a pH ácido (Shewry *et al.* 1986). Cómo ya se mencionó anteriormente, Wang *et al.* (2005) postuló que debido a su naturaleza, los pentosanos solubles compiten con las proteínas por el agua modificando las interacciones entre las mismas. Estas modificaciones conducen a cambios estructurales de las gliadinas que le permiten una mayor solubilización en isopropanol.



**Figura 1.11.** Patrones electroforético de las proteínas extraídas con NaCl (F1) y Isopropanol (F2). Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

En el tercer paso de la extracción se utilizó SDS al 1,5% solubilizando mayormente gluteninas (F3) y en el último paso se utilizó buffer de muestra y un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) para solubilizar al macropolímero de gluteninas (F4). Una disminución del contenido de proteínas de F3 y un incremento del contenido de proteínas en F4 fueron observados debido a la actividad de Pn respecto al control (Figura 1.12). En los tres perfiles electroforéticos de F3 se observaron las mismas bandas indicando que la enzima no provoca la aparición de especies nuevas. Se observó además una leve disminución de las bandas en las muestras tratadas con enzima, en concordancia con los resultados observados en el contenido de proteínas solubles en SDS. Los patrones electroforéticos de las proteínas reducidas (F3) de las muestras con Pn presentaron, comparado con el control, menor intensidad de la banda con una masa molecular  $> 200000$ , y de las bandas correspondientes a las LMW-GS entre

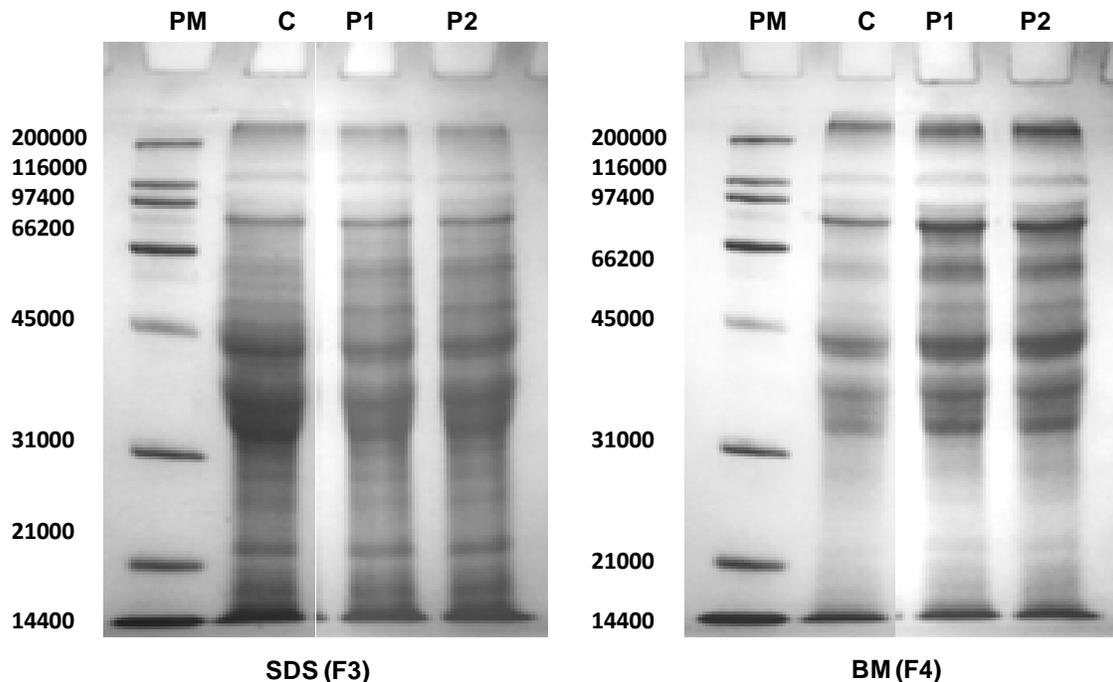
30000 y 45000 de masa molecular. Estas proteínas insolubles podrían haber estado constituyendo agregados proteicos de gran tamaño molecular quedando insolubles en SDS.



**Figura 1.12.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre la solubilidad de las proteínas de la masa de trigo en SDS y BM. SDS: porcentaje de proteínas solubles en dodecil sulfato de sodio al 1,5% (F3). BM: porcentaje de proteínas solubles en buffer de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol (F4). Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

El patrón electroforético de F4 mostró gran intensidad en todas las bandas proteicas, como a F4 corresponden todas las proteínas que fueron insolubles en SDS, una mayor intensidad en las bandas indica mayor número de interacciones proteína-proteína que constituyeron agregados insolubles. Se cree que las interacciones que se establecieron entre las proteínas fueron principalmente no covalentes ya que el contenido de grupos *SHL* fue levemente mayor en las muestras con alto contenido de Pn con respecto al control (Figura 1.13). Los cambios más notorios se observaron en el aumento de la intensidad de la banda > 200000, de la banda correspondiente a la HMW-GS de ~ 90000 y de las bandas de LMW-GS < 45000. Las bandas correspondientes a ~ 50000 y ~ 60000 no se observaron en el perfil electroforético de F4 del control, mientras que en las

muestras con Pn se presentaron con alta intensidad, revelando que estas proteínas forman agregados insolubles en SDS cuando en la masa se agregó Pn.

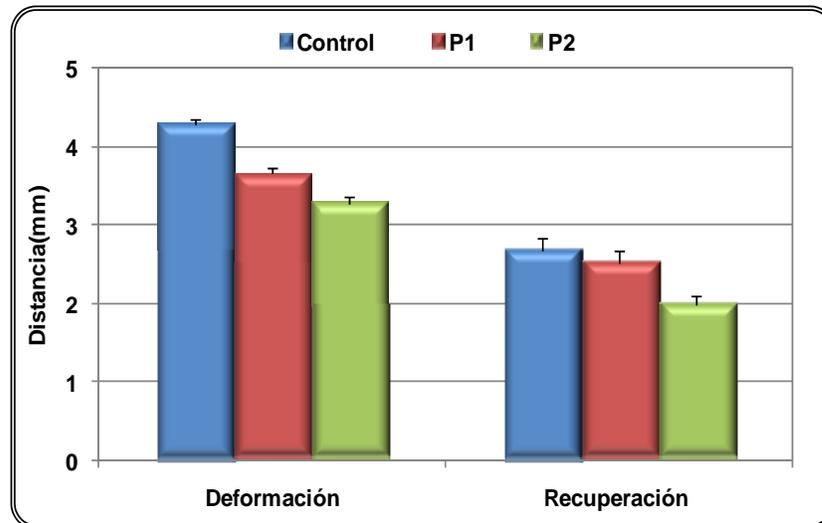


**Figura 1.13.** Patrones electroforéticos de las proteínas extraídas con SDS (F3) y con BM (F4). Control: masa elaborada sin enzima. P1: masa elaborada con 0,006% de pentosanasa. P2: masa elaborada con 0,012% de pentosanasa.

### 5. Análisis de las propiedades reológicas de mezclas de gluten - enzima.

Con el objetivo de analizar más profundamente el efecto de las enzimas sobre las propiedades reológicas de las proteínas del gluten, se prosiguió a realizar ensayos de deformación y recuperación (TA.XT2i Texture Analyzer, Reino Unido) de mezclas de gluten y enzima. Se trabajó con gluten vital de trigo comercial, y se utilizó una relación 1:1,8 de sólido-líquido la cual permitió un correcto desarrollo del gluten. De las curvas obtenidas a partir de los ensayos de deformación y recuperación se analizaron la deformación máxima alcanzada, que es una medida de la resistencia que opone el sistema al esfuerzo aplicado, y la diferencia entre la deformación máxima y la deformación alcanzada luego de

retirar el esfuerzo de la masa, que es una medida de cuánto se recupera el sistema después de retirar el esfuerzo aplicado.



**Figura 1.14.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre la deformación y la recuperación del gluten de trigo. Control: gluten desarrollado sin enzima. P1: gluten desarrollado con 0,006% de pentosanasa. P2: gluten desarrollado con 0,012% de pentosanasa.

Las mezclas de gluten – Pn ejercieron menor resistencia a la deformación y la matriz viscoelástica tuvo una menor recuperación luego de la deformación, este resultado indica la presencia de interacciones más débiles entre las proteínas del gluten y que al aplicar el esfuerzo estas se rompen de forma irreversible. Wang *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la enzima xilanasas sobre el rendimiento y sobre las propiedades reológicas del gluten, y observaron que el gluten se hacía menos resistente a la extensión y más extensible. Por lo tanto, el agregado de xilanasas causó una disminución de la viscosidad y consistencia del gluten, ya que la enzima promovió un mayor despliegue de la red proteica y una mayor extensibilidad.

## 6. Análisis de correlación entre los distintos parámetros

En la Tabla 1.5 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre distintos parámetros. Como puede observarse hubo una correlación positiva ( $r = 0,9$ ) entre el volumen de pan y el contenido de pentosanos solubles, lo que estaría indicando un efecto positivo de la enzima Pn que aumentó el contenido de los pentosanos solubles. También se obtuvieron coeficientes de correlación positivos entre los parámetros reológicos de la masa y los del GMP, por lo que el análisis de las propiedades del GMP permite predecir el comportamiento de la masa.

**Tabla 1.5.** Coeficientes de correlación de Pearson.

	VE (cm <sup>3</sup> /g)	G' (KPa)	G'' (KPa)	tan $\delta$	PS (%)	SHL ( $\mu$ mol/g)	GMP (%)	G' (GMP)	G'' (GMP)	tan $\delta$ (GMP)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	
VE(cm <sup>3</sup> /g)	1														
G' (KPa)	-0,98*	1													
G'' (KPa)	-0,95*	0,98*	1												
tan $\delta$	0,19	-0,15	0,05	1											
PS (%)	0,90*	-0,86*	-0,86*	0,40	1										
SHL ( $\mu$ mol/g)	0,75*	-0,70*	-0,75*	-0,24	0,87*	1									
GMP (%)	-0,04	-0,01	0,11	0,55	-0,35	-0,60	1								
G' (GMP)	-0,88*	0,92*	0,90*	-0,49	-0,79*	-0,53	-0,14	1							
G'' (GMP)	-0,66	0,73*	0,69	-0,52	-0,65	-0,18	-0,27	0,91*	1						
tan $\delta$ (GMP)	0,93*	-0,92*	-0,93*	0,33	0,79*	0,83*	0,05	-0,84*	-0,57	1					
F1 (%)	0,71	-0,69	-0,69	0,33	0,85*	0,89*	-0,08	-0,72	-0,56	0,76	1				
F2 (%)	0,88*	-0,84*	-0,83*	0,44	0,93*	0,73	-0,17	-0,88*	-0,83*	0,76	0,79	1			
F3 (%)	-0,89*	0,85*	0,85*	-0,40	-1,00*	-0,86	0,34	0,81*	0,68	-0,78	-0,84*	-0,93*	1		
F4 (%)	0,73	-0,68	-0,68	0,31	0,93*	0,88*	-0,30	-0,68	-0,53	0,67	0,95*	0,93*	-0,93*	1	

\*Coeficientes de correlación de Pearson significativos con  $p \leq 0,05$

El coeficiente de correlación entre la concentración de grupos *SHL* y la  $\tan \delta$  del GMP fue  $r = 0,83$ , este resultado estaría indicando que la disminución de la viscoelasticidad del GMP de las muestras con Pn se debe a un menor entrecruzamiento entre las gluteninas por uniones disulfuro S-S. El contenido de PS también se correlacionó con las propiedades reológicas del GMP, un alto contenido de PS correlacionó significativamente con un alto valor de  $\tan \delta$  y con bajos valores  $G'$  del GMP indicando que el menor tamaño de los pentosanos causó modificaciones en las interacciones entre las proteínas haciendo que el gel proteico sea menos elástico. Este mismo efecto puede observarse en las distintas fracciones proteicas, ya que el contenido de pentosanos solubles correlacionó positivamente con el contenido de proteínas de F1, F2 y F4 y negativamente con el contenido de proteínas de F3 (Tabla 1.5).

SEGUNDA SECCIÓN:  
**GLUCOSA OXIDASA**

## 1. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la calidad del pan.

Los resultados del efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre el volumen específico del pan se presenta en la Tabla 2.1. La aplicación de las dosis más elevadas de enzima causó una disminución significativa del volumen específico del pan, mientras que los panes en que se usó la menor dosis no fueron significativamente diferentes del control (sin enzima). Las dosis de enzima utilizadas en la formulación fueron elegidas de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores y fueron comparables con las ya utilizadas en previas publicaciones (Vemulapalli *et al.* 1998, Primo-Martin *et al.* 2003, Hanft & Koehler 2006, Bonet *et al.* 2006). Sin embargo, para harinas de buena calidad panadera como son las de Argentina, el agregado de glucosa oxidasa llevó a la formación de una masa muy tenaz y poco extensible que no permitió el desarrollo de panes con alto volumen. Rasiah *et al.* (2005) utilizaron una elevada dosis de glucosa oxidasa y no encontraron diferencias significativas en el volumen de pan comparado con el pan control. Otros autores (Hanft & Koehler 2006, Bonet *et al.* 2006) encontraron que una dosis media (100 U/Kg similar a la dosis más baja utilizada en este trabajo, G3) fue la que permitió obtener el mayor volumen específico comparado con el control, dosis mayores que ésta producen una disminución del volumen de pan.

Mediante el análisis de la textura de la miga se determinaron principalmente la firmeza o dureza y la masticabilidad. A pesar de no observarse diferencias significativas en el volumen de pan entre el control y la dosis más baja de enzima, los panes elaborados con 0,001% de Gox presentaron una miga de pan fresco con menor firmeza y masticabilidad que el pan control (Tabla 2.1). Esto puede deberse a que los panes con glucosa oxidasa retienen mayor contenido de agua durante la cocción y ésta actúa como lubricante que favorece el ablandamiento de la miga de pan. Primo-Martin *et al.* (2003) informaron que masas elaboradas con Gox tuvieron una gran cantidad de pentosanos totales asociados con el macropolímero de gluteninas (GMP) debido a acoplamiento oxidativo y entrecruzamientos entre las cadenas. Este efecto ligado a la habilidad de los pentosanos para retener gran

cantidad de agua (Gujral & Rosell 2004), podrían ser los responsables de reducir la dureza de la miga de pan.

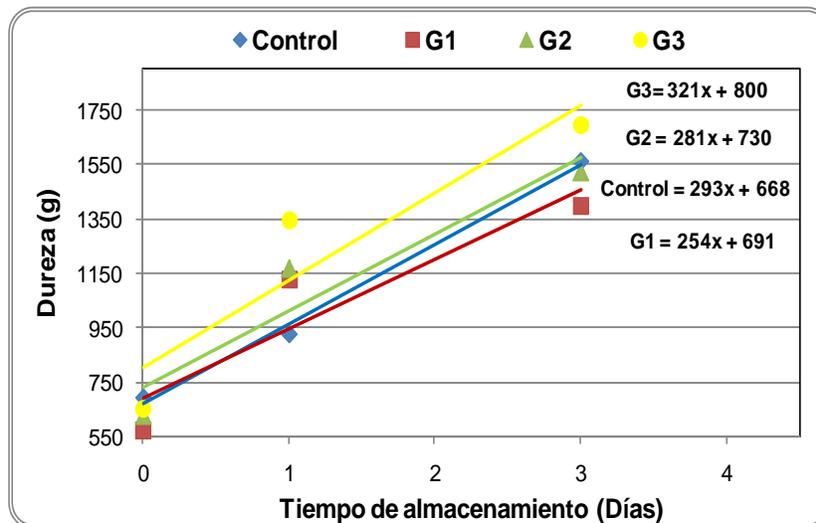
**Tabla 2.1.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre las características del pan fresco.

Variable	Control	G1	G2	G3
VE (cm <sup>3</sup> /g)	4,67a	4,53ab	4,04c	3,76d
Dureza (g)	691,40c	572,00a	626,18b	652,08bc
Masticabilidad (g)	441,50c	374,25a	409,75b	434,75c

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

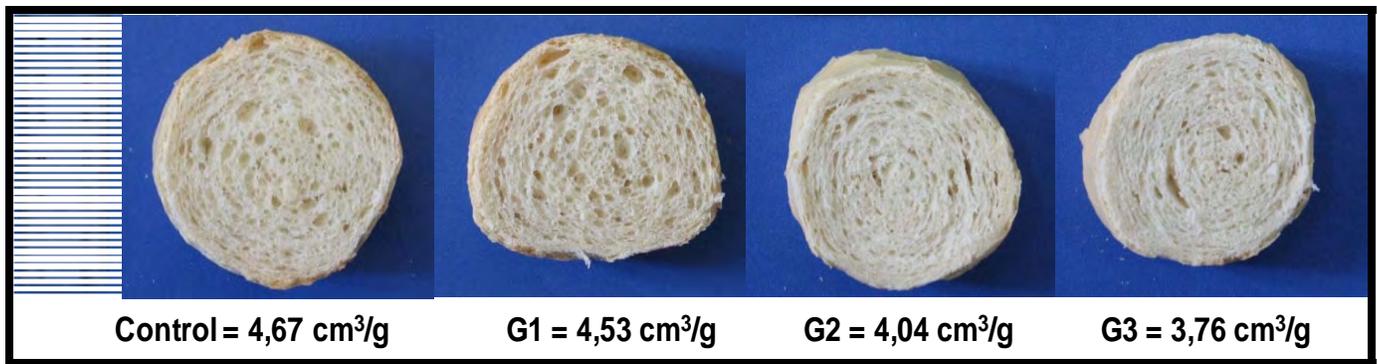
Control: pan elaborado sin enzima. G1: pan elaborado con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: pan elaborado con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: pan elaborado con 0,01% de glucosa oxidasa.

El cálculo de la pendiente de los puntos de dureza de la miga de pan en función del tiempo de almacenamiento de cada una de las muestras presentadas en la Figura 2.1 nos proporciona una idea de la velocidad de endurecimiento de la miga de pan. De acuerdo a las ecuaciones presentadas (Figura 2.1), solo la dosis más baja de enzima utilizada presentó menor velocidad de endurecimiento que el pan control. Por lo que se concluye que la enzima glucosa oxidasa, causó un efecto positivo sobre la firmeza de la miga de pan fresco, y niveles bajos de enzima permitieron obtener panes que se conservan más tiempo con baja firmeza de la miga comparado con los panes control.



**Figura 2.1.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la dureza (g) de la miga de pan a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento. Control: pan elaborado sin enzima. G1: pan elaborado con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: pan elaborado con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: pan elaborado con 0,01% de glucosa oxidasa.

Cómo se mencionó anteriormente, los resultados presentados por Vemulapalli *et al.* (1998), Hanft y Koehler (2006) y Bonet *et al.* (2006) coincidieron en que hasta una determinada dosis de enzima glucosa oxidasa se observa una mejora del volumen del pan y de la textura de la miga, pero el agregado de mayores niveles a 100 U/Kg de enzima conduce a la formación de masas demasiado fuertes, que no permiten el completo desarrollo del volumen de pan. En la Figura 2.2 se presentan las imágenes de los panes obtenidos sin y con glucosa oxidasa. Cómo puede observarse, altos niveles de enzima causaron una disminución del volumen específico del pan y el tamaño de los alveolos de la miga fue más pequeño comparado con el control. Por el contrario, la dosis más baja de enzima utilizada presentó un alveolado más grande.



**Figura 2.2.** Fotos de panes elaborados sin (control) y con glucosa oxidasa 0,001% (G1), 0,005% (G2) y 0,01% (G3).

## 2. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre las propiedades reológicas de la masa.

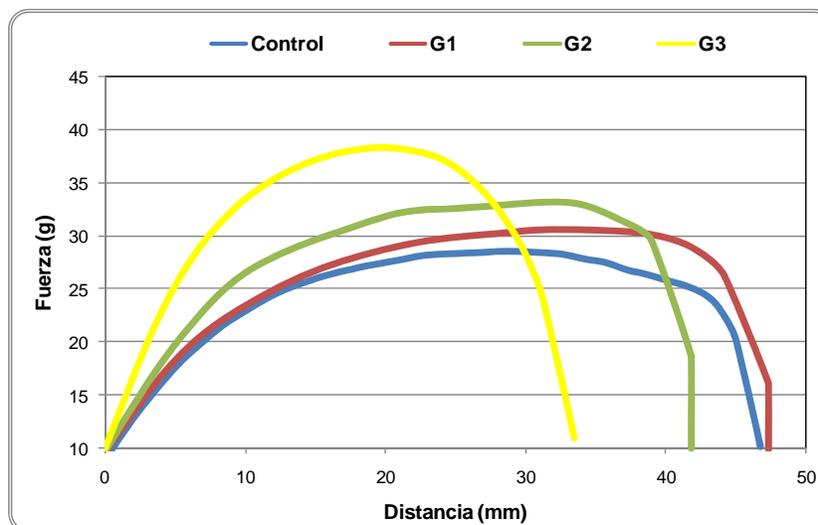
Vemulapalli *et al.* (1998) postularon que el  $H_2O_2$  producido por la enzima glucosa oxidasa y las enzimas peroxidases (nativas de la harina) causaron una gelación oxidativa de los pentosanos solubles en agua (Hoseney & Faubion 1981, Crowe & Rasper 1988, Izydorczyk *et al.* 1990) que condujo a una menor movilidad del agua y en consecuencia la masa resultante fue más seca y dura. En la Tabla 2.2 se presenta el efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los parámetros farinográficos. No se encontraron diferencias en la absorción farinográfica del agua (Ab) entre las distintas muestras. Estos resultados fueron coincidentes con publicaciones previas, pero son discordantes con el efecto de secado de la masa por acción de la enzima publicado por Vemulapalli *et al.* (1998). Sí se observó un aumento importante del tiempo de desarrollo (TD) y la estabilidad (E) a medida que se incrementó la dosis de enzima agregada. Este resultado indicó que el agregado de glucosa oxidasa causó un aumento de la energía necesaria para la formación de la masa, debido a la resistencia que opone al amasado, pero la masa resultante posee mayor estabilidad y tolerancia al sobreamasado.

**Tabla 2.2.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los parámetros farinográficos de la masa.

Variable	Control	G1	G2	G3
<b>Ab (%)</b>	63,35	63,40	63,40	63,35
<b>TD (min)</b>	10,00	10,75	11,75	15,88
<b>E (min)</b>	16,88	16,75	>20,00	>20,00

Ab: absorción farinográfica de agua, TD: tiempo de desarrollo de la masa, E: estabilidad de la masa. Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

El análisis de las propiedades reológicas de las masas se realizó mediante ensayos de extensión uniaxial, biaxial y reología dinámica (Tabla 2.3). La resistencia máxima a la deformación ( $R_m$ ) (fuerza máxima) fue mayor a medida que se incrementó la dosis de enzima utilizada, pero sólo la masa con la mayor dosis fue significativamente más resistente a la extensión que la masa control (sin enzima). Este aumento de la resistencia en las masas con glucosa oxidasa estuvo acompañado de una disminución de la extensibilidad máxima E (distancia máxima hasta la ruptura). La masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa tuvo un ~25% menos de extensibilidad y un ~ 40% más de resistencia a la extensión con respecto a la masa control (Figura 2.3). Poulsen y Hostrup (1998) y Primo-Martín *et al.* (2005) también observaron mediante ensayos de extensión uniaxial que las masas preparadas con glucosa oxidasa fueron menos extensibles y más resistentes.



**Figura 2.3.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la extensibilidad de la masa. Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

Los parámetros obtenidos a partir de los ensayos de extensión biaxial son presentados en la Tabla 2.3. Como ya se mencionó en la Primera Sección, los valores absolutos de los parámetros obtenidos en los ensayos realizados con el texturómetro son más altos que los obtenidos a partir del extensógrafo de Brabender y del alveógrafo de Chopin, sin embargo son comparables y permiten explicar las mismas propiedades de la masa. La enzima glucosa oxidasa causó un aumento significativo del valor P a medida que se incrementó la dosis agregada. Este resultado se correlacionó con la mayor resistencia a la deformación ( $R_m$ ) que presentaron estas mismas masas. Sólo fue significativamente mayor el valor de L en las masas elaboradas con la dosis más baja de glucosa oxidasa (0,001%). Los valores de P/L fueron altos en comparación con la masa control cuando las dosis utilizadas de enzima fueron elevadas, indicando la formación de masas muy fuertes y tenaces. Por lo tanto, altas dosis de enzima formaron masas con un comportamiento reológico similar o superior a las masas obtenidas a partir de harinas de trigos argentinos correctores pertenecientes al grupo 1 de la clasificación propuesta por Cuniberti (2004). Por el contrario, la dosis más baja de

glucosa oxidasa debido a que la masa fue más extensible (Valor L), el valor de P/L fue significativamente menor.

**Tabla 2.3.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los parámetros de extensión uniaxial, biaxial y de reología dinámica de la masa.

Variable	Control	G1	G2	G3
<b>Extensión uniaxial</b>				
Rm (g)	29,1a	30,2a	33,9ab	39,2b
Em (mm)	46,7b	47,9b	41,9ab	34,5a
Area (g mm)	1059ab	1337b	1162ab	942a
<b>Extensión Biaxial</b>				
Valor P (mm)	188a	161a	270b	269b
Valor L (mm)	64a	102b	61a	68a
W (Jx10 <sup>4</sup> )	524a	709b	791b	839b
P/L	2,96b	1,61a	4,51c	4,03c
<b>Viscoelasticidad</b>				
G' (kPa)*	15,17a	16,27a	18,11b	21,95c
G'' (kPa)*	5,18a	5,53a	5,64a	6,74b
tan δ*	0,34b	0,34b	0,31a	0,31a

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

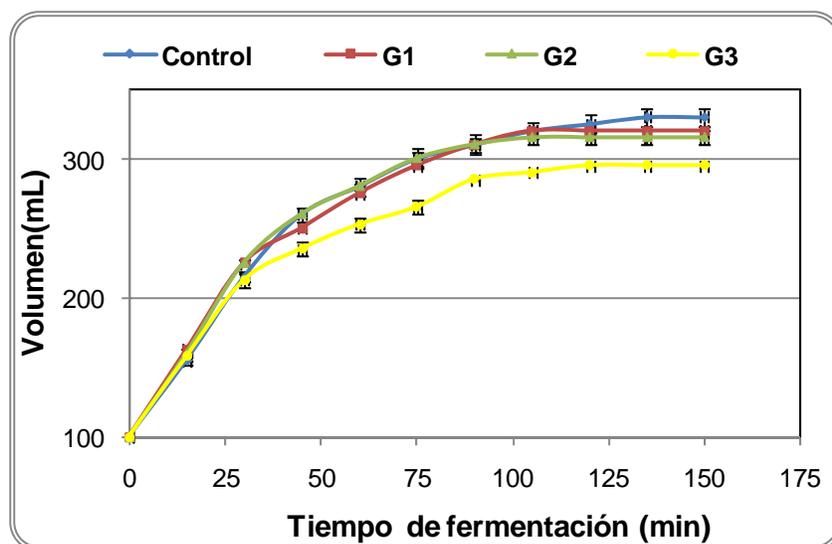
\*Fueron determinados a 0,1 Hz.

Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

Los cambios observados en las propiedades reológicas de las masas elaboradas con glucosa oxidasa son coincidentes con los publicados por otros

autores. Bajas dosis de glucosa oxidasa tuvieron un efecto mejorador sobre las propiedades de la masa y las características del pan, mientras que altas dosis de esta enzima causaron la formación de una masa muy tenaz y poco extensible.

En los ensayos de reología dinámica, los valores de  $G'$  fueron mayores que los de  $G''$  en todo el rango de frecuencia (0,03 a 100 Hz) indicando el comportamiento viscoelástico de todas las masas analizadas (datos no mostrados). En la Tabla 2.3 se presentan los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  a 0,1 Hz obtenidos a partir de los barridos de frecuencia de las distintas masas. A medida que se aumentó la dosis de enzima glucosa oxidasa el valor del módulo de almacenamiento  $G'$  (módulo elástico) fue mayor siendo este resultado significativo para las dosis más altas utilizadas. Valores elevados de  $G'$  indican que la masa fue más elástica y con un mayor número de entrecruzamiento entre las hebras proteicas del gluten. Por otro lado, como no se observó un aumento tan marcado del módulo de pérdida  $G''$  (módulo viscoso) en estas muestras, los valores de  $\tan \delta$  ( $G'' / G'$ ) fueron significativamente menores. Los valores de la  $\tan \delta$  varían entre 0 - 1, cuando  $\tan \delta = 0$  se dice que un material posee un comportamiento completamente elástico (sólido), mientras que cuando  $\tan \delta = 1$  el comportamiento es completamente viscoso (líquido). La enzima glucosa oxidasa llevó a la formación de masas levemente más elástica, más viscoelástica. Otros autores obtuvieron resultados similares sobre las propiedades reológicas dinámicas de las masas elaboradas con glucosa oxidasa (Vemulapalli *et al.* 1998, Dunnewindt *et al.* 2002). Vemulapalli *et al.* (1998) postularon que este efecto se debe principalmente a que el  $H_2O_2$ , producto de la enzima y las peroxidasas presentes en la harina causan la formación de geles de pentosanos solubles en agua y en consecuencia la masa se vuelve más seca. Cuando las masas son más secas, en general son rígidas, duras, fuertes y posiblemente más elásticas. Estas afirmaciones fueron estudiadas posteriormente por Miller y Hosney (1999), quienes redujeron las variables reológicas de las masas con Gox hasta igualarlas al control, aumentando el porcentaje de agua agregado durante la preparación de la masa. A pesar del mayor contenido de agua en las masas con Gox, éstas fueron más elásticas que el control ( $< \tan \delta$ ).

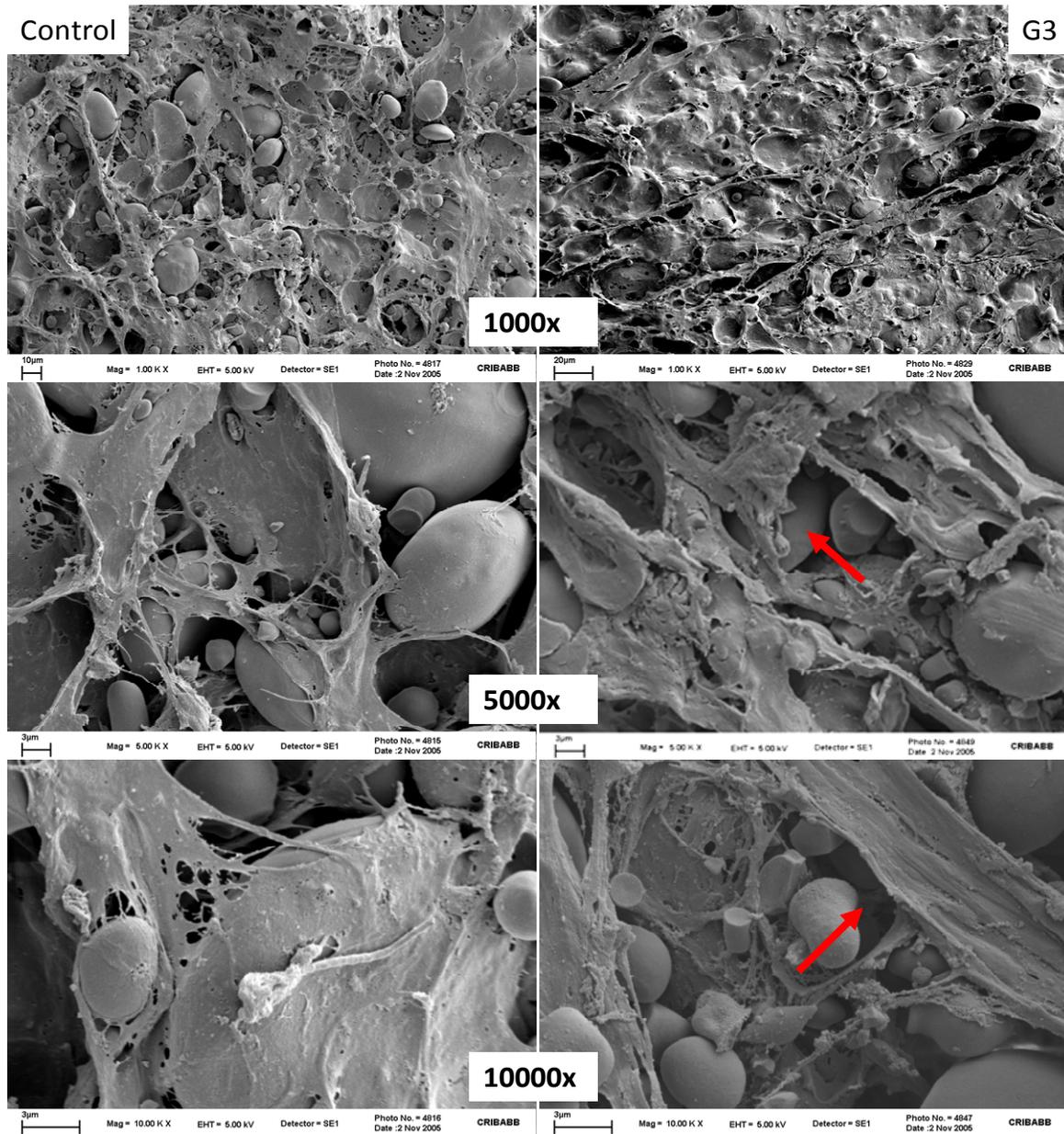


**Figura 2.4.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la expansión de la masa durante la fermentación. Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

Por último, se prosiguió a analizar el efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la capacidad de expansión de las masas durante la fermentación. En la Figura 2.4 se muestra el incremento de volumen de las distintas masas mientras transcurre el tiempo de fermentación. A medida que se incrementó la dosis de Gox, menor fue el volumen final alcanzado luego de la fermentación. En este caso, la masa control desarrolló el mayor volumen final ( $p < 0,05$ ). La producción de  $\text{CO}_2$  debería ser similar en todas las muestras ya que se utilizó el mismo porcentaje de levaduras en todas las formulaciones. Por consiguiente, la menor expansión desarrollada por las masas con Gox no se debió a la ruptura de la matriz proteína-almidón que rodea las celdas de gas si no a que la presión del  $\text{CO}_2$  no fue suficiente como para vencer la elevada resistencia ejercida por las masas.

### 3. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la microestructura de la masa.

En la Figura 2.5 se presentan las microfotografías de la masa control y de la masa con mayor contenido de Gox (G3).



**Figura 2.5.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la microestructura de la masa. Microfotografías de masas elaboradas sin enzima (Control) y con 0,01% de glucosa oxidasa (G3). Aumentos: 1000x, 5000x y 10000x.

Como se observa en las microfotografías, la microestructura de la masa con mayor contenido de Gox presentó una red de gluten continua y cerrada comparada con la masa control. Las fibras del gluten fueron más gruesas (flechas rojas) indicando la formación de una red fuerte y resistente. Por el contrario, Bonet *et al.* (2006) observaron por Cryo-SEM que la enzima Gox produce fibras de gluten más gruesas, pero menos orientadas con muchos poros de gran tamaño, y afirmaron que altos niveles de Gox inducen la formación de una red de gluten discontinua.

#### **4. Caracterización química de los componentes de la masa.**

El efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los pentosanos y las proteínas de la harina se determinó a partir de masas que fueron reposadas durante una hora simulando la fermentación (el tiempo de reposo favoreció la acción de la enzima y permitió que se restablezcan las interacciones entre los componentes que durante el amasado fueron modificadas) y luego liofilizadas.

##### **4.1. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los pentosanos.**

El efecto de las enzimas sobre el contenido de pentosanos totales, solubles e insolubles se muestra en la Tabla 2.4 Como era de esperar, el agregado de Gox no modificó el porcentaje de pentosanos totales de las masas ya que como se mencionó en la Primera Sección, se trabajó con la misma harina en todas las formulaciones. Por otro lado, se observó una tendencia a disminuir el contenido de pentosanos solubles cuando se utilizaron altas dosis de Gox. Este resultado puede relacionarse con observaciones publicadas anteriormente. El menor contenido de pentosanos solubles podría deberse a que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, producto de la acción de la enzima Gox y las peroxidases presentes en la harina, favorecen la formación de uniones covalentes entre residuos de tirosina de las proteínas y el ácido ferúlico de los arabinosilanos (Oudgenoeg *et al.* 2001) disminuyendo su solubilidad en agua. Vemulapalli y Hosney (1998) sugirieron la formación de un gel de pentosanos solubles, lo cual disminuiría su solubilidad.

**Tabla 2.4.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los pentosanos de las masas liofilizadas.

Variable	Control	G1	G2	G3
PT (%)	3,57a	3,65a	3,66a	3,78a
PS (%)	1,35bc	1,44c	1,16a	1,31b
PI (%)	2,22a	2,21a	2,51b	2,47b

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

PT: Pentosanos Totales, PS: Pentosanos Solubles, PI: Pentosanos Insolubles. Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

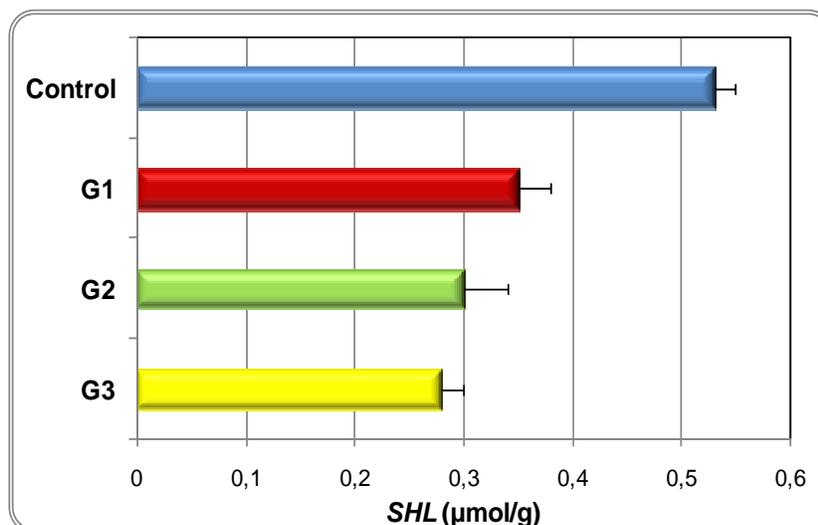
#### **4.2. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre las proteínas de la masa.**

##### **4.2.1. Determinación de la concentración de grupos sulfhidrilo libres (SHL).**

El contenido de grupos sulfhidrilo libres de la masa de harina de trigo puede ser utilizado para predecir, en parte, las propiedades reológicas de las masas. Una mayor concentración de grupos sulfhidrilo libres indica un menor grado de entrecruzamiento entre las proteínas del gluten y en consecuencia una masa más débil.

Como ya se mencionó anteriormente, el  $H_2O_2$ , producto de la acción de la enzima glucosa oxidasa, puede actuar como oxidante sobre las proteínas del trigo formando puentes disulfuro entre residuos de cisteína. La determinación del contenido de grupos sulfhidrilo libres de las proteínas del trigo permitió analizar el grado de entrecruzamiento entre las proteínas de la masa de trigo debido a la acción enzimática. En la Figura 2.6 se muestra el efecto de la enzima sobre la concentración de grupos sulfhidrilo libre de las proteínas de las masas. Como puede observarse la enzima causó una disminución significativa de la concentración de grupos SHL a medida que se incrementó la dosis. La disminución fue de ~ 30% para la dosis más baja utilizada y hasta un ~ 50% para

la dosis más elevada. Previamente, otros autores obtuvieron resultados similares con respecto al efecto de Gox sobre los grupos *SHL* de las masas (Poulsen & Hostrup 1998)



**Figura 2.6.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la concentración de grupos sulfhidrilo libres (*SHL*) de las masas liofilizadas (micromol/g de masa liofilizada). Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

Vemulapalli y Hosney (1998) encontraron que el agregado de glucosa oxidasa en la preparación de la masa disminuyó el contenido de grupos *SHL* de las proteínas solubles en SDS al 1,5%. En este mismo trabajo, los autores observaron que las proteínas solubles en agua extraídas a partir de harina o de masa tienen menor contenido de *SHL* cuando son incubadas con glucosa oxidasa. Por el contrario, Hanft y Koehler (2006) sólo observaron una disminución significativa del contenido de grupos *SHL* cuando la enzima fue incorporada en la formulación junto con glucosa.

La disminución del contenido de grupos *SHL* debido a la acción oxidante de la enzima indicó la formación de puentes disulfuro S-S entre residuos de cisteínas de las proteínas y de enlaces covalentes entre residuos de cisteína de las

proteínas y el ácido ferúlico de los arabinosilanos (Stauffer 2007). La formación de S-S es lo que permite la obtención de un gluten fuerte y elástico como el observado en la Figura 2.5.

**4.2.2. Macropolímero de gluteninas (GMP).** En la Tabla 2.5 se presenta el contenido del macropolímero de gluteninas obtenido a partir de la masa control y de las masas elaboradas con distintas dosis de enzima. La fracción de gluteninas de la harina insoluble en SDS ha sido altamente relacionada con los parámetros de calidad tales como el volumen de pan y las propiedades físicas de la masa (Schofield 1994, Weegels *et al.* 1996). Las enzimas pueden modificar la estructura del macropolímero de gluteninas y por ende influir en la calidad del producto final. A medida que se incrementó la dosis de enzima agregada se observó un aumento significativo del contenido de proteínas insolubles en dodecil sulfato de sodio al 1,5%. Este resultado indicó la formación de grandes agregados proteicos, que tienden a quedar insolubles en SDS y a formar geles luego de la centrifugación.

**Tabla 2.5.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre el contenido y las propiedades reológicas del macropolímero de gluteninas.

Variable	Control	G1	G2	G3
<b>GMP (%)</b>	1,43a	1,85b	1,84b	1,91b
<b>GMP- G' (Pa)</b>	4,77a	7,23a	17,26b	22,27b
<b>GMP- G'' (Pa)</b>	1,86a	2,69a	4,42b	5,92c
<b>GMP- Tan <math>\delta</math></b>	0,39b	0,38b	0,26a	0,27a

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

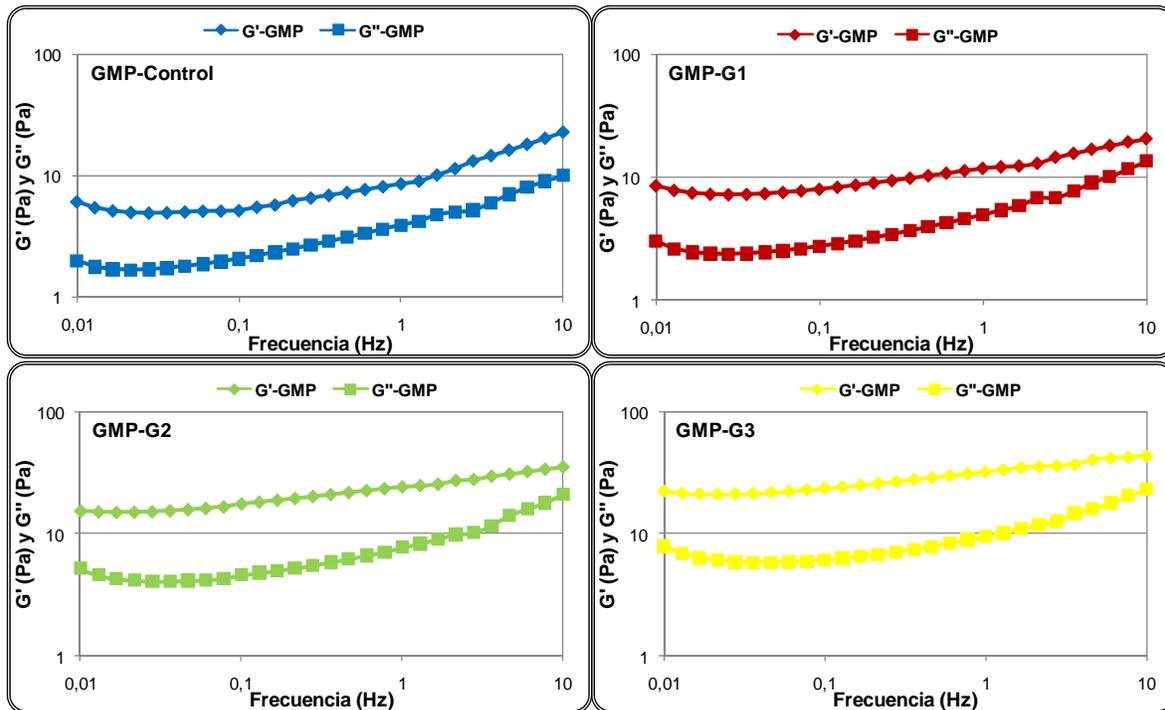
GMP-G': Módulo de almacenamiento a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

GMP-G'': Módulo de pérdida a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

GMP- Tan  $\delta$ : Tangente del ángulo  $\delta$  a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

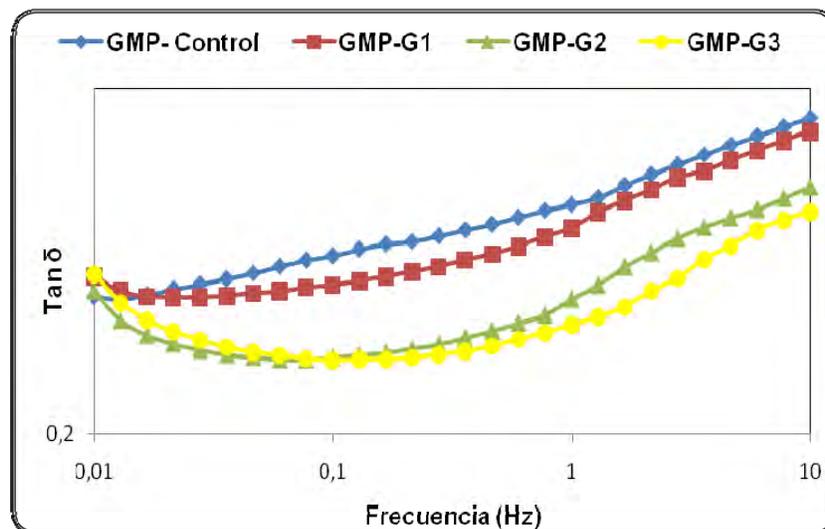
Por otro lado, se analizaron las propiedades reológicas dinámicas del gel de proteínas insolubles en SDS. Se realizaron barridos de frecuencia (0 – 10 Hz) a

una deformación constante (0,032%) obtenida a partir del rango de viscoelasticidad lineal. A partir de éstos ensayos se obtuvo la variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdida ( $G''$ ) y la  $\tan \delta$  con respecto a la frecuencia. Pritchard (1993) observó mediante ensayos de reología dinámica que la rigidez de la capa de gel del GMP, expresado como el valor de  $G'$  (Pa) correlacionaba con la calidad panadera de la harina de trigo. En estudios posteriores, (Hamer & van Vliet 2000) se postuló que el GMP es un gel formado por interacciones físicas y químicas y sus propiedades reológicas dinámicas dependen también del tamaño de las partículas de gluteninas que lo componen (Don *et al.* 2003a).



**Figura 2.7.** Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) con respecto a la frecuencia de los macropolímeros de glutenina obtenidos a partir de las masas liofilizadas. Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa

Los GMP obtenidos a partir de las masas liofilizadas preparadas sin (Control) y con Gox tuvieron valores de  $G'$  mayores a los de  $G''$  en todo el rango de frecuencia, indicando un comportamiento viscoelástico del gel de proteínas. Altas dosis de enzima ( $> 0,001\%$ ) aumentaron significativamente el módulo elástico ( $G'$ ) y el viscoso ( $G''$ ) respecto al GMP de la masa control (Tabla 2.5 - Figura 2.7). Estas mismas muestras presentaron bajos valores de  $\tan \delta$  (Figura 2.8), sugiriendo un aumento de la viscoelasticidad del GMP por acción de la Gox. Un incremento en  $G'$  (Don *et al.* 2003 a,b,c) y una disminución de la  $\tan \delta$  sugiere un mayor tamaño de las moléculas de gluteninas que constituyen el GMP y un aumento del entrecruzamiento entre las mismas. El conjunto de los resultados indica que la enzima Gox promovió la formación de un gel de proteínas más fuerte y elástico que el de la masa control, debido al mayor tamaño de los agregados proteicos y al elevado número de entrecruzamientos entre las proteínas



**Figura 2.8.** Variación de la  $\tan \delta$  con respecto a la frecuencia de los macropolímeros de glutenina obtenidos a partir de las masas liofilizadas. Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G2: masa elaborada con 0,005% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

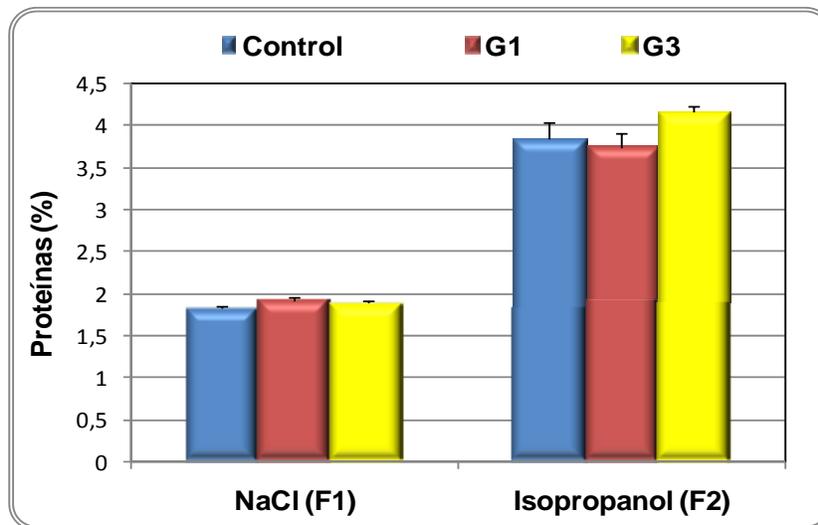
Xu *et al.* (2007) estudiaron las propiedades reológicas de suspensiones de gluteninas y observaron una relación directa entre el aumento de la concentración

de gluteninas y el módulo elástico. Por lo que un mayor contenido de proteínas del GMP puede relacionarse directamente con el incremento del módulo elástico.

En un trabajo previo (Primo-Martín *et al.* 2003) se estudió el efecto de varias enzimas sobre el contenido del macropolímero de glutenina y sobre sus propiedades reológicas. Estos autores informaron que la enzima Gox incrementó el contenido de proteínas del GMP y disminuyó el peso húmedo del mismo. Estos autores también informaron resultados similares a los presentados en este trabajo, donde Gox causó la formación de un gel de proteínas más elástico, con un mayor  $G'$  y una menor  $\tan \delta$ , con respecto al GMP sin enzima.

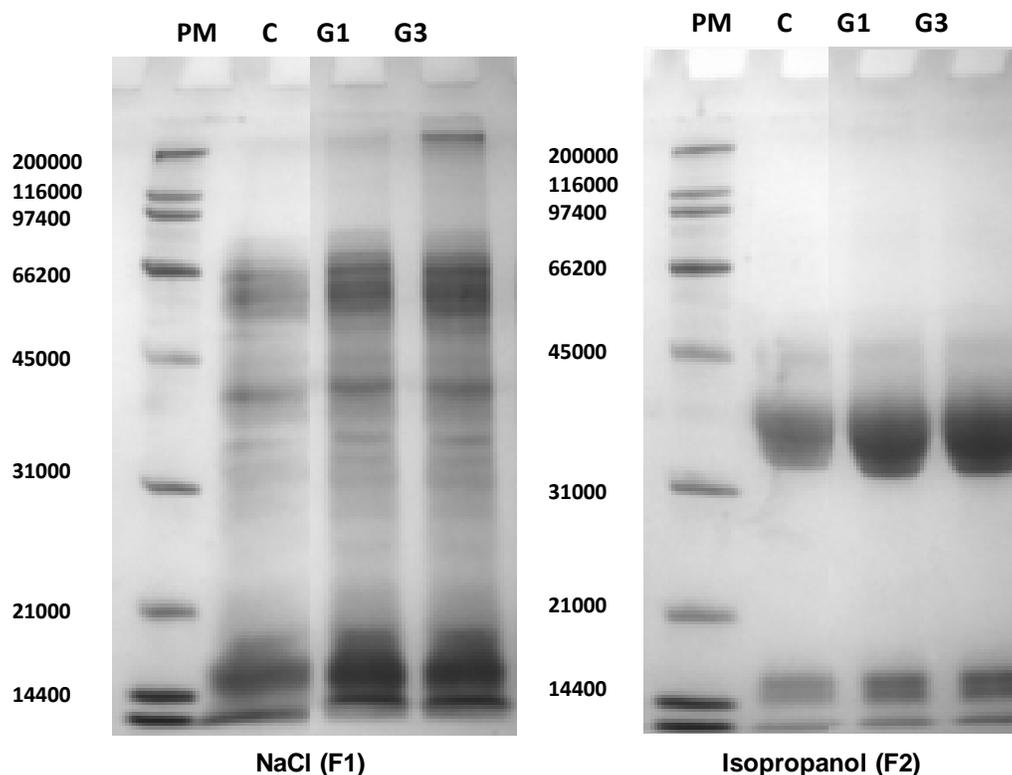
**4.2.3. Estudio de las distintas fracciones proteicas modificadas por la enzima glucosa oxidasa.** Hasta aquí se observó que la enzima glucosa oxidasa disminuyó el contenido de grupos sulfhidrilo libres de las proteínas de la masa trigo y modificó el contenido y las propiedades reológicas del macropolímero de gluteninas. Sin embargo, aún no se puede especificar cuáles de las proteínas del trigo son los mejores sustratos para la enzima y los tipos de enlaces que puede catalizar. Por lo cual se analizó el efecto de la enzima sobre la solubilidad de las proteínas. A partir de las distintas masas liofilizadas se extrajeron las proteínas en forma secuencial utilizando distintos solventes, posteriormente se determinó el contenido de proteínas de cada fracción y su perfil electroforético en condiciones reductoras. El porcentaje de proteínas de cada fracción fue calculado en base a 100 g de masa liofilizada como (%).

En la Figura 2.9 se muestra el efecto de Gox sobre el contenido de proteínas solubles en solución salina (NaCl 5% p/v) y alcohólica (isopropanol 70% p/v), correspondientes a las fracciones F1 y F2, respectivamente.



**Figura 2.9.** Efecto de la glucosa oxidasa sobre la solubilidad de las proteínas en NaCl (F1) y en Isopropanol (F2). Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

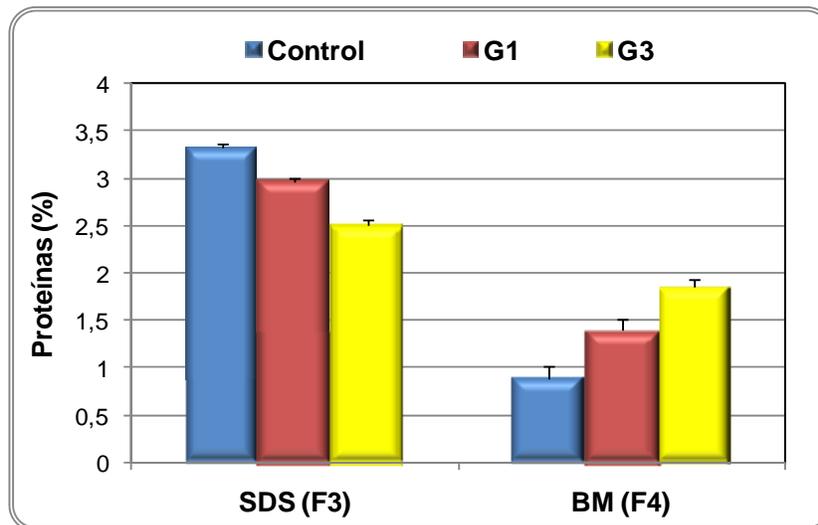
La fracción F1 correspondió principalmente a albúminas y globulinas. No se observaron diferencias significativas entre el contenido de proteínas de F1 de las distintas muestras con Gox y el control (Figura 2.9). Sin embargo, el patrón electroforético de la dosis más elevada de Gox (0,01 %) mostró una banda intensa adicional de masa molecular  $> 200000$  (Figura 2.10) que puede corresponder principalmente a grandes agregados formados por entrecruzamiento de proteínas por enlaces covalentes no-disulfuros, ya que SDS-PAGE fue hecha bajo condiciones reductoras. Estos enlaces pueden ser entrecruzamientos entre residuos de tirosina de proteínas. No se observó una disminución de la intensidad de las bandas correspondientes a las albúminas y globulinas de masa molecular alta (entre 40000 - 65000), ni a las de masa molecular baja (entre 14000-16000), por lo que los grandes agregados ( $> 200000$ ) estarían formados por proteínas correspondientes a otras fracciones (F2, F3 y F4) que al formarse se solubilizaron en NaCl. Vemulapalli *et al.* (1998) y Rasiah *et al.* (2005) obtuvieron un efecto similar de la enzima Gox sobre las albúminas y globulinas.



**Figura 2.10.** Patrones electroforéticos de las proteínas extraídas con NaCl (F1) y con Isopropanol (F2). Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

Las proteínas extraídas con isopropanol (F2) corresponden principalmente a las gliadinas. No se observó un efecto significativo de la enzima Gox sobre el contenido de esta fracción (F2) (Figura 2.9). La enzima glucosa oxidasa actúa principalmente oxidando los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteínas de las proteínas. El hecho de que no se haya observado un efecto de la Gox sobre el contenido de las gliadinas puede deberse al bajo contenido de cisteínas de este grupo de proteínas y a que estas solo pueden formar puentes disulfuro intracatenarios. Varios autores (Allen 1999, Rasiah *et al.* 2005 y Bonet *et al.* 2006) indicaron que debido a la forma compacta y esférica de las gliadinas, se requiere una alta dosis de Gox para modificarlas. Los tres perfiles electroforéticos de las proteínas de F2 fueron similares (Figura 2.10), las bandas correspondientes a las

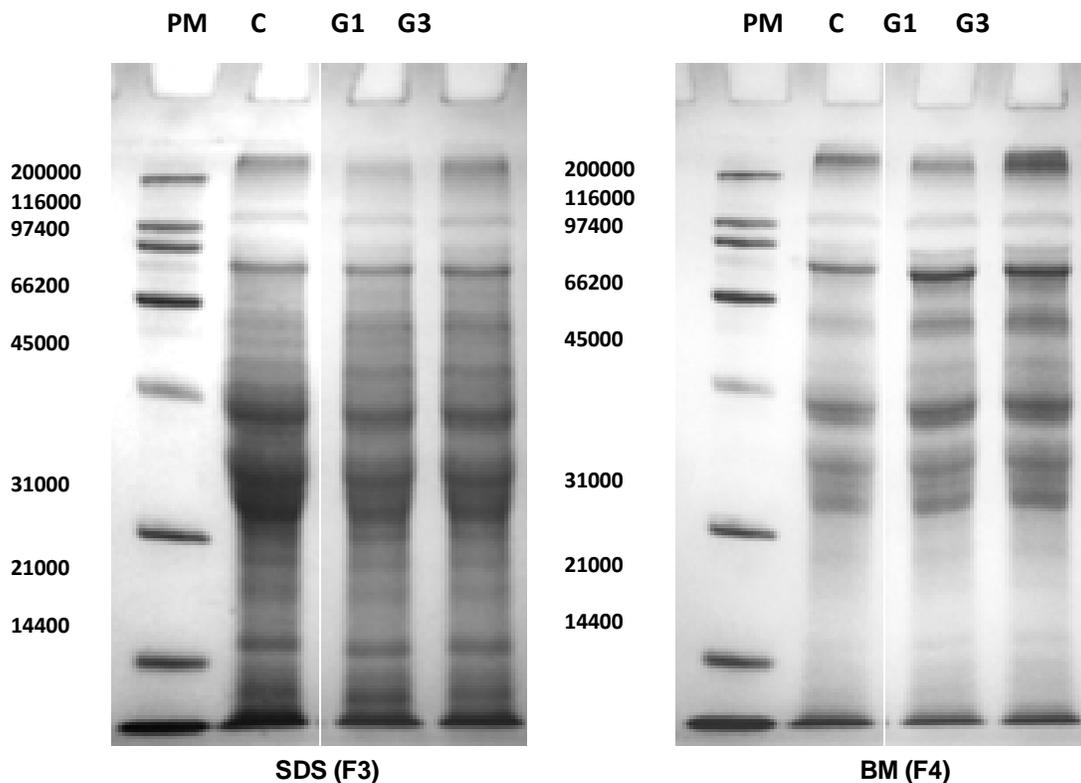
$\omega$ -gliadinas (entre 40000 y 50000 de masa molecular) se observaron muy tenues, mientras que la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -gliadinas (al igual que F2 de las muestras con Pn) se encontraron agrupadas en una mancha intensa de aproximadamente 35000 de masa molecular y que no fue posible de separar por SDS-PAGE.



**Figura 2.11.** Efecto de la glucosa oxidasa sobre la solubilidad de las proteínas en SDS (F3) y en buffer de muestra (F4). Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

La solubilidad de las proteínas en SDS (F3) disminuyó con el agregado de Gox, y en consecuencia el contenido de proteínas de F4 fue significativamente mayor respecto al control (Figura 2.11). Los patrones electroforéticos de las proteínas correspondientes a F3 son presentados en la Figura 2.12. Se observó una disminución en general de la intensidad de todas las bandas de F3 de las muestras con Gox comparado con la muestra control. Las distintas proteínas podrían estar participando en la formación de agregados de gran tamaño mediante puentes disulfuro y enlaces ditirosina que quedaron insolubles en SDS. Hanf y Koehler (2006) observaron un incremento de la concentración de enlaces ditirosina con el agregado de glucosa oxidasa y glucosa en la formulación de la

masa, indicando un mayor número de entrecruzamiento entre las proteínas del gluten.



**Figura 2.12.** Patrones electroforéticos de las proteínas extraídas con SDS (F3) y con buffer de muestra (F4). Control: masa elaborada sin enzima. G1: masa elaborada con 0,001% de glucosa oxidasa. G3: masa elaborada con 0,01% de glucosa oxidasa.

El alto contenido de proteínas en esta última fracción (F4) indicó la presencia de grandes agregados insolubles en SDS formados principalmente por entrecruzamiento de proteínas por enlaces disulfuro S-S y no-disulfuro intercatenarios (Figura 2.11). Bonet *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares, ya que observaron mediante electroforesis capilar una disminución del área del pico correspondiente a las HMW-GS a medida que se incrementaba la dosis de Gox, indicando que la enzima dificultó la extracción de las gluteninas. El patrón electroforético de F4 de las muestras con Gox (Figura 2.12) presentó mayor intensidad que el control en todas las bandas en general. Las diferencias más notorias con respecto al control se observaron en las bandas correspondientes a

60000 de masa molecular y a la HMW-GS de 85000 de masa molecular, que fueron más intensas en las muestras con Gox. Este resultado indicó que las proteínas correspondientes a estas bandas pudieron haber estado formando parte de agregados insolubles en SDS mediante puentes disulfuro. Además se observó una banda oscura al comienzo del gel separador en la muestra con alto contenido de Gox (0,01%) que correspondió a agregados de gran tamaño formados por enlaces covalentes ditirosina. ya que no pudieron ser disociados por el agente reductor. Este hecho sugiere que la naturaleza de la matriz proteica formada por la enzima glucosa oxidasa es diferente a la formada sin la enzima (control), hecho comprobable con las micrografías SEM (Figura 2.5).

### **5. Análisis de correlación entre los distintos parámetros.**

En la Tabla 2.5 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre distintos parámetros. Se obtuvieron correlaciones inversas entre el volumen específico del pan y la mayoría de los parámetros analizados. En general la enzima glucosa oxidasa causó la disminución del volumen específico del pan y un aumento el tiempo de desarrollo, la estabilidad,  $G'$ ,  $G''$  de la masa, también correlacionó inversamente con el contenido de GMP y los valores de  $G'$  y  $G''$  del gel de proteínas. A su vez el menor volumen específico del pan se correlacionó con la mayor viscoelasticidad de la masa y del GMP, es decir con  $\tan \delta$ . El tiempo de desarrollo de la masa y la estabilidad correlacionaron positivamente con el  $G'$  ( $r = 0,95$  y  $r = 0,75$  respectivamente), indicando que una masa más elástica necesita de un mayor tiempo de amasado para su desarrollo, pero luego es más estable y tolerante al sobreamasado.

Los parámetros reológicos del macropolímero de gluteninas correlacionaron con los parámetros reológicos de la masa ( $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$ ), por lo que el estudio del comportamiento de las proteínas del GMP permite predecir el comportamiento de la masa.

Tabla 2.5. Coeficientes de correlación de Pearson

	VE (cm <sup>3</sup> /g)	Ab (%)	TD (min)	E (min)	G' (KPa)	G'' (KPa)	tan δ	SHL (umol/g)	GMP (%)	G' (GMP)	G'' (GMP)	Tan δ (GMP)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	
VE	1																
Ab (%)	0,01	1															
TD (min)	-0,86*	-0,24	1														
E (min)	-0,93*	0,25	0,67	1													
G' (KPa)	-0,90*	0,00	0,95*	0,75*	1												
G'' (KPa)	-0,79*	-0,08	0,95*	0,69	0,94*	1											
tan δ	0,81*	0,00	-0,65	-0,70*	-0,75*	-0,48	1										
SHL (umol/g)	0,76*	0,05	-0,63	-0,62	-0,65*	-0,55	0,63*	1									
GMP (%)	-0,64*	-0,21	0,65	0,47	0,65	0,69	-0,37	-0,95*	1								
G' (GMP)	-0,98*	0,04	0,83*	0,90*	0,85*	0,76*	-0,79*	-0,72*	0,65	1							
G'' (GMP)	-0,98*	0,06	0,88*	0,88*	0,91*	0,84*	-0,81*	-0,76*	0,69	0,99*	1						
tan δ (GMP)	0,92*	-0,02	-0,71*	-0,93*	-0,70*	-0,66	0,60	0,68*	-0,63	-0,93*	-0,88*	1					
F1 (%)	-0,26	-0,12	0,28	0,04	0,24	0,21	-0,24	-0,61	0,72*	0,39	0,40	-0,26	1				
F2 (%)	-0,82*	-0,49	0,77*	0,67	0,77*	0,67	-0,77*	-0,55	0,48	0,74*	0,73*	-0,71*	0,07	1			
F3 (%)	0,92*	0,02	-0,82*	-0,83*	-0,89*	-0,86*	0,72*	0,92*	-0,84*	-0,89*	-0,92*	0,85*	-0,42	-0,74*	1		
F4 (%)	-0,83*	-0,17	0,87*	0,61	0,87*	0,85*	-0,67	-0,88*	0,88*	0,83*	0,88*	-0,69	0,62	0,67	-0,90*	1	

\*Coeficientes de correlación de Pearson significativos con  $p \leq 0,05$

La concentración de grupos SHL correlacionó inversamente con los valores de G' de la masa y del GMP y tuvo una correlación positiva con los valores de tan δ de ambos. Estas correlaciones indicaron que tanto la masa como el gel de proteínas son más elásticos cuanto menor es la concentración de grupos sulfhidrido libre, es decir cuánto más entrelazada es la red de gluten.

TERCERA SECCIÓN:  
**TRANSGLUTAMINASA**

## 1. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la calidad del pan.

Algunos autores (Gerrard *et al.* 1998, Huang *et al.* 2008) observaron que el uso de enzimas no oxidativas que incorporan entrecruzamientos entre las proteínas de la masa trigo, tales como la transglutaminasa, causaban efectos positivos sobre la calidad de los productos panaderos. En la Tabla 3.1 se muestra el efecto de la enzima transglutaminasa sobre el volumen específico del pan. A diferencia de las observaciones encontradas por Gerrard *et al.* (1998) y Huang *et al.* (2008) la enzima transglutaminasa causó una disminución significativa del volumen específico del pan a medida que se incrementó la dosis utilizada. Cuando en la formulación se utilizó 0,5% de transglutaminasa, los panes desarrollaron un volumen 25% menor que el pan control (sin enzima). Mientras que, cuando la dosis utilizada fue menor (0,01%) los panes presentaron un volumen específico similar al control. Además de la disminución del volumen de los panes debido al agregado de la enzima, también se observó que estos panes tenían un mayor peso luego de la cocción (datos no mostrados), lo que indica una menor pérdida de agua durante el horneado. El menor volumen específico del pan con el agregado de TG fue coincidente con los resultados postulados por otros autores (Basman *et al.* 2002, Bauer *et al.* 2003b, Caballero *et al.* 2006, Caballero *et al.* 2007, Koh & Ng 2009), quienes encontraron efectos negativos de la enzima cuando las dosis utilizadas fueron elevadas, atribuyendo este resultado al excesivo entrecruzamiento (*cross-linking*) que causa el endurecimiento de la masa.

Mediante el análisis de perfil de textura, se determinaron la dureza y la masticabilidad de la miga de pan. Dichas determinaciones se realizaron sobre el pan recién elaborado (pan fresco) y luego de 1 y 3 días de almacenamiento, con el objetivo de analizar el efecto de la enzima sobre el endurecimiento de la miga de pan durante el tiempo de almacenamiento. Aunque no se observaron diferencias en el volumen específico del pan entre el control y la dosis de TG de 0,01%, este nivel de enzima causó una disminución significativa de la dureza y la masticabilidad de la miga de pan fresco (Tabla 3.1). Por el contrario, la dosis más

alta de transglutaminasa utilizada causó un aumento significativo de la firmeza y masticabilidad de la miga de pan, resultado que se relacionó principalmente al bajo volumen que tuvieron estos panes.

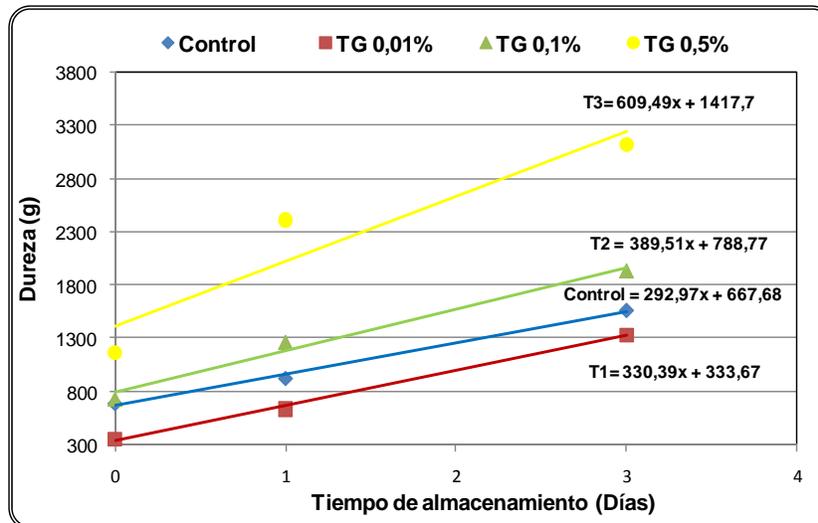
**Tabla 3.1.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre las características del pan fresco.

Variable	Control	T1	T2	T3
VE (cm <sup>3</sup> /g)	4,67c	4,71c	3,84b	3,59a
Dureza (g)	691,40b	352,63a	732,98b	1163,18c
Masticabilidad (g)	441,64b	249,34a	472,94b	738,14c

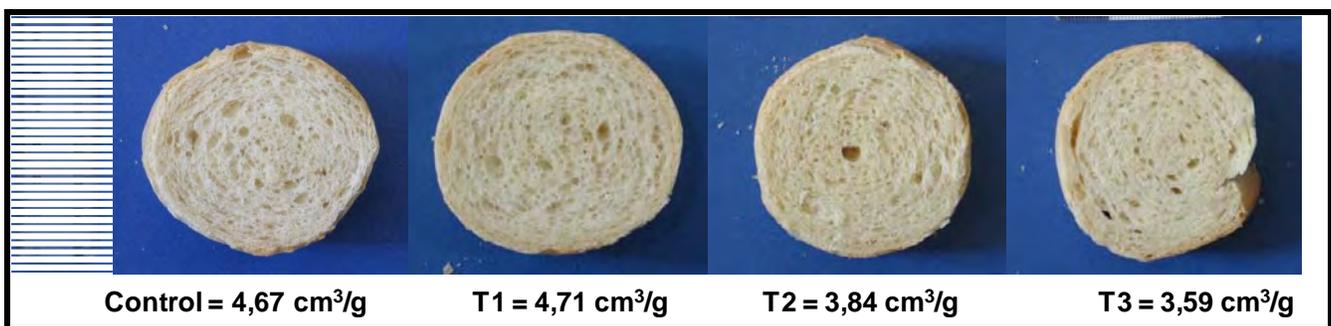
Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ . Control: pan elaborado sin enzima. T1: pan elaborado con 0,01% de transglutaminasa. T2: pan elaborado con 0,1% de transglutaminasa. T3: pan elaborado con 0,5 % de transglutaminasa.

Como se mencionó en la primera y segunda sección, el cálculo de la pendiente de los puntos de dureza de la miga de pan en función del tiempo de almacenamiento de cada una de las muestras presentadas en la Figura 3.1 nos proporciona una idea de la velocidad de endurecimiento de la miga de pan. De acuerdo a las ecuaciones presentadas (Figura 3.1) y a pesar del efecto marcado de la enzima a nivel 0,01% sobre los parámetros de calidad de la miga de pan fresco, no se observó una disminución en la velocidad de endurecimiento de la miga con respecto a los panes control. Por el contrario, las dosis más elevadas de transglutaminasa alcanzaron más rápidamente una alta firmeza de la miga de pan después de tres días de almacenamiento de los panes. Este incremento en la dureza y la masticabilidad de los panes con altas dosis de transglutaminasa se debió principalmente al menor volumen desarrollado y a la formación de una miga con alveolos pequeños y con bajo porcentaje de aire. Koh y Ng (2009) obtuvieron resultados similares, ya que el agregado de transglutaminasa causó una disminución del volumen específico del pan y un incremento de la dureza de la

miga de pan fresco y de la miga después de 24 horas de almacenamiento comparado con el pan control (sin enzima).



**Figura 3.1.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la dureza (g) de la miga de pan a los días 0, 1 y 3 de almacenamiento. Control: pan elaborado sin enzima. T1: pan elaborado con 0,01% de transglutaminasa. T2: pan elaborado con 0,1% de transglutaminasa. T3: pan elaborado con 0,5 % de transglutaminasa.



**Figura 3.2.** Fotos de panes elaborados sin enzima (control) y con 0,01% (T1), 0,1% (T2) y 0,5% (T3) de transglutaminasa.

En la Figura 3.2 se presentan fotos de los panes obtenidos sin enzima (control) y con los tres niveles de transglutaminasa utilizados. Como puede observarse, las dosis altas de transglutaminasa presentaron menor volumen de

pan y la estructura de la miga fue más cerrada con pequeños alveolos. Mientras que la dosis más baja (0,01%) mostró una miga más aireada y con alveolos más grandes, a pesar de que el aumento en el volumen no fue significativo.

## **2. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre las propiedades reológicas de la masa.**

En esta etapa se prosiguió a caracterizar reológicamente las masas preparadas con las distintas dosis de la enzima transglutaminasa. El análisis del comportamiento de la masa durante el amasado se realizó mediante los ensayos farinográficos de cada formulación. En la Tabla 3.2 se presentan los parámetros farinográficos (Ab, TD y E) de las masas con y sin transglutaminasa. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros obtenidos en este ensayo con respecto al control, sólo la aplicación de la dosis más alta de transglutaminasa produjo un leve incremento de la estabilidad frente al sobreamasado. Bauer *et al.* (2003), trabajaron con dosis similares y observaron que altos niveles de TG causaron un aumento del tiempo de desarrollo y una disminución de la máxima consistencia de la masa. Basman *et al.* (2002) analizaron el efecto de la transglutaminasa sobre una harina de trigo fuerte y observaron que la enzima aumentó el tiempo de desarrollo y la estabilidad hasta una determinada dosis (~ 0,25%) y luego los disminuyó cuando la dosis de transglutaminasa fue mayor. En un reciente trabajo (Medina-Rodriguez *et al.* 2009) se estudió el efecto de la transglutaminasa sobre diferentes tipos de trigos y observaron que el efecto de la enzima sobre los parámetros farinográficos es fuertemente dependiente de la dosis utilizada cuando el trigo es duro. Mientras que para trigos fuertes y blandos la TG disminuyó significativamente la absorción farinográfica y aumentó el tiempo de desarrollo y la estabilidad. Las discrepancias encontradas entre estos autores y los resultados presentados en este trabajo pueden deberse principalmente a diferencias en la naturaleza y pureza de la enzima utilizada, a las diferentes dosis de transglutaminasa analizadas y a las características de la harina empleada.

**Tabla 3.2.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre los parámetros farinográficos de la masa.

Variable	Control	T1	T2	T3
<b>Ab (%)</b>	63,35	63,30	63,50	63,60
<b>TD (min)</b>	10,00	11,00	10,75	11,50
<b>E (min)</b>	16,88	15,63	16,38	18,00

Ab: absorción farinográfica de agua, TD: tiempo de desarrollo de la masa, E: estabilidad de la masa. Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5 % de transglutaminasa.

Se realizaron también ensayos de extensión uniaxial y biaxial de las masas, que permitieron principalmente analizar su comportamiento durante la elaboración del producto y profundizar en el estudio del efecto de la enzima. En la Tabla 3.3 se presentan los parámetros de extensión uniaxial, biaxial y de reología dinámica de las muestras sin (control) y con transglutaminasa. Como puede observarse, a medida que se incrementó la dosis de transglutaminasa en la formulación, se obtuvieron mayores valores de resistencia máxima a la deformación ( $R_m$ ), indicando que la TG reforzó significativamente la masa. Una tendencia inversa fue observada en el parámetro extensibilidad (E), ya que altas dosis de enzima disminuyeron significativamente la extensibilidad máxima de la masa. Las masas elaboradas con 0,1% y 0,5% de transglutaminasa tuvieron, respectivamente, 40% y 100% más de resistencia máxima a la extensión, y consecuentemente 15% y 35% menos de extensibilidad que el control. En la Figura 3.3 se muestran las curvas obtenidas a partir de los ensayos de extensión uniaxial de las muestras con transglutaminasa y el control (sin enzima). No se observaron diferencias significativas en el área bajo la curva entre las distintas muestras.

Estos resultados coincidieron con aquellos publicados previamente por Basman *et al.* (2002), Bauer *et al.* (2003), Autio *et al.* (2005), Caballero *et al.* (2007) y Koh y Ng (2009). Sin embargo la dosis más baja, 0,01% produjo masas

levemente más extensibles en concordancia con lo observado en las características del pan, el cual fue un poco más voluminoso y con miga más tierna.

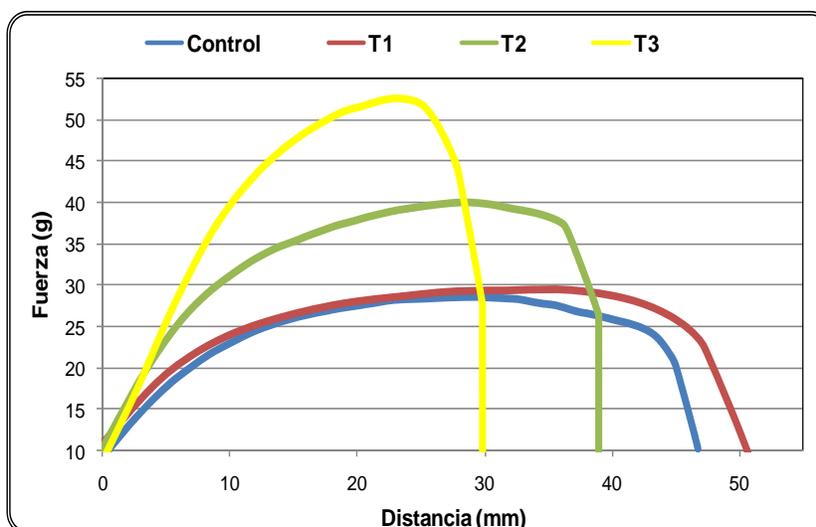
**Tabla 3.3.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre los parámetros de extensión uniaxial, biaxial y de reología dinámica de la masa.

Variable	Control	T1	T2	T3
<b>Extensión Uniaxial</b>				
<b>Rm (g)</b>	29,64a	30,73a	40,17b	53,30c
<b>Em (mm)</b>	46,61c	50,03c	39,28b	29,57a
<b>Area (g mm)</b>	1085,78a	1185,93a	1213,25a	1115,86a
<b>Extensión Biaxial</b>				
<b>Valor P (mm)</b>	187,61a	239,52b	255,95bc	284,83c
<b>Valor L (mm)</b>	63,90a	65,17ab	73,32b	65,94ab
<b>W (Jx10<sup>4</sup>)</b>	523,56a	724,95b	846,18c	865,36c
<b>P/L</b>	2,96a	3,69ab	3,52ab	4,37c
<b>Viscoelasticidad</b>				
<b>G' (kPa)*</b>	15,17a	14,60a	17,64b	18,48b
<b>G'' (kPa)*</b>	5,18abc	4,74a	5,54c	5,03ab
<b>tan δ*</b>	0,34c	0,32bc	0,31b	0,27a

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

\*Fueron determinados a 0,1 Hz.

Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5 % de transglutaminasa.

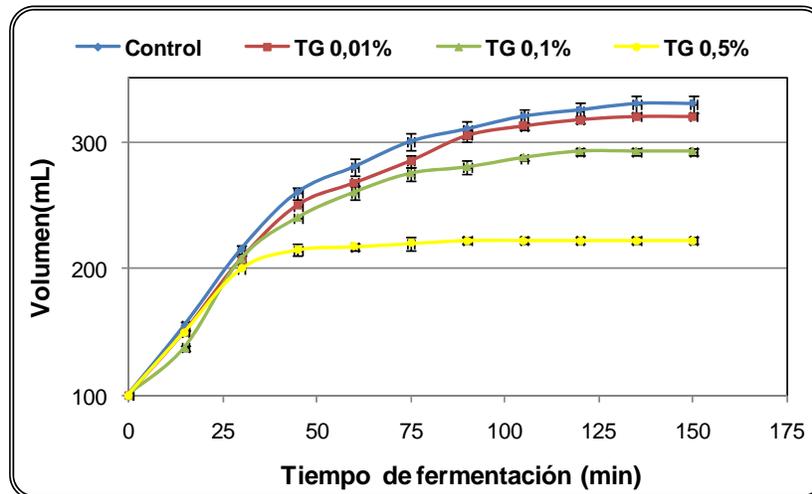


**Figura 3.3.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la extensibilidad uniaxial de la masa. Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

Mediante el ensayo de extensión biaxial se obtuvieron los valores P (tenacidad), L (extensibilidad), W (trabajo) y la relación P/L de las masas con y sin enzima (Tabla 3.3). Todas las dosis de transglutaminasa utilizadas aumentaron significativamente el valor P y W de las masas, mientras que no causaron un efecto significativo sobre el valor L. Por lo que, la relación P/L aumentó significativamente a medida que se incrementó la dosis de enzima agregada en la formulación. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos anteriormente en los ensayos de extensión uniaxial, el coeficiente de correlación entre Rm y el valor P fue  $r = 0,81$  ( $p \leq 0,05$ ). A su vez éstos parámetros de extensión correlacionaron negativamente con el volumen de pan ( $r = -0,9$  y  $r = -0,73$  respectivamente,  $p \leq 0,05$ ); ya que una elevada fuerza panadera condujo a la obtención de panes de bajo volumen específico del pan. En resumen la enzima causó un excesivo aumento de la fuerza de la masa haciéndola más resistente y menos extensible dificultando la expansión del volumen durante la fermentación y el horneado de los panes.

Por último se realizaron ensayos de reología dinámica, éstos permiten obtener información acerca de la red de proteínas de la masa trigo, ya que son sensibles a pequeñas variaciones en la estructura de las masas. Para estos ensayos se realizó previamente un barrido de deformación para determinar el rango de viscoelasticidad lineal. Posteriormente se efectuaron a 25 °C los barridos de frecuencias entre 0,03 Hz y 100 Hz a una deformación constante de 0,016 % (rango lineal) y se obtuvieron los valores de  $G'$  (módulo de almacenamiento o elástico),  $G''$  (módulo de pérdida o viscoso) y  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ). En la Tabla 3.3 se muestran los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  a 0,1 Hz de las masas control (sin enzima) y con las distintas dosis de transglutaminasa. Los nuevos enlaces covalentes entre las proteínas introducidos por la enzima transglutaminasa afectaron la estructura de la red de gluten y consecuentemente sus propiedades viscoelásticas. Las dosis más altas de transglutaminasa aumentaron significativamente el módulo de almacenamiento indicando un incremento de la elasticidad de la masa, que probablemente se deba al alto entrecruzamiento entre las proteínas del gluten. Por el contrario, no hubo diferencias significativas entre los valores del módulo de pérdida de las muestras con y sin enzima, por lo que los valores de  $\tan \delta$  de las masas con altos niveles de TG fueron significativamente menores al obtenido para el control. Cuando los valores de  $\tan \delta$  son más cercanos a cero, la masa en estudio se asemeja a un material totalmente elástico. Por lo tanto, las masas que tuvieron menores valores de  $\tan \delta$  que la masa control presentaron una estructura de la red proteica más viscoelástica. Larré *et al.* (1998) observaron que  $G'$  y  $G''$  de las masas aumentaron como consecuencia del tratamiento enzimático con transglutaminasa. Sin embargo otros autores reportaron que la fuerza de la masa depende tanto de la dosis de enzima como de la calidad de la harina de trigo utilizada (Basman *et al.* 2002, Bauer *et al.* 2003, Autio *et al.* 2005). Por último, las masas elaboradas con bajo contenido de transglutaminasa (0,01%) y la masa control no mostraron diferencias significativas en el comportamiento reológico. Resultados similares fueron observados por Huang *et al.* (2008) quienes relacionaron altos valores de  $G'$  con masas más fuertes y elásticas como

consecuencia del tratamiento con transglutaminasa que favoreció la agregación de las proteínas del gluten.



**Figura 3.4.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la expansión de la masa durante la fermentación. Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

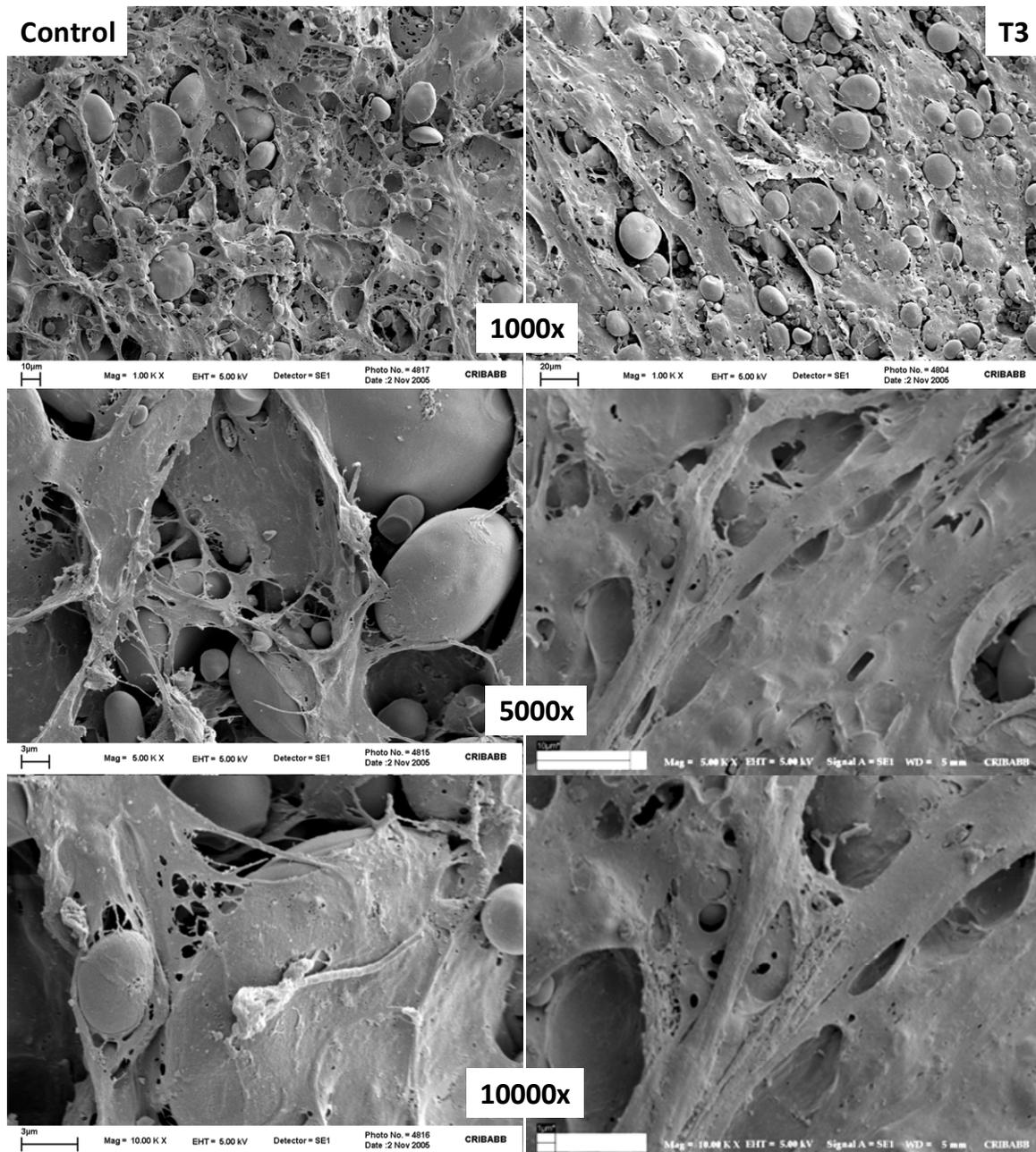
A partir del análisis de la capacidad de expansión de las masas durante la fermentación, se pudo evaluar no sólo el comportamiento de la masa durante la fermentación si no también el tiempo óptimo de fermentación para cada masa. Las curvas de incremento de volumen de las distintas masas durante el tiempo de fermentación se muestran en la Figura 3.4. Como puede observarse, a medida que se incrementó la dosis de transglutaminasa, menor fue el tiempo de fermentación, es decir más rápidamente se alcanzó el máximo volumen desarrollado (T3 = 45 min). El volumen desarrollado por la masa con 0,5% de TG fue ~ 30% menor que el volumen de la masa control. Como se mencionó en las otras secciones, la producción de CO<sub>2</sub> fue similar para todas las muestras, ya que el porcentaje de levadura agregado fue el mismo. Como no se observaron grietas en las superficie de las masas donde se pudiera escapar el gas se entiende que los bajos volúmenes desarrollados por las masas con altos niveles de TG se

debieron principalmente a que la presión del CO<sub>2</sub> no fue suficiente como para vencer la alta resistencia a la expansión que presentaron estas masas. La matriz proteína-almidón que rodea los alveolos fue fuerte y poco extensible en concordancia con los resultados obtenidos mediante extensión uniaxial y biaxial. El bajo volumen obtenido durante la fermentación de las masas con transglutaminasa es coincidente con el bajo volumen de pan obtenido en estas muestras, el coeficiente de correlación de Pearson entre ambos parámetros fue  $r = 0,87$  ( $p \leq 0,05$ ).

### **3. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la microestructura de la masa.**

En la Figura 3.5 se presentan las microfotografías de las masas elaboradas sin enzima (control) y con 0,5% de transglutaminasa (T3) tomadas con diferentes aumentos (1000x, 5000x y 10000x).

La microestructura de la masa con alto contenido de TG presentó, comparada con la masa control, una red de gluten continua y cerrada (Figura 6). Las fibras del gluten fueron gruesas indicando la formación de una red fuerte y resistente. Además, la masa elaborada con transglutaminasa posee menor número y tamaño de poros que la masa control, por lo que se concluye que no debería haber pérdida de CO<sub>2</sub> durante la fermentación. Huang *et al.* (2008) obtuvieron microfotografías de masas con y sin transglutaminasa y no observaron grandes diferencias entre ambas. Estos autores postularon que en la masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa los gránulos de almidón se encontraban fijados e incluidos dentro de la red de gluten, rodeados de esta matriz proteica, mientras que en la masa control (sin enzima) los pocos gránulos de almidón se encontraban sueltos en la red de proteínas.



**Figura 3.5.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la microestructura de la masa. Microfotografías de masas elaboradas sin enzima (Control) y con 0,5% de transglutaminasa (T3). Aumentos: 1000x, 5000x y 10000x.

#### 4. Caracterización química de los componentes de la masa.

Durante el amasado se producen numerosas interacciones entre los distintos componentes de la harina y el agua para formar la red de gluten. De

acuerdo a esto se consideró importante conocer la influencia de la enzima transglutaminasa sobre la estructura y el comportamiento de los principales componentes de la masa. Se intentó dilucidar la naturaleza de las interacciones y cómo éstas contribuyen a la estabilización de la estructura de la matriz panaria. Para tal efecto se prepararon masas (con y sin enzima) con el porcentaje de agua óptimo, después de una hora de reposo las masas fueron liofilizadas y almacenadas a -18 °C hasta su uso posterior.

#### 4.1. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre los pentosanos.

La harina de trigo, como se explicó anteriormente, contiene pentosanos solubles en agua (menor tamaño) y pentosanos insolubles (mayor tamaño). Ambos tipos influyen en la formación de la masa porque modifican el porcentaje de agua disponible para la formación de la red de gluten y además interactúan con las proteínas afectando la agregación de la red. Por lo tanto, se prosiguió a determinar el contenido de los pentosanos totales (PT) y solubles (PS) con el objeto de considerar si las modificaciones introducidas por la enzima transglutaminasa afectan a los pentosanos de la masa de trigo.

**Tabla 3.4.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre los pentosanos de las masas liofilizadas.

Variable	Control	T1	T2	T3
PT (%)	3,57a	3,59a	3,62a	3,58a
PS (%)	1,35a	1,33a	1,32a	1,37a
PI (%)	2,22a	2,26a	2,30a	2,20a

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ . PT: Pentosanos Totales, PS: Pentosanos Solubles, PI: Pentosanos Insolubles. Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

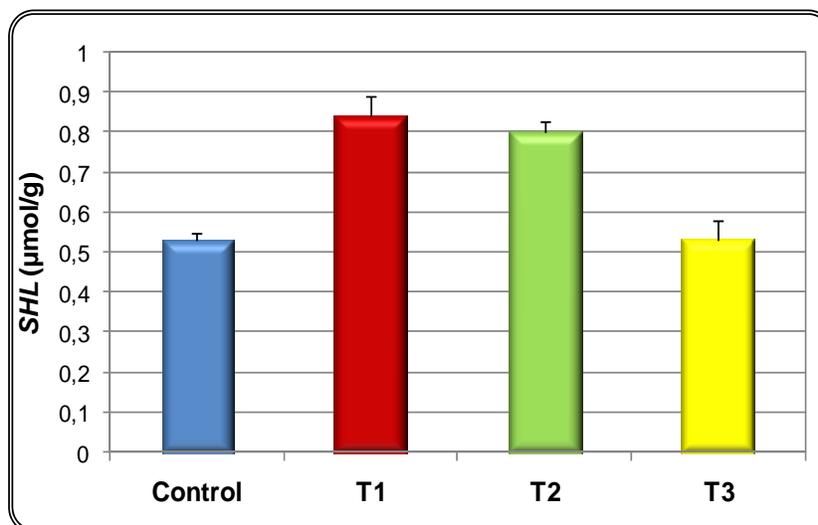
Ninguna diferencia significativa fue observada en el contenido de pentosanos totales entre las masas con TG y la masa control (Tabla 3.4); como se mencionó en las secciones anteriores, este resultado fue esperado ya que se utilizó la misma harina en la elaboración de todas las muestras. Por otro lado, los nuevos enlaces isopeptídicos introducidos entre las proteínas por la enzima transglutaminasa no modificaron la solubilidad de los pentosanos, ya que no se observaron diferencias con respecto al control (Tabla 3.4).

#### **4.2. Efecto de la enzima transglutaminasa sobre las proteínas.**

##### **4.2.1. Determinación de la concentración de grupos sulfhidrilo libres (SHL).**

Las proteínas del gluten poseen la habilidad de formar una red viscoelástica que permite retener CO<sub>2</sub> durante la fermentación y el horneado del pan. Esta aptitud se debe principalmente a que las proteínas poseen residuos de cisteína ubicados en regiones específicas que permiten formar puentes disulfuro intercatenarios constituyendo una red elástica y extensible. En base a este comportamiento, se decidió estudiar el efecto de los nuevos enlaces isopeptídicos introducidos por la transglutaminasa en las proteínas, sobre la formación de puentes disulfuro S-S. La dosis más alta de transglutaminasa no modificó la concentración de grupos sulfhidrilo libres con respecto a la masa control (Figura 3.6). Este resultado estaría indicando que los nuevos entrecruzamientos formados por la enzima no influyeron en la formación de los puentes disulfuro cuando la dosis utilizada fue elevada. La suma de ambos entrecruzamientos (isopeptídicos y disulfuro) permitió la formación de una red de gluten de excesiva fuerza y resistencia cuando se utilizó 0,5% de TG como se observó en los resultados de extensión uniaxial, biaxial y de reología dinámica. Por el contrario, las dosis más bajas de transglutaminasa (0,1% y 0,01%) causaron un incremento significativo del contenido de grupos sulfhidrilo libres, que podría atribuirse a que en éstas muestras el número de entrecruzamientos entre las proteínas fue menor y la nueva estructura de la red de gluten resultante hizo más dificultosa la formación de puentes disulfuro. Además

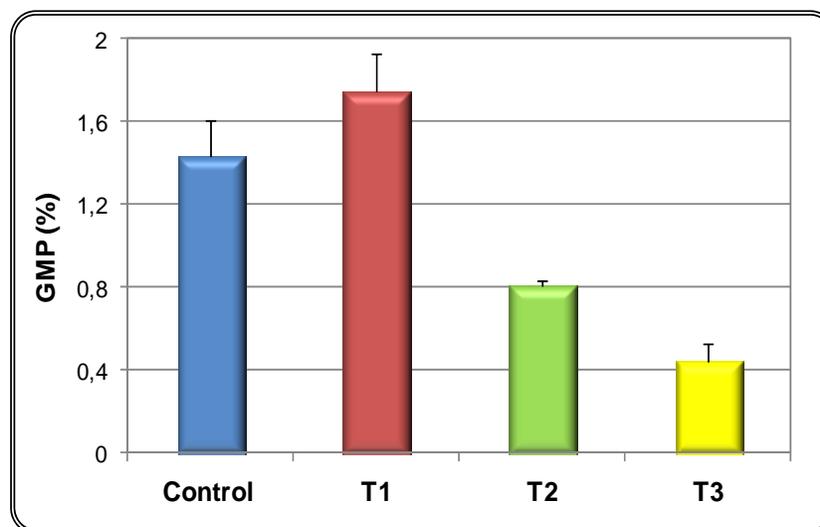
estos nuevos entrecruzamientos pudieron haber escondido o dejado inaccesible los residuos de cisteína hacia el interior e impedir el intercambio SH/S-S.



**Figura 3.6.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la concentración de grupos sulfhidrilo libres (*SHL*) de las masas liofilizadas (micromol/g de masa liofilizada). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

**4.2.2. Macropolímero de Gluteninas (GMP).** Graveland *et al.* (1980) observaron que mediante el uso de detergentes (como dodecil sulfato de sodio) se podía separar una fracción de las proteínas del gluten que llamó gel de proteínas insolubles en SDS y concluyó que su insolubilidad se debía principalmente al gran tamaño y al elevado grado de polimerización. Más tarde este gel proteico fue renombrado por Weegels *et al.* (1996) como macropolímero de gluteninas (GMP) para reflejar su naturaleza de agregado. Estos autores encontraron una alta correlación entre el contenido del macropolímero de gluteninas de la harina y el volumen del pan. En el presente trabajo se procedió a estudiar el efecto de la enzima transglutaminasa sobre el GMP obtenido a partir de masas liofilizadas. En la Figura 3.7 se muestra cómo la transglutaminasa modificó la solubilidad del macropolímero de gluteninas en SDS. El GMP está formado principalmente por

gluteninas de alto peso molecular y estas proteínas son las más afectadas por la TG (Larré *et al.* 1998, Gerrard *et al.* 2001, Autio *et al.* 2005). Cuando la enzima fue agregada en baja dosis, la cantidad de GMP de las masas no fue significativamente diferente al control. Sin embargo cuando la dosis de TG aumentó, la cantidad de GMP disminuyó considerablemente (Tabla 3.5). A pesar del efecto de polimerización de la transglutaminasa, su acción produjo un incremento de la solubilidad en SDS quedando menor cantidad de proteína en el GMP. La transglutaminasa formó grandes polímeros por entrecruzamiento de las proteínas mediante enlaces isopeptídicos. Estos agregados fueron de distinta naturaleza a los formados por entrecruzamiento mediante puentes disulfuro S-S como ocurre en la masa control, por lo que fueron solubles en SDS y formaron una red dura, resistente y poco extensible.

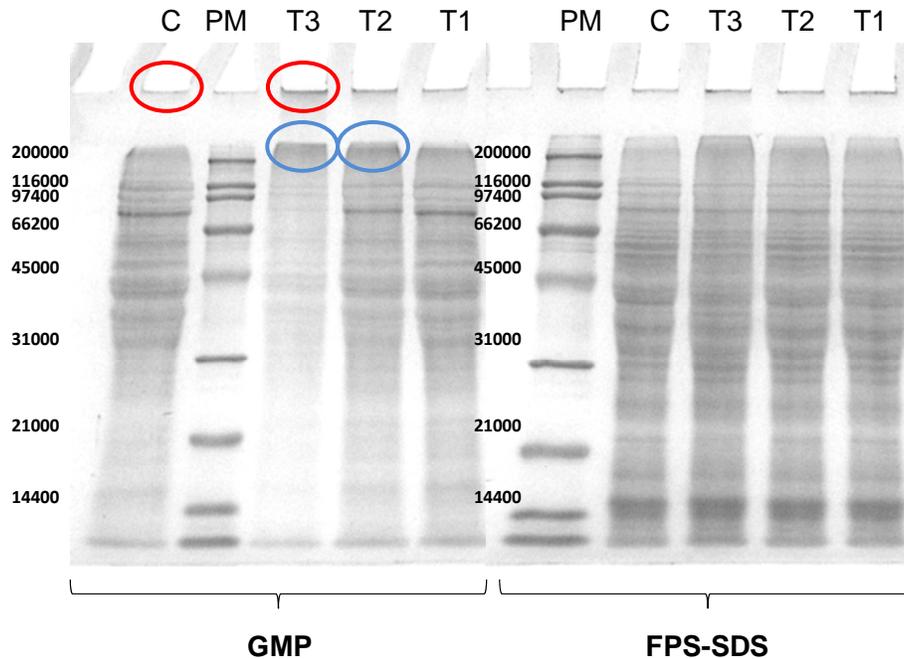


**Figura 3.7.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre el contenido del macropolímero de gluteninas (GMP) de las masas liofilizadas (g de proteínas / 100 g de masa liofilizada). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

**4.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida del GMP y de las proteínas solubles en SDS (FPS-SDS).** Los patrones electroforéticos en condiciones

reductoras de las proteínas insolubles en SDS (GMP) y de la fracción proteica soluble en SDS (FPS-SDS) son presentados en la Figura 3.8. El GMP obtenido a partir de las masas con 0,5% de TG mostró una reducción significativa del área de las bandas en el gel de corrida comparado con el GMP de la muestra control. Este comportamiento podría deberse a que la TG fue capaz de formar grandes agregados por entrecruzamiento de las proteínas que fueron retenidos en el gel stacking como indicó el incremento del valor de IOD (densidad óptica integrada relativa) de la banda proteica correspondiente (círculo rojo) (T3 presentó un IOD = 14,96%, mientras el control tuvo un IOD = 0,18%). Por lo tanto, mediante electroforesis, se detectó el fenómeno de polimerización de la enzima, aunque éste entrecruzamiento no causó un incremento del contenido de GMP. Las muestras con 0,5% y 0,1% de TG mostraron una banda al final del gel stacking (círculos azules), indicando la formación de agregados de alta masa molecular que no pudieron entrar al gel separador. El GMP obtenido a partir de la masa con bajo contenido de TG (0,01%) mostró leves diferencias con respecto al patrón electroforético del GMP control, sin embargo también presentó mayor intensidad en la banda retenida en el gel stacking y en la banda del gel separador  $\cong$  200000 (masa molecular) correspondiente a agregados proteicos grandes.

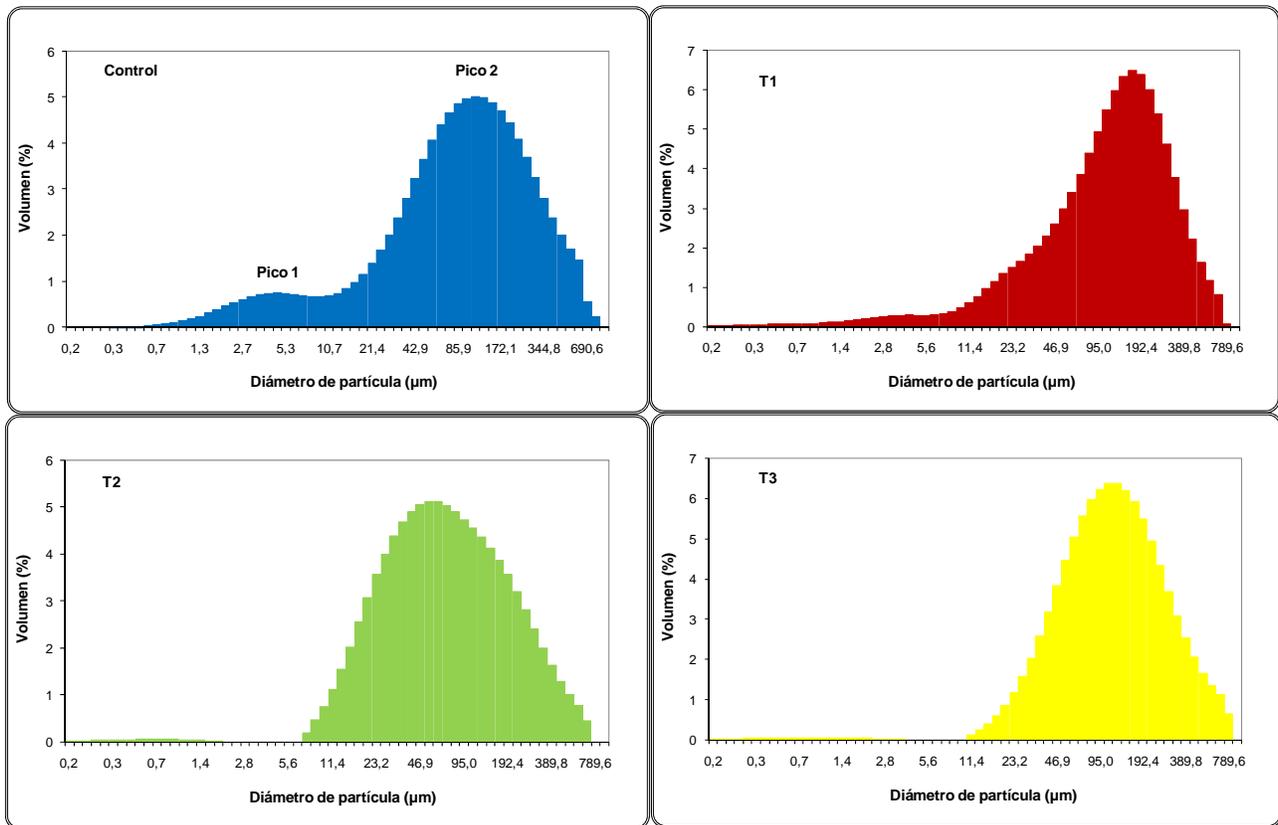
Los patrones electroforéticos de las fracciones proteicas solubles en SDS (FPS-SDS) fueron similares en todas las muestras indicando que los polipéptidos solubles en SDS fueron formados por el mismo tipo de proteínas monoméricas. Sin embargo, los pocos cambios notables observados correspondieron al incremento de agregados de masa molecular  $>$  200000, indicando que hubo cambios tanto en la solubilidad de las proteínas en SDS como en su estructura (%IOD T3 = 7,85%; %IOD T2 = 4,25; %IOD Control = 3,0%). La enzima transglutaminasa afectó la formación del macropolímero de gluteninas en la masa y modificó las características de las partículas de gluteninas. Este cambio fue reflejado por un incremento de la solubilidad en SDS y por la formación de nuevos polímeros proteicos de gran tamaño.



**Figura 3.8.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre el perfil electroforético del macropolímero de gluteninas (GMP) y de la fracción proteica soluble en SDS (FPS-SDS). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa. PM: marcador de peso molecular.

**4.2.4. Determinación del tamaño de partículas del GMP.** En general, agregados proteicos de gran tamaño tienden a ser menos solubles, sin embargo la transglutaminasa causó la formación de agregados de gran tamaño pero aumentó su solubilidad en SDS. De acuerdo a este comportamiento se prosiguió a analizar el tamaño de partículas del macropolímero de gluteninas. En la Figura 3.9 se muestran las distribuciones de tamaño de partícula del GMP de las distintas masas. La muestra control y la muestra con baja proporción de TG presentaron una distribución de tamaño de partícula bimodal, mientras que la distribución de las muestras con 0,5% y 0,1% fue monomodal. La transglutaminasa modificó la distribución de tamaño de partículas del GMP. El pico ubicado entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  (Pico 1) representa la fracción de pequeñas partículas de gluteninas (Don *et al.* 2005). Peighambardoust *et al.* (2005) afirmaron que inevitablemente hay almidón

presente en el GMP; los gránulos de almidón tipo B aparecen entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto ambos picos pueden coincidir.



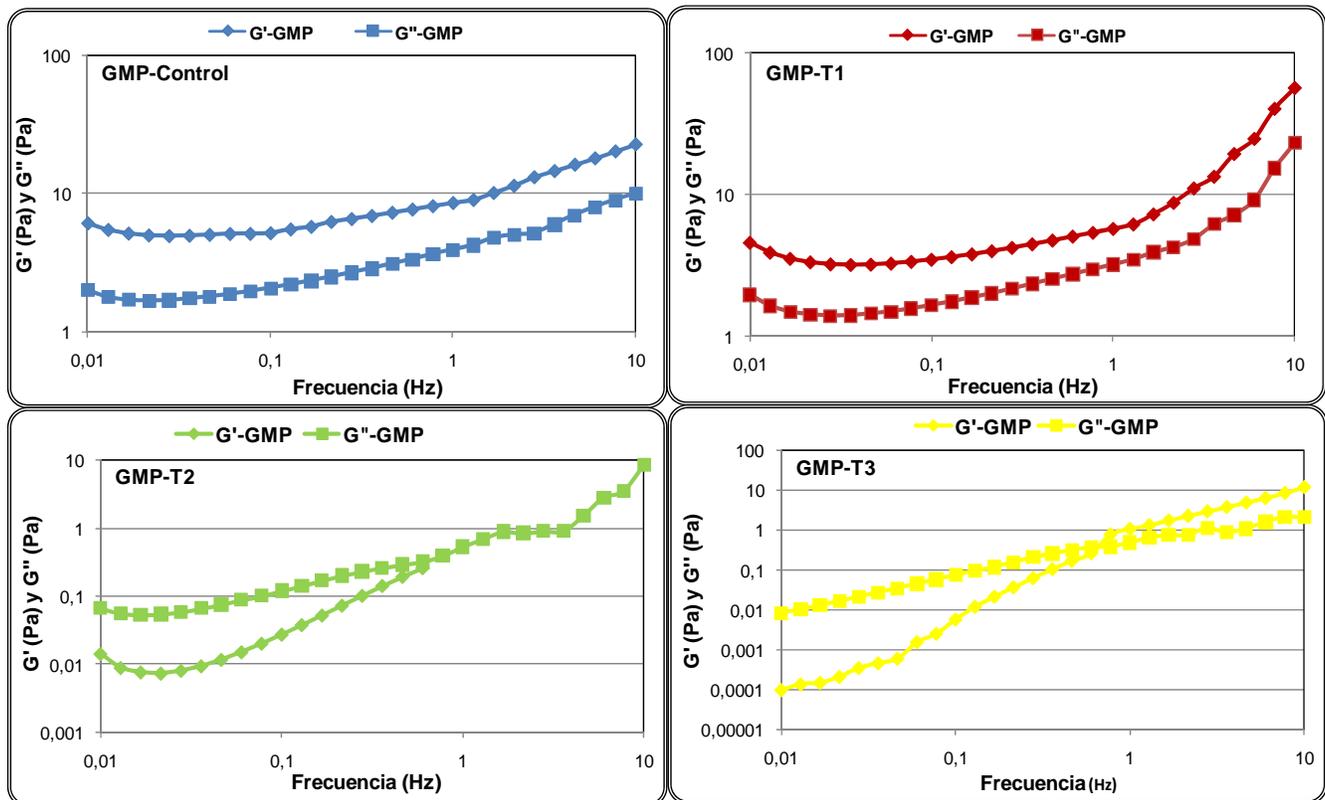
**Figura 3.9.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la distribución de tamaño de partículas del macropolímero de gluteninas (GMP). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

En el presente trabajo, una disminución de la proporción de partículas de gluteninas pequeñas fue observada cuando se incrementó la dosis de TG. El Pico 1 cambió gradualmente con la dosis de TG indicando que esta fracción se relaciona con la acción de la enzima. Consecuentemente se descartó la posibilidad de contaminación con almidón. De la distribución de tamaño de partícula, se estima el parámetro  $D_{3,2}$  que representa el diámetro volumétrico-superficial promedio de la partícula. Los  $D_{3,2}$  para las muestras fueron: 20,1  $\mu\text{m}$

para el control; 26,5  $\mu\text{m}$  para T1; 24,8  $\mu\text{m}$  para T2 y 35,2  $\mu\text{m}$  para T3. Estos resultados indican que el tamaño promedio de las partículas aumentó significativamente en las muestras con mayor contenido de TG, fenómeno atribuible a la presencia de agregados proteicos grandes (Pico 2). El Pico 2 muestra que a dosis de TG más elevadas, mayor es la fracción de partículas de mayor tamaño, es decir no se presentan partículas pequeñas.

**4.2.5. Determinación de las propiedades reológicas del GMP.** Con el propósito de profundizar en el estudio del efecto de la enzima transglutaminasa sobre los agregados proteicos de la masa de trigo, se procedió a caracterizar reológicamente el gel de proteínas insoluble en SDS (GMP). En primer lugar se realizó un barrido de deformación para determinar el rango de viscoelasticidad lineal de los geles. Luego se realizaron los barridos de frecuencia entre 0,03 - 10 Hz a una deformación fija de 0,032% (rango lineal). El módulo de almacenamiento  $G'$  es una medida de la componente elástica del gel y depende primordialmente de la concentración de proteínas del GMP y de sus propiedades estructurales (van Vliet 1999). Otros autores afirmaron que el  $G'$  del GMP depende del tamaño de los polímeros de gluteninas (Don *et al.* 2003a,b). En la Figura 3.10 se muestran los barridos de frecuencias del GMP de las masas con y sin enzima (control). El espectro dinámico obtenido depende del tipo de gel formado. El GMP de la masa control presentó mayores valores de  $G'$  que de  $G''$  en todo el rango de frecuencia, indicando un comportamiento viscoelástico (Figura 3.10). Cuando la dosis de TG fue baja (0,01%), el GMP mostró mayor valor de  $G'$  que de  $G''$  pero ambos módulos fueron menores a los de la masa control, sugiriendo cambios en la estructura y en las interacciones de los polímeros de proteínas. El GMP obtenido a partir de las masas elaboradas con 0,1% de TG, presentaron un comportamiento reológico correspondiente a una dispersión macromolecular entrelazada (gel débil), donde  $G''$  fue mayor a  $G'$  a bajas frecuencias y ambos módulos se cruzaron a una frecuencia determinada (0,8 Hz). El agregado de mayor contenido de TG (0,5%) llevó a la formación incluso de un GMP más viscoso con un comportamiento reológico intermedio entre una dispersión macromolecular

entrelazada y una solución macromolecular, con valores de ambos módulos muy bajos (Tabla 3.5), con  $G''$  mayor que  $G'$  prácticamente en todo el rango de frecuencia analizado y alta histéresis entre ambos.

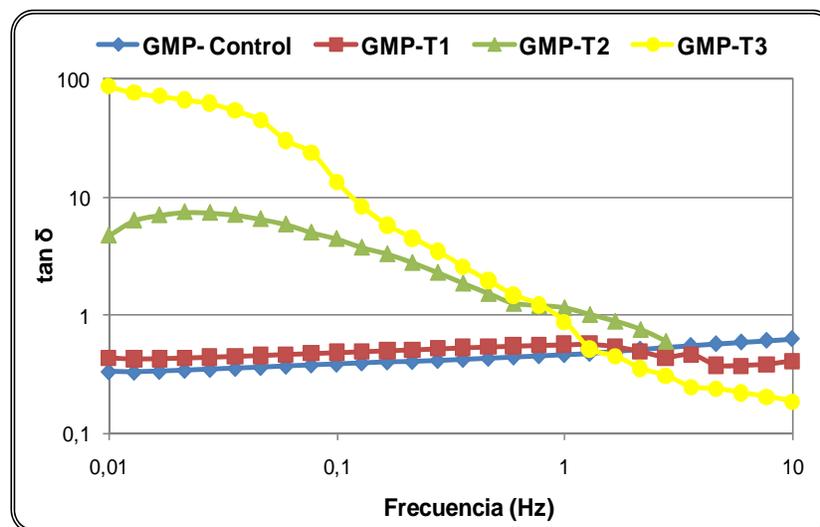


**Figura 3.10.** Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) con respecto a la frecuencia de los macropolímeros de glutenina obtenidos a partir de las masas liofilizadas. Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

En estudios previos, la disminución de  $G'$  presentó una correlación directa con la concentración de proteínas (van Vliet 1999). Sin embargo, Don *et al.* (2003b) no observó cambios en la concentración de proteínas cuando  $G'$  disminuyó. Estos resultados sugirieron que la pérdida de la estructura elástica del GMP fue debida a cambios en las propiedades de las proteínas por acción de la enzima. En el presente estudio, la disminución de  $G'$ , al igual que lo obtenido por

Don *et al.* (2003b), no fue acompañada de una disminución en la concentración de proteínas del GMP. La concentración de proteínas (mg de proteínas/g de GMP) fue la misma en las cuatro muestras: control =  $9,93 \pm 0,37$ ; T1 =  $9,81 \pm 0,16$ ; T2 =  $10,05 \pm 0,35$  y T3 =  $10,12 \pm 0,21$ . La disminución de  $G'$  en las muestras analizadas podría deberse a una disminución en la cantidad de partículas pequeñas acompañado de un incremento del tamaño de los polímeros proteicos.

El debilitamiento del gel por la enzima, hace que el GMP sea más soluble en SDS, aunque con partículas de mayor tamaño, debido a la naturaleza de los entrecruzamientos.



**Figura 3.11.** Variación de la  $\tan \delta$  con respecto a la frecuencia de los macropolímeros de glutenina obtenidos a partir de las masas liofilizadas. Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T2: masa elaborada con 0,1% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

El ángulo de desfasaje  $\delta$  es menos dependiente de la concentración de proteínas que  $G'$  y brinda información sobre la estructura de la red de gluteninas (Wang *et al.* 2003). La tangente de  $\delta$  ( $\tan \delta$ ) es igual a la relación  $G''/G'$  y es el principal indicador de la viscoelasticidad de un sistema. Valores de  $\tan \delta < 0,2$  indican un comportamiento viscoelástico correspondiente a un gel fuerte y sistemas con  $\tan \delta \cong 1$  tienden a presentar una típica estructura viscosa

correspondiente a fluidos o líquidos. En la Tabla 3.5 se muestran los valores del módulo elástico ( $G'$ ), el módulo viscoso ( $G''$ ) y la  $\tan \delta$  a 0,1 Hz de distintos GMP.

**Tabla 3.5.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre el contenido y los parámetros reológicos del macropolímero de gluteninas (GMP).

Variable	Control	T1	T2	T3
<b>GMP (%)</b>	1,43b	1,75b	0,81a	0,44a
<b>GMP-G' (Pa)</b>	4,77c	3,47b	0,62a	0,01a
<b>GMP-G'' (Pa)</b>	1,86c	1,67c	0,55b	0,10a
<b>GMP-tan <math>\delta</math></b>	0,39a	0,47a	0,88b	8,10c

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

GMP-G': Módulo de almacenamiento a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

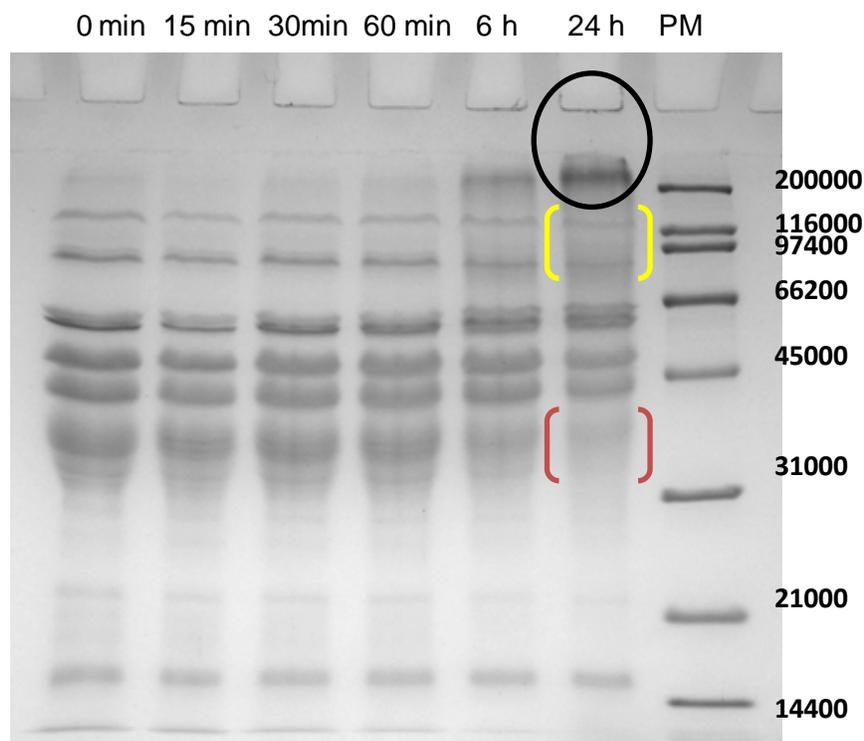
GMP-G'': Módulo de pérdida a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

GMP-tan  $\delta$ : tangente del ángulo  $\delta$  a 0,1 Hz del macropolímero de gluteninas.

El GMP de la masa control y el de la masa con la menor dosis de TG tuvieron valores de  $\tan \delta < 1$  similares, indicando un comportamiento viscoelástico del gel de proteínas. La dosis intermedia de TG causó la formación de un GMP con valores de  $\tan \delta$  más cercanos a 1, lo que indicaría un comportamiento prácticamente viscoso, mientras que el GMP de la dosis más alta de TG presentó valores de  $\tan \delta \cong 8$  indicando un comportamiento totalmente viscoso (Tabla 3.5 y Figura 3.11).

**4.2.6. Sistemas modelo glutenina-transglutaminasa.** La fracción de proteínas involucrada en las reacciones de polimerización son principalmente las gluteninas (Mujoo & Ng 2003). Larré *et al.* (2000) postularon que la TG convierte a las proteínas solubles en polímeros proteicos de alto peso molecular insolubles. Considerando estas afirmaciones y atendiendo a los resultados contradictorios observados con respecto al efecto de la TG sobre el contenido del GMP, se prosiguió a confirmar la reacción de polimerización mediante un sistema modelo.

Se extrajeron de la harina de trigo las gluteninas mediante la extracción secuencial de Osborne (1907). La fracción de gluteninas extraídas con ácido acético 0,05 M fue liofilizada y posteriormente se incubó con TG 5% p/p (g de transglutaminasa /100 g de gluteninas) en medio acuoso. La reacción enzimática fue seguida por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, para lo cual se tomaron alícuotas a 0, 15, 30 y 60 min y después de 6 y 24 h de incubación. Para detener la reacción enzimática se agregó a cada alícuota una solución de buffer (tris / HCl 0,063 M (pH: 6,8), 2% SDS, 10% de glicerol) conteniendo 3% de  $\beta$ -mercaptoetanol.



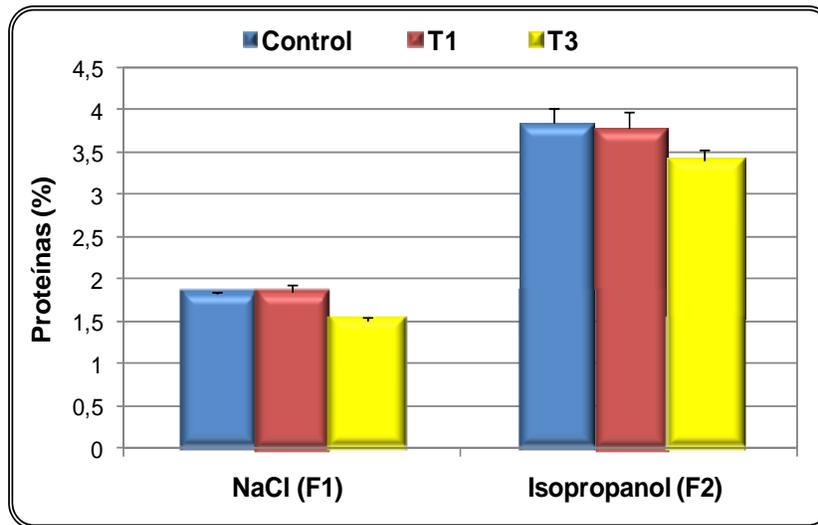
**Figura 3.12.** Incubación de gluteninas con transglutaminasa (5% p/p). PM: Marcador de peso molecular. Tiempo de incubación: 0, 15, 30, 60 minutos, 6 horas y 24 horas.

En la Figura 3.12 se presenta la electroforesis de las gluteninas incubadas con TG. Como puede observarse, a medida que transcurrió el tiempo de incubación ( $t > 1$  h) disminuyó la intensidad de las bandas proteicas de gluteninas

comprendidas entre 31000 y 45000 de masa molecular (corchete rojo), y entre 66200 y 200000 de masa molecular (corchete amarillo); e incrementó la intensidad de una banda proteica de peso molecular > 200000 retenida al comienzo del gel separador. Transcurridas 24 h de reacción, se observó que gran parte de las gluteninas intervinieron en la reacción de polimerización, siendo más marcada la participación de las gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) entre 80000 – 120000 de masa molecular (corchetes amarillos) y las gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS) principalmente las de masa molecular comprendida entre 30000 – 40000 (corchetes rojos). Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, ellos sugirieron que la enzima transglutaminasa introduce nuevos enlaces isopeptídicos entre las gluteninas de alto peso molecular produciendo grandes polímeros (Larré *et al.* 1998, Gerrard *et al.* 2001, Bauer *et al.* 2003, Autio *et al.* 2005).

**4.2.7. Estudio de las distintas fracciones proteicas modificadas por la enzima transglutaminasa.** Cómo se mostró anteriormente, altas dosis de transglutaminasa producen una disminución significativa del contenido de proteínas del GMP (Figura 3.7 y Tabla 3.5). La TG induce entrecruzamiento de las proteínas del gluten, pero estos nuevos enlaces causan cambios estructurales en las proteínas que modifican su solubilidad en SDS. La TG cataliza la formación tanto de enlaces isopeptídicos como la deaminación de residuos de glutamina donde las moléculas de agua son utilizadas como aceptores acilos (Motoki & Seguro 1998). Esta reacción ocurre principalmente cuando los residuos de glutamina son predominantes frente a los residuos de lisina, tal como es el caso de las proteínas del gluten. La glutamina es transformada en ácido glutámico incrementando la densidad de carga negativa de los agregados proteicos. Consecuentemente ocurre un aumento de la repulsión electrostática (interacciones repulsivas) entre las cadenas peptídicas que previene una agregación estable (Weegels *et al.* 1990) y promueve un incremento de la solubilidad de las proteínas en SDS.

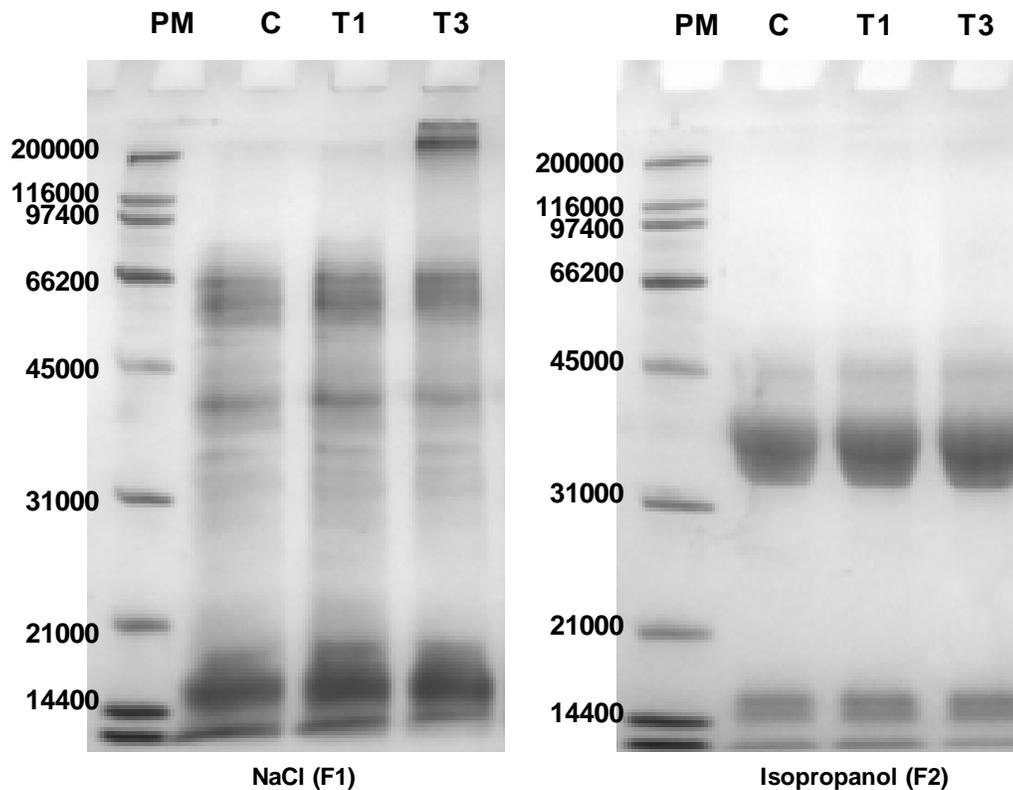
Cuando se estudió la solubilidad de las proteínas en distintos solventes, diferentes resultados a los esperados fueron observados. Las muestras con alto contenido de transglutaminasa mostraron una reducción significativa de la solubilidad de las proteínas en la solución de NaCl comparado con el control (Figura 3.13). En este primer paso de la extracción se obtuvieron principalmente albúminas y globulinas (F1). La acción de la TG sobre F1 induce la formación de entrecruzamientos entre las proteínas (albúminas y globulinas) constituyendo grandes agregados insolubles en NaCl. A su vez, las moléculas de albúminas y globulinas, podrían estar participando en entrecruzamientos con gluteninas disminuyendo la solubilidad de las mismas en NaCl.



**Figura 3.13.** Efecto de la transglutaminasa sobre la solubilidad de las proteínas en NaCl (F1) y en Isopropanol (F2). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.

El patrón electroforético de esta fracción (F1) mostró para la muestra TG 0,5% dos bandas intensas adicionales, una al comienzo del gel separador y otra apenas desplazada sobre el mismo gel, ambas bandas > 200000 de masa molecular (Figura 3.14). También se encontró una reducción significativa de la intensidad de las bandas proteicas en general y en particular una disminución de la banda de 42000 de masa molecular en la muestra tratada con alto contenido de

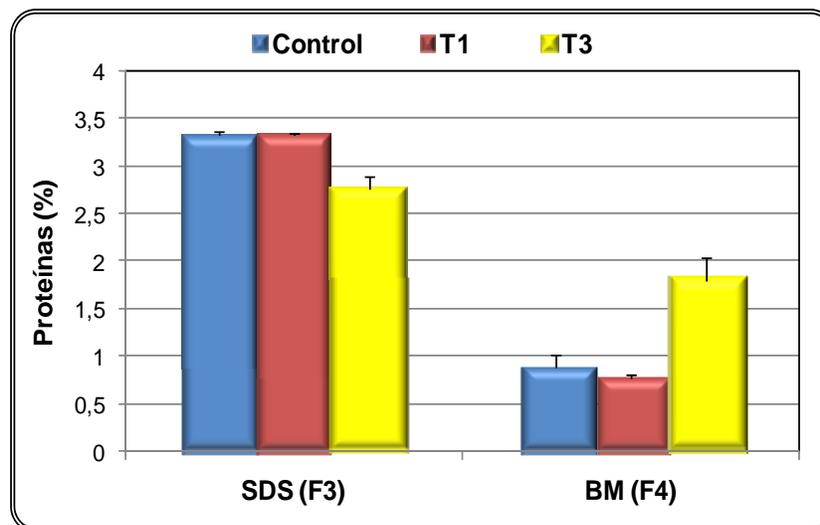
TG en concordancia con el contenido de proteínas. Gerrard *et al.* (2001) informaron efectos similares sobre albuminas y globulinas por el agregado de transglutaminasa. Sin embargo, Medina-Rodriguez *et al.* (2009) no encontraron ningún efecto significativo de la transglutaminasa sobre las albúminas y globulinas.



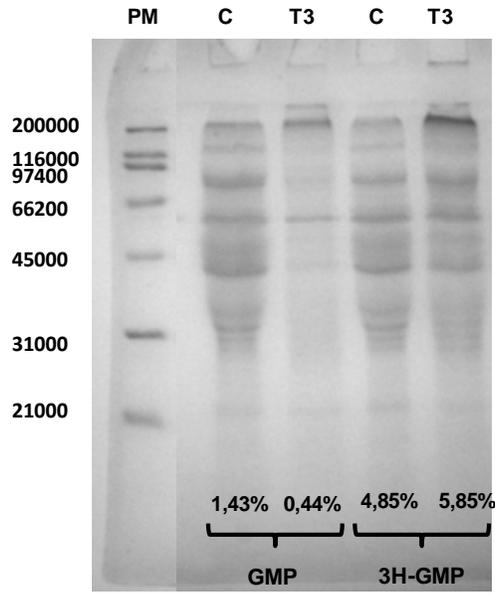
**Figura 3.14.** Patrones electroforéticos de las proteínas extraídas con NaCl (F1) y con Isopropanol (F2). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa. PM: Marcador de peso molecular.

En la segunda fracción se extrajeron con isopropanol mayormente las gliadinas (F2). En el mismo trabajo de Gerrard *et al.* (2001), los autores observaron un incremento de la extracción de las gliadinas, pero no observaron por SDS-PAGE nuevos agregados formados por la reacción de entrecruzamiento de la TG. Los resultados presentados en la Figura 3.13 muestran una disminución de la solubilidad de las gliadinas en isopropanol con respecto al control cuando la

dosis de transglutaminasa fue 0,5% (F2). Este resultado indicó que las gliadinas podrían estar participando en las reacciones de polimerización catalizadas por la enzima transglutaminasa que formarían grandes agregados insolubles en isopropanol. Larre *et al.* (2000) revelaron mediante ensayos de *immunoblotting* con anticuerpos que la enzima transglutaminasa actuó sobre las gliadinas preferencialmente sobre las  $\gamma$ -gliadinas. Sin embargo, Rosell *et al.* (2003) obtuvieron mediante electroforesis capilar una reducción del área de todos los picos correspondientes a las gliadinas debido a la acción de la transglutaminasa. En un trabajo reciente (Medina-Rodríguez *et al.* 2009) se observó mediante cromatografía de exclusión molecular una disminución del área de los picos correspondientes a las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\omega$ -gliadinas indicando la participación de la mismas en los entrecruzamientos introducidos por la TG. Por SDS-PAGE no se pudo observar el efecto de la transglutaminasa sobre las gliadinas (Figura 3.14), ya que las gliadinas se agrupan todas en una banda intensa de aproximadamente 38000 de masa molecular que no permitió distinguir entre los distintos tipos. Los perfiles electroforéticos de F2 de las distintas muestras fueron similares (Figura 3.14).



**Figura 3.15.** Efecto de la transglutaminasa sobre la solubilidad de las proteínas en SDS (F3) y en buffer de muestra (F4). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa.



**Figura 3.16.** Patrones electroforéticos del GMP y del GMP obtenido luego de tres pasos sucesivos de hidratación y centrifugación de las masas liofilizadas (3H-GMP). Porcentaje de proteínas del GMP (g de proteínas / 100 g de masa liofilizada). Control: masa elaborada sin enzima. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa. PM: Marcador de peso molecular.

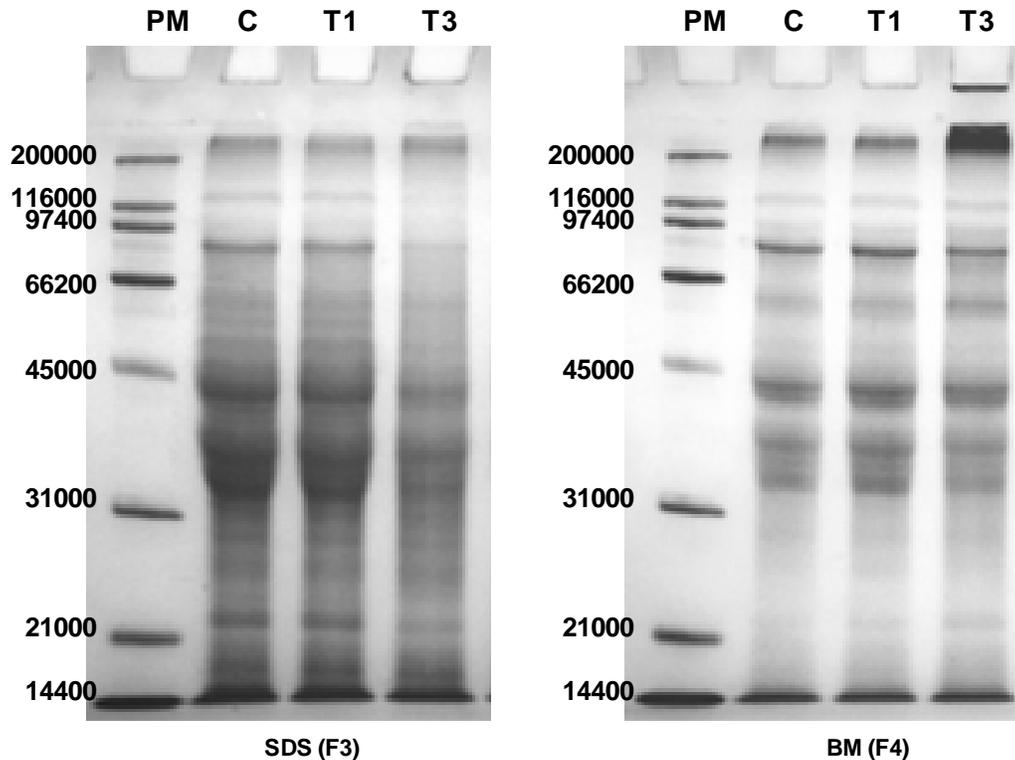
El tercer paso de la extracción secuencial (F3) fue realizada con una solución de SDS. En esta fracción se obtuvieron principalmente las gluteninas. Cómo puede observarse en la Figura 3.15, una alta concentración de transglutaminasa (0,5%) causó una disminución significativa de la solubilidad de las proteínas en SDS. Este resultado fue contradictorio con el contenido de GMP de la misma muestra (Tabla 3.5). En cada paso de la extracción secuencial, la fuerza centrífuga incrementó las interacciones entre las cadenas proteicas promoviendo la precipitación de los agregados. Este resultado fue corroborado con un experimento adicional, donde se realizaron sucesivos pasos de hidratación y centrifugación antes de la obtención del GMP (Sección 2.4.7 de Materiales y Métodos). Tanto el control como la muestra con TG 0,5% presentaron mayor contenido de GMP después de tres sucesivas hidrataciones y centrifugaciones (3H-GMP) de las respectivas masas liofilizadas, en comparación con el GMP sin

hidratación previa (GMP). Sin embargo la masa con TG hidratada (3H-GMP) presentó al final mayor contenido de GMP que el control (Figura 3.16). El contenido de proteínas del GMP luego de tres hidrataciones y centrifugaciones de las masas liofilizadas fue: T3 = 5,85% y control = 4.85% (Figura 3.16). Evidentemente la hidratación previa de las proteínas favorece la agregación del macropolímero conduciendo a la obtención de un mayor porcentaje GMP.

En la Figura 3.17 se presentan los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas con SDS (F3). Las muestras con alto contenido de TG presentaron, en general, una disminución de la intensidad de todas las bandas principalmente las correspondientes a HMW-GS. El contenido de glutamina en ambos tipos de gluteninas es comparable, pero las HMW-GS contienen de 6 - 8 moles de lisina/mol de proteínas (Thompson *et al.* 1985, Anderson *et al.* 1989) mientras que las LMW-GS tienen 1 mol de lisina /mol de proteínas (Pitts *et al.* 1988, Colot *et al.* 1989). Por lo tanto, la mayor participación de HMW-GS, en comparación con las LMW-GS, en la formación de agregados de alto peso molecular es debido principalmente a su mayor contenido de lisina (Larre *et al.* 2000, Mujoo & Ng 2003). Bauer *et al.* (2003) y Autio *et al.* (2005) observaron por SDS-PAGE que las HMW-GS desaparecen completamente debido a la acción de la transglutaminasa indicando que estas proteínas son las que mayormente participaron en las reacciones de polimerización de la enzima. Resultados similares fueron encontrados por cromatografía capilar (Rosell *et al.* 2003) donde se observó una disminución significativa del área de los picos correspondientes a las HMW-GS cuando las dosis de transglutaminasa fueron altas.

La última fracción (F4) fue completamente disuelta en buffer de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol. El contenido de proteínas de la muestra con 0,5% de TG fue significativamente mayor con respecto a la muestra control (Figura 3.16). En ésta última fracción se encuentran todas las proteínas insolubles en NaCl, Isopropanol y SDS. Bauer *et al.* (2003) fraccionaron las proteínas de la harina obtuvieron un mayor contenido de proteínas en el último residuo a medida que se incrementó la dosis de transglutaminasa utilizada. En concordancia con varios autores (Larré *et al.* 2000; Gerrard *et al.* 2001, Autio *et al.* 2005), el patrón electroforético de la

cuarta fracción (F4) de la muestra con alto contenido de TG mostró grandes agregados en el comienzo del gel concentrador y del gel separador, que corresponden a proteínas entrecruzadas por la acción de la TG que no pudieron ingresar al gel porque el tamaño de los agregados fue mayor que el tamaño de los poros (Figura 3.17).



**Figura 3.17.** Patrones electroforéticos de las proteínas extraídas con SDS (F3) y con buffer de muestra (F4). Control: masa elaborada sin enzima. T1: masa elaborada con 0,01% de transglutaminasa. T3: masa elaborada con 0,5% de transglutaminasa. PM: Marcador de peso molecular.

### 5. Análisis de correlación entre los distintos parámetros.

En la Tabla 3.6 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre los distintos parámetros. Se observaron correlaciones negativas entre el volumen específico del pan y las propiedades de la masa (resistencia máxima y módulo elástico) indicando que cuanto mayor fuerza y elasticidad tuvo la masa

menor volumen desarrollaron los panes. Una alta correlación negativa entre el  $G'$  de la masa y  $G'$  del macropolímero de gluteninas ( $r = -0,96$ ) fue obtenida, este resultado indicó que la transglutaminasa modificó fuertemente las propiedades reológicas del GMP por lo que no pueden ser utilizadas para explicar el comportamiento de la masa.

**Tabla 3.6.** Coeficientes de correlación de Pearson

	VE (cm <sup>3</sup> /g)	Rm (g)	Em (mm)	Area	G' (kPa)	G'' (kPa)	tan $\delta$	SHL ( $\mu$ mol/g)	GMP (%)	G' (GMP)	G'' (GMP)	tan $\delta$ (GMP)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	
VE (cm <sup>3</sup> /g)	1																
Rm (g)	-0,90*	1															
Em (mm)	0,92*	-0,99*	1														
Area	-0,08	-0,05	0,13	1													
G' (kPa)	-0,96*	0,94*	-0,95*	0,12	1												
G'' (kPa)	-0,40	0,13	-0,18	0,39	0,54	1											
tan $\delta$	0,85*	-0,93*	0,90*	0,07	-0,79*	0,08	1										
SHL ( $\mu$ mol/g)	0,18	-0,29	0,38	0,80*	-0,26	-0,25	0,09	1									
GMP (%)	0,94*	-0,90*	0,93*	0,05	-0,95*	-0,37	0,79*	0,29	1								
G' (GMP)	0,95*	-0,89*	0,86*	-0,28	-0,96*	-0,40	0,80*	-0,11	0,85*	1							
G'' (GMP)	0,97*	-0,93*	0,93*	-0,12	-0,99*	-0,38	0,83*	0,07	0,90*	0,98*	1						
tan $\delta$ (GMP)	-0,74*	0,90*	-0,89*	-0,29	0,77*	-0,21	-0,94*	-0,47	-0,77*	-0,69*	-0,76*	1					
F1 (%)	0,93*	-0,96*	0,97*	-0,02	-0,96*	-0,19	0,91*	0,29	0,91*	0,88*	0,93*	-0,87*	1				
F2 (%)	0,79*	-0,88*	0,85*	-0,30	-0,85*	-0,25	0,77*	0,09	0,79*	0,81*	0,80*	-0,66	0,86*	1			
F3 (%)	0,99*	-0,90*	0,93*	-0,03	-0,97*	-0,35	0,83*	0,11	0,91*	0,94*	0,97*	-0,73*	0,93*	0,77*	1		
F4 (%)	-0,93*	0,90*	-0,93*	-0,14	0,91*	0,12	-0,90*	-0,30	-0,87*	-0,85*	-0,91*	0,87*	-0,95*	-0,69	-0,95*	1	

\*Coeficientes de correlación de Pearson significativos con  $p \leq 0,05$

Se obtuvo además una alta correlación entre el porcentaje de GMP y el volumen específico del pan, mayor contenido de GMP de la masa mayor volumen

desarrollan. También fue positiva la correlación entre el porcentaje del GMP y la  $\tan \delta$  del masa, lo que indicó que la transglutaminasa a medida que causa la disminución del contenido de GMP desarrolla una masa más viscoelástica. El porcentaje de proteínas de F4 puede ser utilizado para explicar las propiedades de la masa ya que correlacionó altamente con  $R_m$  y  $G'$  de la masa indicando que el mayor contenido de grandes agregados proteicos se relacionan con alta resistencia de la masa a la extensión y con una elevada elasticidad.

**CUARTA SECCIÓN:**  
**Efecto de las enzimas sobre la  
calidad de las masas y del pan  
obtenido a partir de masas  
congeladas**

## **Efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa sobre el pan obtenido a partir de masas congeladas.**

La metodología de masas congeladas se hizo popular en la década del '70 con el objetivo de brindar al consumidor un producto constantemente fresco con todas las características de un pan recién horneado. Sin embargo, el almacenamiento prolongado de las masas de pan en estado congelado ocasiona algunos problemas que causan la pérdida de la calidad del pan. Entre los problemas más importantes se encuentra la disminución de la viabilidad de las levaduras y de la producción de gas, la disminución de la capacidad de la red de gluten de retener CO<sub>2</sub> y la progresiva pérdida de la cohesividad y estabilidad de la masa (Perron *et al.* 1999, Ribotta *et al.* 2001). Una posible solución al problema es la utilización de aditivos que mitiguen el deterioro causado por el congelamiento. Por lo tanto, se planteó como objetivo estudiar el efecto de las enzimas sobre la calidad de los panes elaborados mediante la metodología de masas congeladas.

### **1. Efecto de las enzimas como aditivos sobre la calidad del pan.**

Para la elaboración de los panes se utilizó la metodología de pan francés, ya que en Francia es uno de los países donde más se consume pan elaborado a partir de masas congeladas. Se utilizó una formulación simple: 100% harina de trigo, 3% de levadura prensada, 2,2% de NaCl, 58,5% de agua (valor óptimo). Se utilizaron similares dosis de las enzimas a las usadas para obtener pan mediante el método tradicional (primera, segunda y tercera sección):

- Pentosanasa 0,006% (P1) - 0,012% (P2) - 0,018% (P3)
- Glucosa oxidasa 0,001% (G1) - 0,005% (G2) - 0,01% (G3)
- Transglutaminasa 0,01% (T1) - 0,1% (T2) - 0,5% (T3).

Las masas elaboradas fueron congeladas y almacenadas a -18 °C durante distintos periodos de tiempo (3 y 9 semanas). Al cabo del periodo transcurrido, se procedió a descongelar, fermentar y hornear los panes para el posterior análisis de su calidad.

### 1.1. Efecto de las enzimas sobre el volumen específico del pan.

En la Tabla 4.1 se presentan los valores de volumen específico de pan obtenidos a partir de masas sin congelar, y congeladas y almacenadas durante 3 y 9 semanas.

**Tabla 4.1.** Efecto de las enzimas sobre el volumen específico del pan.

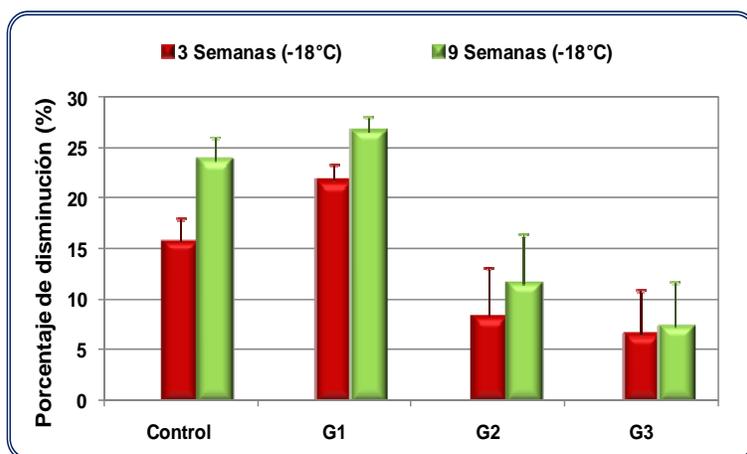
Muestra	Almacenamiento a -18 °C		
	No congelada (cm <sup>3</sup> /g)	3 Semanas (cm <sup>3</sup> /g)	9 Semanas (cm <sup>3</sup> /g)
Control	3,50cd	2,95abc	2,67b
G1	3,64d	2,85ab	2,67b
G2	3,38bcd	3,10cd	2,99de
G3	3,19b	3,01bcd	2,96d
P1	4,10e	3,57e	3,00de
P2	4,78f	3,60e	3,11e
P3	4,70f	3,68e	3,11e
T1	3,59cd	3,03bcd	2,63ab
T2	3,30bc	3,22d	2,81c
T3	2,83a	2,72a	2,50a

En una misma columna letras distintas indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

VE (cm<sup>3</sup>/g) = volumen específico del pan. No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 3 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante tres semanas, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

Coincidentemente con publicaciones previas, la congelación produjo un deterioro de la masa control (sin enzimas) produciendo panes de menor volumen específico después de 9 semanas de almacenamiento de la masa a -18 °C.

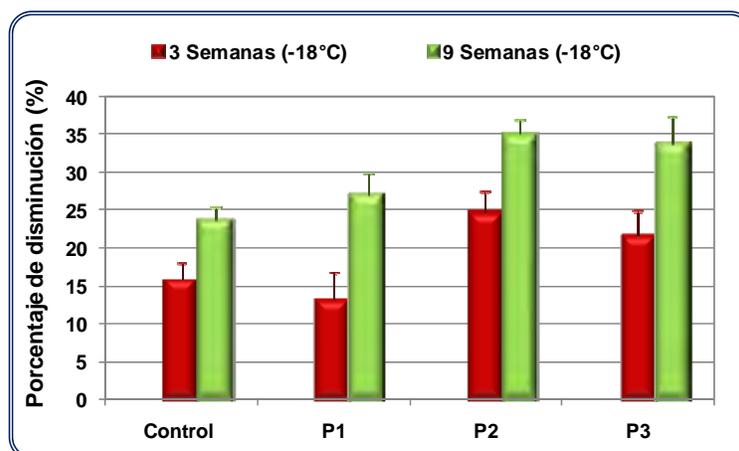
Giannou y Tzia (2007) observaron una rápida pérdida del volumen específico del pan durante los primeros meses de almacenamiento de las masas congeladas, sin embargo la apariencia de los mismos fue considerada aceptable por un panel sensorial entrenado. Otros autores también observaron un efecto negativo del congelamiento de las masas sobre la calidad de los panes (Inoue & Bushuk 1992, Le Bail *et al.* 1999, Ribotta *et al.* 2001, Sharadanant & Khan 2003, Phimolsiripol *et al.* 2008).



**Figura 4.1.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre el porcentaje de disminución del volumen de pan debido al congelamiento con respecto al pan obtenido a partir de masas no congeladas. 3 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante tres semanas, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

Cómo ya se informó anteriormente, el peróxido de hidrógeno producto de la reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa causa la oxidación de las proteínas del trigo reforzando la red de gluten. Los resultados muestran que los panes obtenidos a partir de las masas elaboradas con Gox también tuvieron menor volumen específico a causa del congelamiento de la masa con respecto a los mismos panes obtenidos a partir de masas sin congelar. Sin embargo, a niveles de Gox  $\geq 0,005\%$ , el porcentaje de deterioro de estas muestras fue mucho menor con respecto al deterioro del control (porcentaje de disminución del volumen de pan después de 9 semanas de congelamiento de las masas: 7% para

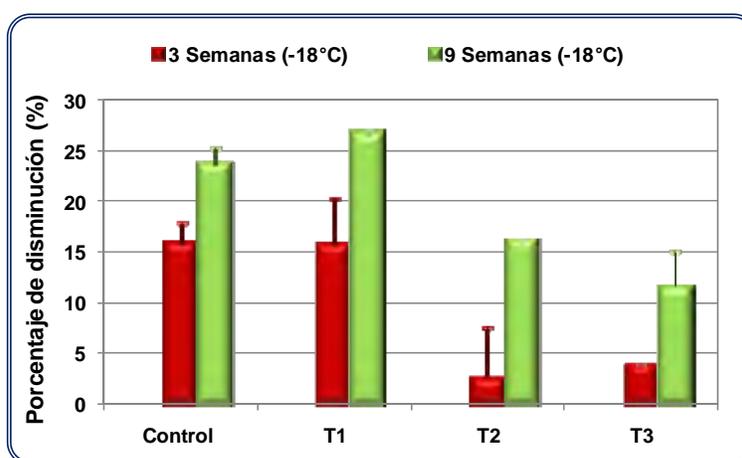
G3; 12% para G2 y 24% para el control) (Figura 4.1). El análisis de la varianza entre los volúmenes específicos de los panes obtenidos a partir de masas almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 9 semanas indicó que las muestras con alto contenido de Gox tuvieron significativamente mayor volumen específico de pan que el control (sin enzima) (Tabla 4.1). Estos resultados están indicando que el incremento de la fuerza de la masa por acción de Gox contrarresta, al menos parcialmente, el daño mecánico causado por los cristales de hielo sobre la red de gluten.



**Figura 4.2.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre el porcentaje de disminución del volumen de pan debido al congelamiento con respecto al pan obtenido a partir de masas no congeladas. 3 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante tres semanas, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

La enzima pentosanasa es una enzima que actúa hidrolizando los polisacáridos no almidonosos, específicamente los pentosanos de la harina de trigo. Las masas elaboradas con Pn sin congelar permitieron obtener panes con alto volumen específico. Cuando estas masas fueron almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 9 semanas, el volumen específico desarrollado fue también significativamente mayor al pan control (sin enzima) obtenido a partir de masa congelada almacenada durante el mismo período de tiempo (Tabla 4.1). Sin embargo, el deterioro de la calidad de los panes con Pn debido al congelamiento fue mayor a la muestra control, ya que el porcentaje de disminución del volumen

del pan (Figura 4.2) por el efecto del congelamiento durante 9 semanas (34% para P3 y 35% para P2) fue mucho mayor que el alcanzado por el control (24%). Este efecto puede deberse a que la pentosanasa al disminuir el tamaño de los pentosanos deja mayor cantidad de agua disponible para formar un mayor número de cristales de hielo y/o de mayor tamaño que dañan de forma mecánica la red de gluten. Berglund *et al.* (1991) y Ribotta *et al.* (2004) mediante microscopía electrónica de barrido confirmaron el efecto nocivo de la formación de cristales de hielo en masas no fermentadas y almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 4.3.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre el porcentaje de disminución del volumen de pan debido al congelamiento con respecto al volumen del pan obtenido a partir de masas no congeladas. 3 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante tres semanas, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

La enzima transglutaminasa cataliza entrecruzamientos intra e intermoleculares entre las proteínas a través de la formación de una unión peptídica. En el gluten esta enzima promueve la formación de polímeros de alto peso molecular modificando la elasticidad y la fuerza de la masa. El efecto de la TG en masas congeladas fue dependiente de la dosis de enzima utilizada para la elaboración de las masas de pan. El volumen de pan de las muestras con TG disminuyó debido al congelamiento y almacenamiento en estado congelado, el

efecto más marcado se observó especialmente en la menor dosis (0,01%) (Tabla 4.1). Al igual que con la enzima glucosa oxidasa, altas dosis de TG contrarrestaron el deterioro ya que el porcentaje de disminución del volumen de pan fue menor (16% para T2 y 12% para T3) que para la muestra control (24%) (Figura 4.3). Sin embargo, sólo la dosis intermedia de TG (0,1%) tuvo mayor volumen específico de pan que el control (sin enzima) al cabo de las 9 semanas de almacenamiento a -18 °C mitigando el deterioro. La presencia de TG podría contrarrestar el daño mecánico de los cristales de hielo sobre la red de gluten mejorando la capacidad de retener CO<sub>2</sub> durante la fermentación y permitiendo el desarrollo de una buena calidad de pan.

Huang *et al.* (2008) observaron que altas dosis de transglutaminasa aumentaron el volumen específico de los panes obtenidos a partir de masas congeladas y no congeladas. Incluso después de 5 semanas de almacenamiento en estado congelado, el pan con TG presentó similar volumen específico que el pan control no congelado. Las diferencias observadas en los resultados con estos autores podrían deberse principalmente al origen y pureza de la enzima transglutaminasa (Yiming Fine Chemicals, Taixing, China) que difiere de la utilizada en el presente trabajo (Apliena Ajinomoto, Japón) y a la temperatura de congelación (-30 °C) que utilizaron donde la movilidad del agua es mucho más baja por lo que el deterioro por los cristales de hielo es menor.

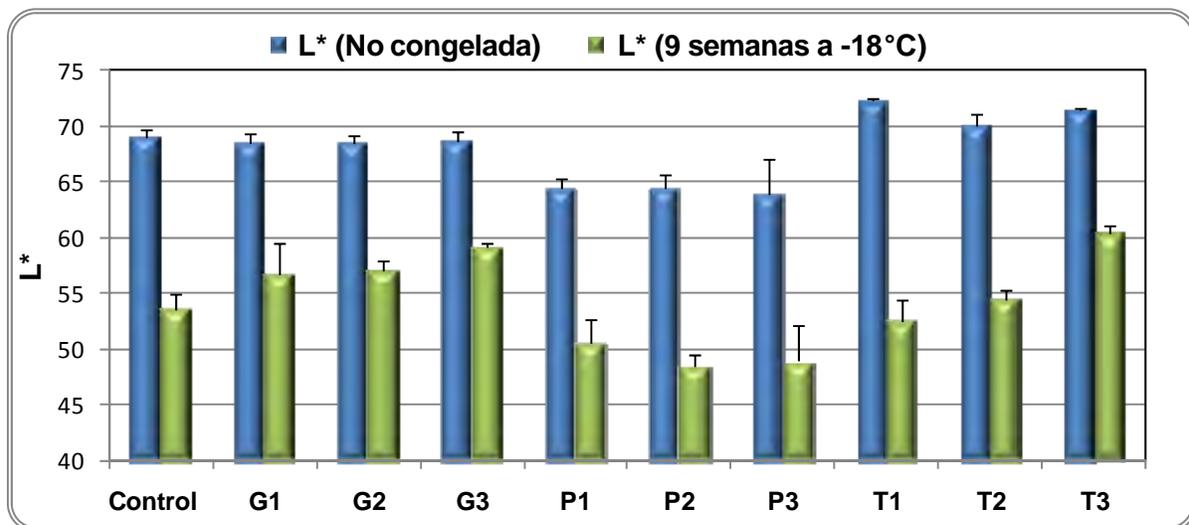
Las tres enzimas, en cualquiera de sus dosis, no impidió la disminución del volumen específico del pan, indicando que no pueden detener el efecto de la congelación, solo pueden mitigarlo.

### **1.2. Efecto de las enzimas sobre el color de la corteza de los panes.**

El valor L\* del color es una medida de la luminosidad de las muestras analizadas; este parámetro puede alcanzar valores de 0 a 100, donde 0 es el negro y 100 es el blanco. En general, los panes obtenidos a partir de masas congeladas durante 9 semanas presentaron menor valor L\* que los panes obtenidos a partir de masas no congeladas, indicando una disminución de la

luminosidad de la corteza (cortezas de pan más oscuras) con el tiempo de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Similares resultados fueron obtenidos por Sharadanant y Khan (2003).

Tanto en los panes obtenidos a partir de masas sin congelar como en los obtenidos a partir de masas congeladas, la enzima pentosanasa disminuyó significativamente el valor  $L^*$  de la corteza del pan con respecto al control (sin enzima) (Figura 4.4). En todos los casos la corteza se vuelve menos luminosa y más opaca. Esto podría deberse a que la enzima produce azúcares reductores que son sustratos de las reacciones de Maillard. Además el menor tamaño de los pentosanos dejó mayor porcentaje de agua libre la cual migra a la superficie y es más fácilmente evaporable, durante el horneado y así favoreciendo las reacciones de Maillard.

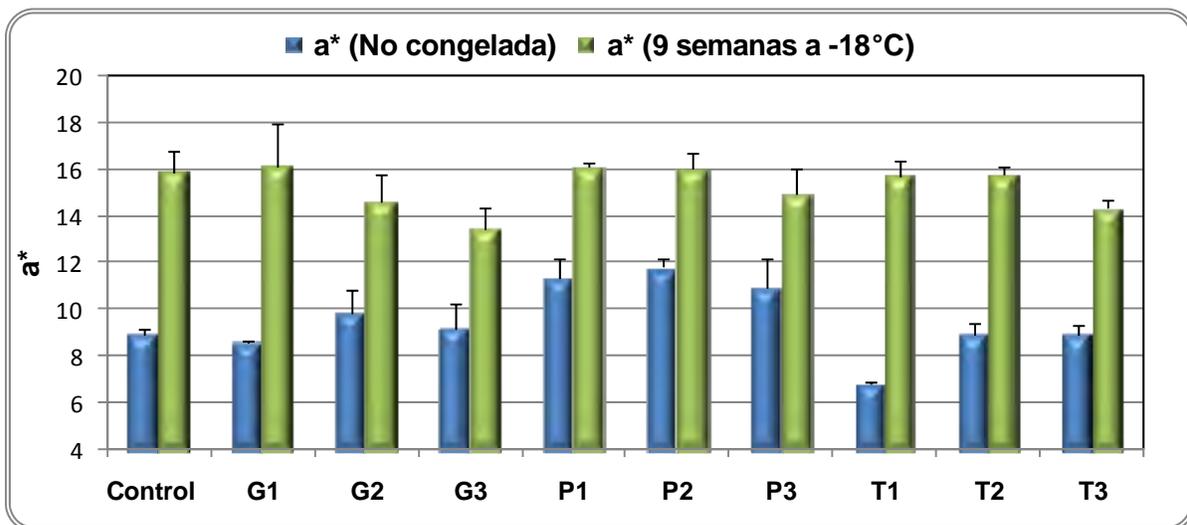


**Figura 4.4.** Efecto de las enzimas sobre la variación de la luminosidad ( $L^*$ ) de la corteza del pan con el tiempo de almacenamiento de las masas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

Sólo las muestras con el mayor contenido de Gox y TG (G3 y T3) pudieron contrarrestar este efecto causado por el almacenamiento en estado congelado de las masas, ya que los panes de G3 y T3 obtenidos a partir de masas congeladas

presentaron un valor de  $L^*$  significativamente mayor que el del control (sin enzima), lo cual es considerado como más deseable por los consumidores (Sharadanant & Khan 2003).

El parámetro  $a^*$  del color puede alcanzar valores negativos correspondientes al color verde y valores positivos correspondiente al color rojo. En la Figura 4.5 se muestran los valores de  $a^*$  de la corteza de los panes obtenidos a partir de masas congeladas y no congeladas. Como puede observarse en la figura todos los valores de  $a^*$  fueron positivos, lo que indicó que la coloración de la corteza de los panes fue principalmente rojiza. Todos los panes obtenidos a partir de masas congeladas presentaron mayores valores de  $a^*$  que las mismas muestras obtenidas a partir de masas no congeladas. Estos resultados indican que la corteza de los panes se vuelve más rojiza con el congelamiento y el almacenamiento de las masas en estado congelado.



**Figura 4.5.** Efecto de las enzimas sobre la variación del valor  $a^*$  del color de la corteza del pan con el tiempo de almacenamiento de las masas a -18 °C. No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

Cómo ya se mencionó anteriormente en la luminosidad de los panes, la enzima Pn favoreció las reacciones de Maillard, por lo que el valor de  $a^*$  de la

corteza de los panes obtenidos a partir de masas no congelados fue mayor que el control (sin enzima). Sin embargo, los valores de  $a^*$  de los panes con Pn y del control obtenidos a partir de masas congeladas fueron similares. Con el valor de  $a^*$  ocurrió lo mismo que con el valor de  $L^*$ , las dosis altas de Gox y de TG disminuyeron el color rojizo de la corteza, mitigando el efecto del congelamiento y almacenamiento de las masas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **1.3. Efecto de las enzimas sobre la textura de la miga de pan.**

De todos los parámetros obtenidos a partir del análisis de perfil de textura de la miga de pan, se analizaron principalmente la firmeza y masticabilidad de la miga de pan. Ambas características cualitativas de los productos panificados son las más comúnmente analizadas, ya que correlacionan fuertemente con la percepción de la frescura del pan por los consumidores (Faridi & Faubion 1990).

La firmeza de la miga de pan de la muestra control aumentó con el tiempo de almacenamiento de la masa en estado congelado (Tabla 4.2). Estos resultados fueron coincidentes con los publicados por otros autores (Giannou & Tzia 2005, Wang *et al.* 2006, Phimolsiripol *et al.* 2008, Yi & Kerr 2009), quienes postulan que el aumento de la dureza puede ser debido a la pérdida del contenido de humedad durante el almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ya que He y Hosney (1990) encontraron que el contenido de humedad afecta significativamente la firmeza de la miga de pan. En general, los panes elaborados con enzima aumentaron también la firmeza de la miga de pan con el tiempo de almacenamiento de las masas en estado congelado (Tabla 4.2), presentando una relación inversa con el volumen específico del pan. Por lo tanto el incremento en la firmeza de la miga de pan está probablemente relacionado con la disminución del volumen (Inoue & Bushuk 1992, Berglund *et al.* 1993).

Kenny *et al.* (1999) y El-Hady *et al.* (1999) estudiaron el efecto de oxidantes químicos sobre la calidad de los panes obtenidos a partir de masas congeladas y observaron que el ácido ascórbico permitió mitigar el efecto del almacenamiento en estado congelado de la masa sobre la calidad del pan. En el presente trabajo

se utilizó la glucosa oxidasa como oxidante porque las enzimas como aditivos son consideradas naturales. Comparando todos los panes obtenidos a partir de masas congeladas, los panes elaborados con glucosa oxidasa (G2 y G3) presentaron menor firmeza de la miga de pan que el control (sin enzima). Este efecto puede deberse a una mayor retención de la humedad debido a la presencia de una red de gluten menos dañada que la de los panes control.

**Tabla 4.2.** Efecto de las enzimas sobre la firmeza de la miga de pan.

Muestra	Firmeza (g) No congelada	Firmeza (g) 9 semanas a -18 °C
Control	652e	794de
G1	518c	744bcd
G2	631de	706abc
G3	648e	634a
P1	405b	766cd
P2	289a	650ab
P3	321ab	694abc
T1	522cd	862e
T2	611cde	618a
T3	941f	879e

En una misma columna letras distintas indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

También se observó un efecto similar de la enzima Pn sobre la firmeza de los panes, sin embargo en este caso se debería principalmente al mayor volumen específico desarrollado. Jiang *et al.* (2008) estudiaron el efecto de una xilanaso termoestable sobre panes pre-cocidos y congelados y observaron que esta enzima causaba un incremento del volumen específico y una disminución de la

firmeza de la miga de pan, pero sugirieron que el mecanismo por el cual se mitigaba el efecto no estaba claro.

La dosis intermedia de transglutaminasa (0,1%) permitió obtener un pan después de 9 semanas de almacenamiento de la masa a -18 °C con una miga más tierna que el control (sin enzima), quizás se deba a que los panes con esta dosis desarrollaron un mayor volumen específico. Kim *et al.* (2008) estudiaron el agregado de TG en masas congeladas y observaron que la enzima produce una disminución de la calidad del pan fresco pero mejora la calidad del pan obtenido a partir de masas congeladas.

**Tabla 4.3.** Efecto de las enzimas sobre la masticabilidad de la miga de pan (g).

Muestra	Masticabilidad (g)	
	No congelada	9 semanas a -18 °C
<b>Control</b>	410cd	463cd
<b>G1</b>	335a	435bc
<b>G2</b>	406cd	459cd
<b>G3</b>	427d	387ab
<b>P1</b>	265a	441c
<b>P2</b>	230a	379a
<b>P3</b>	235a	391ab
<b>T1</b>	344ab	505d
<b>T2</b>	402bc	393ab
<b>T3</b>	604e	552e

En una misma columna letras distintas indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

El efecto del almacenamiento en estado congelado sobre la masticabilidad de la miga de pan fue similar al observado en la firmeza de la miga (Tabla 4.3). En general, la masticabilidad de la miga de pan aumentó con el tiempo de

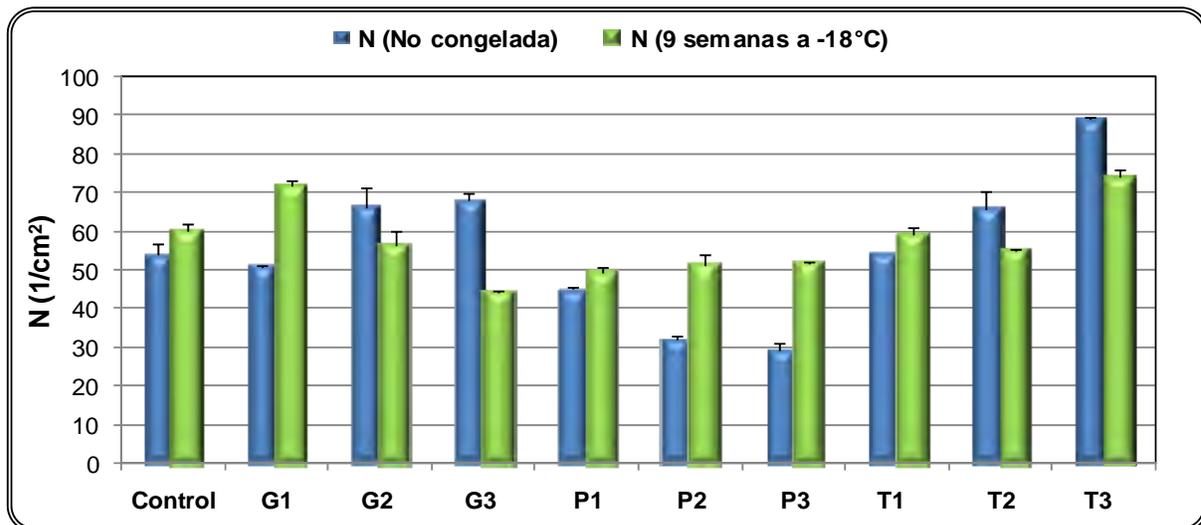
almacenamiento a -18 °C de las masas de pan de cada muestra. El mayor porcentaje de aumento de la masticabilidad por efecto del congelamiento se observó en las muestras con Pn (~ 60%), sin embargo, los panes obtenidos a partir de masas congeladas y elaborados con las dosis más elevadas (P2 y P3) continuaron presentando significativamente menor masticabilidad que el pan control (sin enzima). Por otro lado, los panes con Gox 0,01% y TG 0,1% fueron los que menor masticabilidad de la miga de pan presentaron después de 9 semanas de almacenamiento de las masas a -18 °C.

#### **1.4 Efecto de las enzimas sobre la estructura de la miga de pan.**

Algunos conocimientos sobre la estructura que define la apariencia de la miga de pan nos permiten predecir mucho de los atributos de calidad del pan. A nivel macroscópico en la miga de pan se pueden distinguir dos fases, una gaseosa que es el aire, y una sólida que son las paredes de las celdas de aire. Al ver una muestra representativa de la miga de pan, se observa claramente que la fase sólida está totalmente conectada (Torcuato 2000); y a simple vista las celdas de aire parecen aisladas, sin embargo en tres dimensiones una parte de las celdas de aire (y quizás más) están también conectadas. La fracción del volumen de las fases (sólida y gaseosa) (Mackenzie 1950, Ahmed & Jones 1990) y la naturaleza de su conectividad (Warren & Kraynik 1997, Torquato 1998,) determinan la estructura y, por consiguiente, las propiedades mecánicas del pan. El desarrollo del gluten por el proceso de mezclado es vital para la conformación de la estructura de la miga. La densidad de la estructura de la miga resultante se ve notablemente afectada por la insuficiencia de la agregación de los polímeros de gluten nativo (Zghal *et al.* 1999). Por lo que el efecto del congelamiento y de las enzimas sobre la estructura de la masa afecta directamente en la estructura de la miga de pan resultante.

Comparando todas las estructuras de las migas de los panes obtenidos a partir de las masas sin congelar, se observó que altas dosis de transglutaminasa (T2 y T3) y de glucosa oxidasa (G2 y G3) causaron un aumento significativo de la

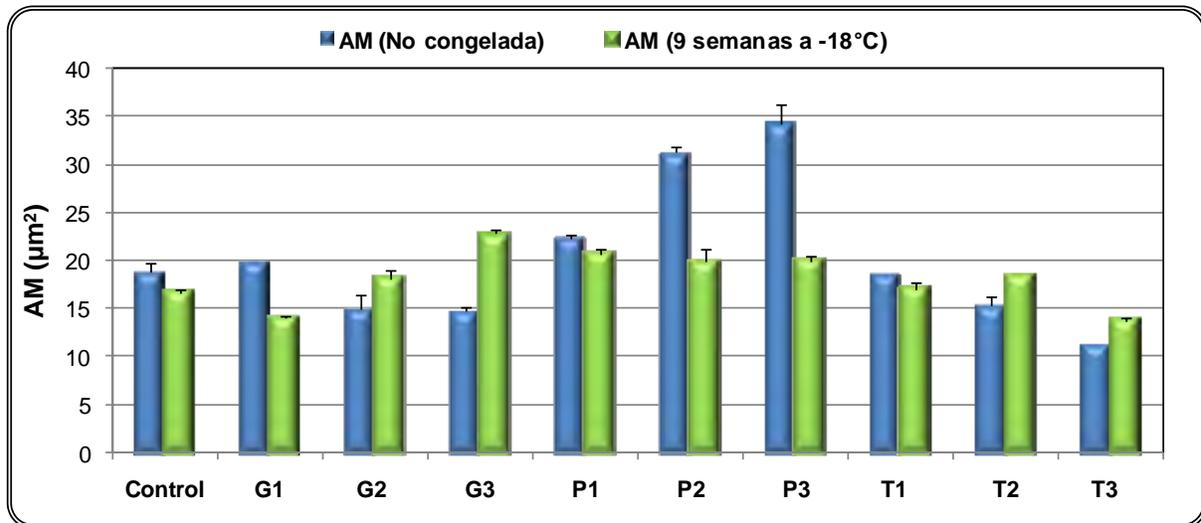
cantidad de alveolos por unidad de área (N) y una disminución del área media (AM) de los mismos (Figura 4.6 y 4.7). Por lo que la miga resultante fue más homogénea con muchos alveolos pequeños rodeados de una matriz de proteína-almidón gruesa. La enzima pentosanasa causó el efecto contrario, la miga de los panes P1, P2 y P3 obtenidos a partir de masas no congeladas presentaron un menor número de alveolos (N) de mayor tamaño (AM) y menos uniformes (Figura 4.6 y 4.7).



**Figura 4.6.** Efecto de las enzimas sobre la variación del número total de alveolos por unidad de area (N) de la miga de pan con el tiempo de almacenamiento de las masas a -18 °C. No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

El efecto del congelamiento sobre la estructura de la miga fue distinto para las diferentes muestras. No se observaron grandes diferencias en la estructura de la miga (N y Am) del pan control a partir de masa no congelada y el obtenido a partir de masa congelada y almacenada durante 9 semanas a -18 °C. Ribotta *et al.* (2001) observaron un aumento de la fracción de aire (FA) de la miga del pan con el tiempo de almacenamiento de la masa en estado congelado. Sin embargo en el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en FA de los panes antes y después de congeladas las masas (Figura 4.8). Estas diferencias podrían

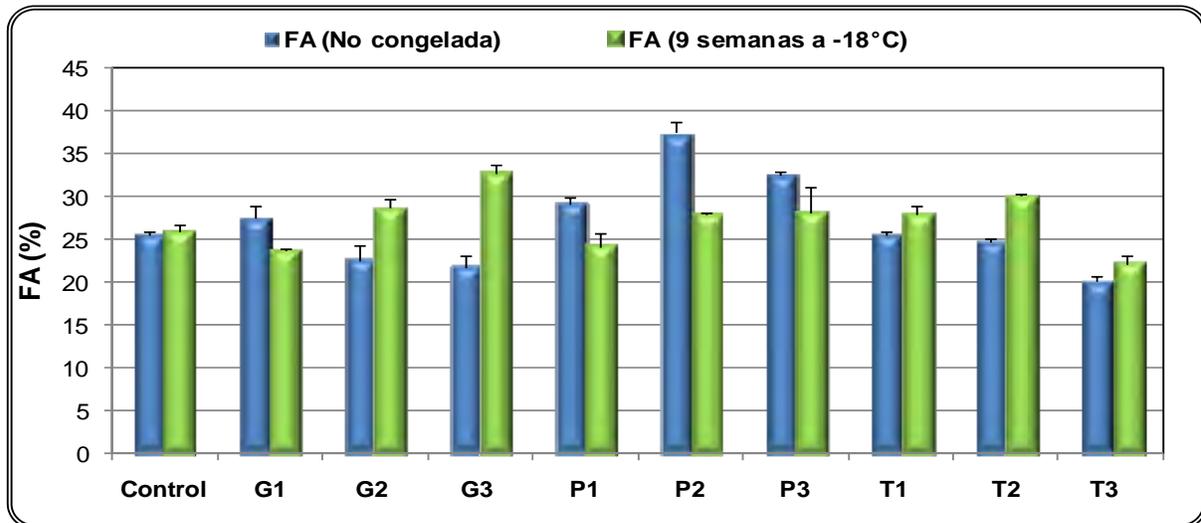
deberse principalmente a la calidad de la harina utilizada y al diferente método de panificación empleado.



**Figura 4.7.** Efecto de las enzimas sobre la variación del área media de los alveolos (AM) de la miga de pan con el tiempo de almacenamiento de las masas a -18 °C. No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

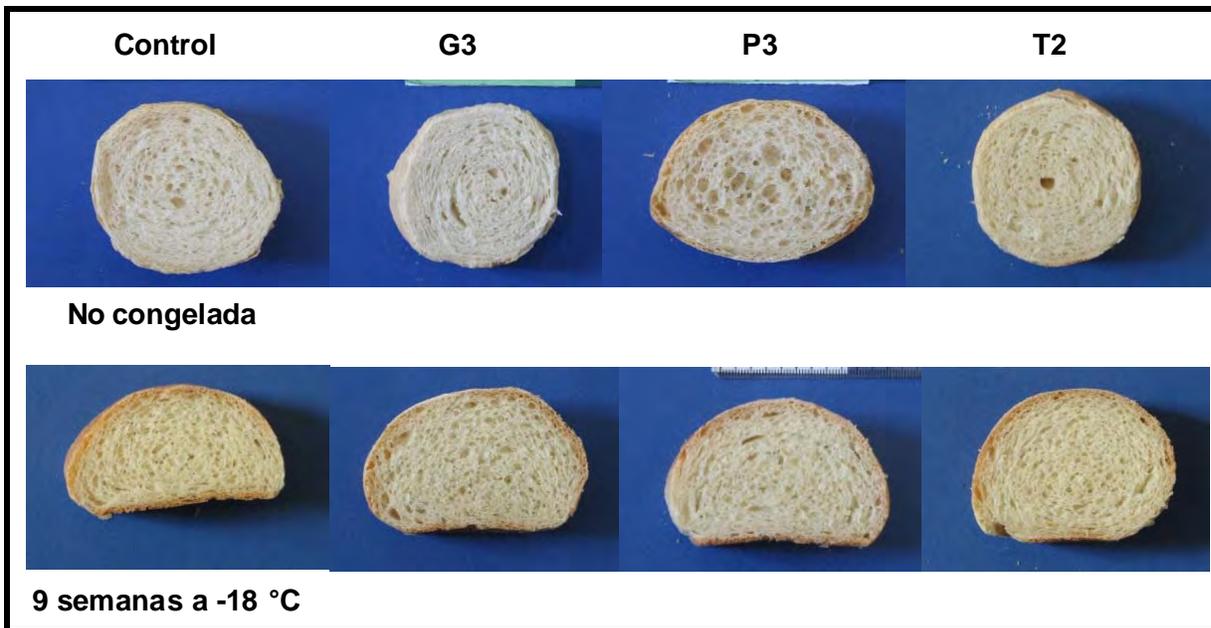
El efecto de las enzimas en la estructura de la miga de los panes obtenidos a partir de masas congeladas dependió mucho de la dosis utilizada. Altos niveles de glucosa oxidasa (G2 y G3) y de transglutaminasa (T2 y T3) disminuyeron el número de alveolos por unidad de área y aumentaron el tamaño medio de los alveolos con respecto a los panes con las mismas dosis sin congelar. Por el contrario, los panes obtenidos a partir de masas congeladas elaboradas con Pn presentaron un mayor número de alveolos de menor tamaño con respecto a los mismos panes obtenidos a partir de masas no congeladas. Comparando la estructura de la miga de todos los panes obtenidos a partir de masas congeladas, se puede observar que altas dosis de Gox causaron un aumento significativo de la fracción de área (FA) ocupada por alveolos (Figura 4.8) y del tamaño de los alveolos (Figura 4.7) y una disminución del número de alveolos por unidad de área (Figura 4.6) con respecto al control obtenido a partir de la masa congelada. Estos

resultados se correlacionan con el mayor volumen específico del pan y la menor firmeza de la miga que presentaron estas muestras con respecto al control (sin enzima).



**Figura 4.8.** Efecto de las enzimas sobre la variación de la fracción del área (FA) total ocupada por alveolos de la miga de pan con el tiempo de almacenamiento de las masas a -18 °C. No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

En la Figura 4.9 se presentan fotos de panes obtenidos a partir de masas no congeladas y congeladas. En los panes sin congelar, se observa claramente como la enzima Pn produce una miga de pan con grandes alveolos y poco uniformes, mientras que las enzimas Gox y TG producen una miga más cerrada con alveolos pequeños y uniformes. El congelamiento causa modificaciones en la forma de las rodajas de pan, ya que los panes se vuelven más anchos y con menor altura, lo que se debería principalmente a que la masa se vuelve más blanda y con menos fuerza.



**Figura 4.9.** Fotos de panes obtenidos a partir de masas no congeladas y a partir de masas congeladas y almacenadas 9 semanas a 18 °C. G3: panes elaborados con 0,01% de glucosa oxidasa. P3: panes elaborados con 0,018% de pentosanasa. T2: panes elaborados con 0,1% de transglutaminasa.

## 2. Efecto de las enzimas sobre la calidad de masas congeladas.

### 2.1. Efecto de las enzimas sobre la fermentación de las masas congeladas.

En todas las muestras, inclusive el control, se observó un incremento en el tiempo de fermentación cuando las masas de pan fueron congeladas y almacenadas a -18 °C durante 9 semanas (Tabla 4.4). En publicaciones previas (Perron 1999, Ribotta *et al.* 2001), se atribuyó este efecto a la menor producción de CO<sub>2</sub> debido a la disminución del número de levaduras vivas y a la disminución de la habilidad del gluten para retener CO<sub>2</sub>. Las enzimas utilizadas como aditivos, no lograron mitigar el 100% de este problema, pero el porcentaje de aumento del tiempo de fermentación en las muestras con glucosa oxidasa fue menor (21%) que en la masa control (36%) indicando que la enzima actúa sobre la red de gluten

contrarrestando el daño ocasionado por el congelamiento sobre las fibras proteicas.

**Tabla 4.4.** Tiempo de fermentación y volumen final de las masas desarrollado durante la fermentación (mL).

Muestra	Tiempo de fermentación (min)		Volumen Final (mL)	
	No congelada	9 semanas a -18 °C	No congelada	9 semanas a -18 °C
<b>Control</b>	105 →	143	169bc	136ab
<b>G1</b>	105 →	128	175bc	144abc
<b>G2</b>	105 →	128	167bc	151c
<b>G3</b>	98 →	128	144a	156c
<b>P1</b>	105 →	128	195de	145abc
<b>P2</b>	98 →	158	205e	152c
<b>P3</b>	113 →	158	200e	146abc
<b>T1</b>	110 →	143	182cd	135ab
<b>T2</b>	98 →	120	166b	147bc
<b>T3</b>	75 →	120	137a	132a

En una misma columna letras distintas indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

No congelada: panes obtenidos a partir de masas sin congelar, 9 semanas: panes obtenidos a partir de masas congeladas durante nueve semanas.

El volumen final desarrollado por las masas luego de la fermentación es una medida de la capacidad de expansión que poseen las masas. El efecto del congelamiento de las masas sobre la capacidad de expansión es presentado en la Tabla 4.4. La capacidad de expansión de las masas durante la fermentación disminuyó con el tiempo de almacenamiento en frío. Estos resultados muestran la misma tendencia que el volumen específico del pan desarrollado por cada muestra, los valores de los coeficientes de correlación de Pearson ( $p \leq 0,05$ ) entre el volumen específico del pan y la capacidad de expansión de las masas no

congeladas durante la fermentación fue  $r = 0,92$  y el de las que fueron congeladas durante 9 semanas fue  $r = 0,67$ .

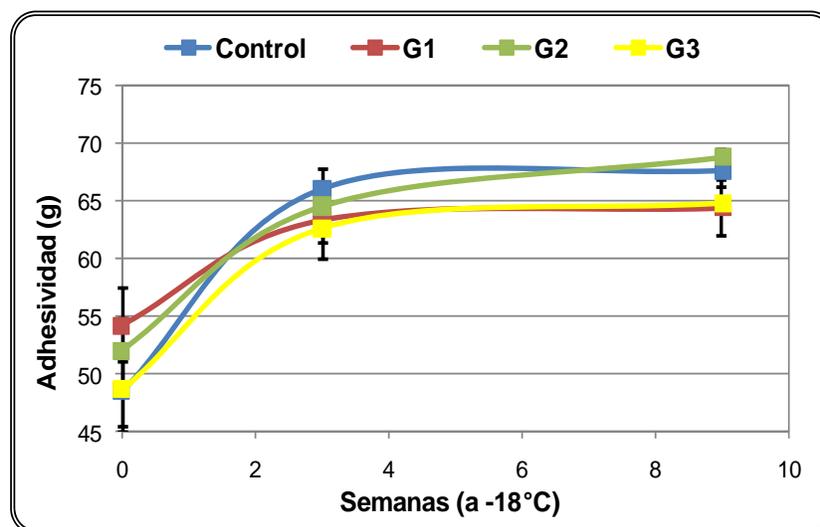
## **2.2. Comportamiento reológico de las masas congeladas aplicando grandes deformaciones.**

En esta etapa se realizaron ensayos de adhesividad y de extensión uniaxial de las masas mediante un TA: XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Se prepararon masas con 58,5% de agua, 2,2% de sal y las mismas dosis de enzimas utilizadas en el ensayo de panificación, no se utilizó levadura para este ensayo. Las masas fueron congeladas y almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 y 9 semanas. Mediante estos ensayos se pretendió evaluar si las enzimas tienen la capacidad de reparar o atenuar el daño mecánico que provocan los cristales de hielo sobre la estructura del gluten que forma la masa, por esta razón no se utilizó levadura en la preparación de las masas.

**2.2.1. Adhesividad de la masa.** La adhesividad fue determinada como la fuerza requerida para despegar la sonda de la superficie de la masa. En todas las muestras, incluido el control, se observó un incremento proporcional de la fuerza adhesiva a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento en estado congelado (Figuras 4.10, 4.11 y 4.12), pero los comportamientos fueron diferentes según la enzima utilizada. Este incremento de la adhesividad puede ser debido a que durante el congelamiento hay una redistribución de las moléculas de agua, que luego del descongelamiento quedan mayormente libres causando un aumento de la pegajosidad de la masa. Estos resultados fueron coincidentes con los presentados por otros autores (Angioloni *et al.* 2008), quienes determinaron la adhesividad mediante un análisis de perfil de textura de la masa y obtuvieron un incremento a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento de las masas en estado congelado. Yi y Kerr (2009) postularon que el congelamiento y almacenamiento en estado congelado en la masa puede causar una separación del agua de la red de gluten durante la formación de los cristales de hielo y ésta

agua queda más accesible en la superficie lo que lleva a un incremento de la adhesividad.

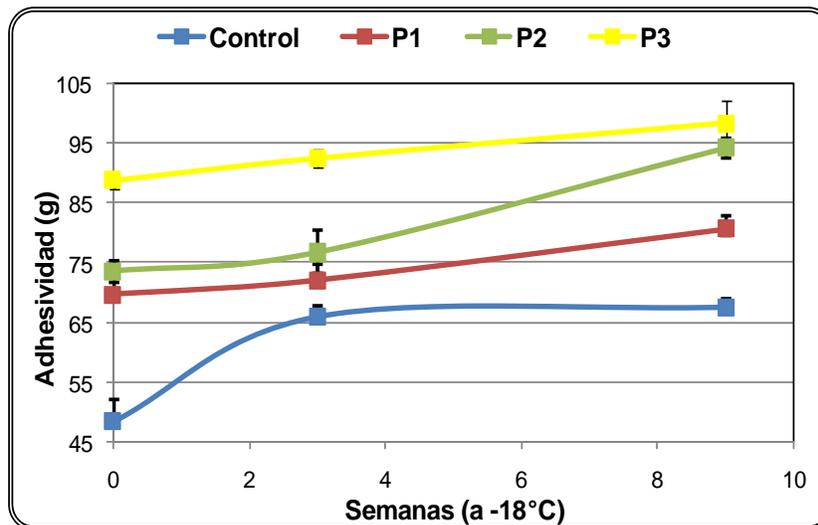
Las masas elaboradas con glucosa oxidasa tuvieron una fuerza adhesiva similar a la de la muestra control, tanto en las masas sin congelar como en las masas congeladas durante 3 y 9 semanas (Figura 4.10). También se observó que en todas las muestras (control y con Gox) el aumento de la adhesividad de la masa fue principalmente durante las 3 primeras semanas de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente el incremento no fue significativo.



**Figura 4.10.** Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre la variación de la adhesividad de las masas durante el tiempo de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Masas sin congelar (0 semanas), masas congeladas durante 3 y 9 semanas.

Comparando las masas que no fueron congeladas, la enzima pentosanasa aumentó la adhesividad a medida que se incrementó la dosis agregada con respecto a la masa control (sin enzima). Esta enzima disminuyó el tamaño de los pentosanos de la masa lo que condujo a una redistribución del agua haciendo que la superficie de la masa sea más pegajosa al tacto. Comparando las muestras que fueron almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 9 semanas, las masas elaboradas con Pn presentaron también mayor adhesividad respecto al control (Figura 4.11). El incremento de la adhesividad de la masa control con respecto al tiempo de

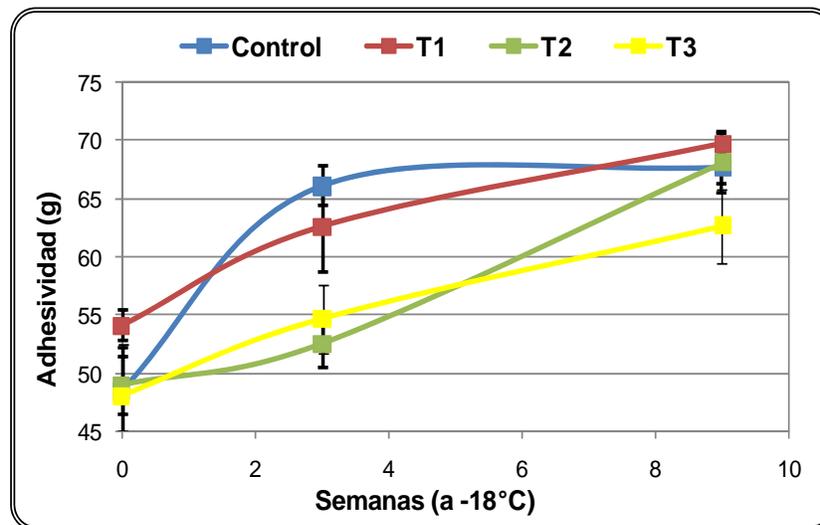
almacenamiento en estado congelado fue principalmente durante las primeras tres semanas, sin embargo en las masas elaboradas con Pn el incremento de la adhesividad fue prácticamente lineal con el tiempo de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El menor tamaño de los pentosanos en las muestras con Pn llevó a un mayor contenido de agua libre para formar cristales de hielo, que luego durante el descongelamiento migró hacia la superficie incrementando fuertemente la adhesividad de la masa.



**Figura 4.11.** Efecto de la enzima pentosanasa sobre la variación de la adhesividad de las masas durante el tiempo de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Masas sin congelar (0 semanas), masas congeladas durante 3 y 9 semanas.

No se observaron diferencias significativas entre la adhesividad de las masas con transglutaminasa y la masa control, tanto en masas sin congelar como en masas congeladas y almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 9 semanas. Si se observó que a diferencia de la masa control, en las muestras con TG el incremento de la adhesividad con respecto al tiempo de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue prácticamente lineal. Cauvain (2007) observó que a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  las masas están por debajo de la temperatura de transición vítrea por lo que la masa congelada necesita algún tipo de almacenamiento especial para evitar su deshidratación. La nueva estructura de la red de gluten formada por la enzima transglutaminasa

modificó la movilidad de las moléculas de agua a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  lo que llevó a un incremento de la adhesividad en el tiempo diferente al observado en la masa control.



**Figura 4.12.** Efecto de la enzima transglutaminasa sobre la variación de la adhesividad de las masas durante el tiempo de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Masas sin congelar (0 semanas), masas congeladas durante 3 y 9 semanas.

**2.2.2. Extensibilidad de la masa.** La extensibilidad determina la habilidad de la masa a expandirse por el  $\text{CO}_2$  producido por las levaduras durante la fermentación. Una extensibilidad excesivamente alta resulta en una masa débil y floja la cual colapsa durante la fermentación o mientras la cocción en el horno (Sharadanant & Khan 2003). La resistencia a la extensión es una medida de la habilidad de la masa para retener el  $\text{CO}_2$ , y consecuentemente una medida de la capacidad de la masa de formar un pan esponjoso. Una muy baja resistencia a la extensión resulta en una baja retención del  $\text{CO}_2$  y un bajo volumen de pan, mientras que una muy alta resistencia a la extensión también resulta en un bajo volumen de pan porque la masa dura no es capaz de alcanzar una óptima altura durante la fermentación (Yi & Kerr 2009). En la tabla 4.6 se presenta la máxima resistencia a la extensión ( $R_m$ ) y la distancia de extensión hasta ruptura ( $E_m$ ) de las masas con y sin enzima, no congeladas y congeladas y almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 9 semanas. Los resultados del test de extensión uniaxial de las muestras

sin congelar indicaron que las dosis elevadas de Gox y de TG aumentaron Rm y disminuyeron significativamente Em con respecto a la masa control (sin enzima). Por el contrario, la enzima Pn causó el efecto inverso, una disminución significativa de Rm y un incremento de la extensibilidad de la masa comparado al control.

**Tabla 4.6.** Efecto de las enzimas sobre los parámetros de extensión uniaxial de las masas no congeladas y congeladas durante 9 semanas a -18 °C.

Muestra	Rm (g)		Em (mm)	
	No congelada	9 semanas a -18 °C	No congelada	9 semanas a -18 °C
Control	50,04cd	43,56c	48,48c	48,12c
G1	43,74bc	48,03d	47,70c	48,05c
G2	57,80d	47,20cd	36,63b	48,44c
G3	69,88e	54,85e	28,74a	41,80b
P1	40,55bc	37,64b	52,99cd	58,73d
P2	34,41ab	36,85b	57,61de	63,00e
P3	28,20a	32,45a	63,25e	70,34f
T1	41,25bc	45,04cd	57,07de	46,18c
T2	79,31e	58,11e	31,31ab	40,87b
T3	72,69e	71,39f	28,91ab	30,91a

En una misma columna letras distintas indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

Rm (g): Resistencia máxima a la extensibilidad. Em (mm): distancia de extensión hasta ruptura.

El congelamiento de las masas tuvo un efecto diferente en las distintas muestras y dependió no sólo del tipo de enzima sino también de las dosis utilizadas. En la masa control, el efecto del almacenamiento en estado congelado causó una disminución significativa de la resistencia máxima a la extensión, indicando un debilitamiento de la red de gluten. En éste caso, el ensayo fue

realizado sin levadura, por lo que la formación de los cristales de hielo causó por efecto mecánico la ruptura de la matriz de gluten resultando en una red menos continua y con los gránulos de almidón más separados de la matriz proteica (Varriano-Marston *et al.* 1980, Havet *et al.* 2000, Giannou *et al.* 2003). Sharadanant y Khan (2003) y Yi y Kerr (2009) reportaron resultados similares ya que observaron que la extensibilidad de la masa aumentó con el tiempo de almacenamiento en estado congelado, mientras que la resistencia máxima a la extensión disminuyó.

En las muestras con altos niveles de Gox ( $\geq 0,005\%$ ), se observó una disminución de la Rm y un incremento significativo de Em con el aumento del tiempo de almacenamiento en estado congelado. A pesar del deterioro observado en las muestras con Gox, esta enzima ayudó a mitigar el daño ocasionado por el almacenamiento en estado congelado, ya que estas masas mostraron mayores valores de Rm que la masa control congelada durante 9 semanas. En las muestras con Pn se observó un aumento de la extensibilidad de la masa con el aumento del tiempo de almacenamiento, mientras que la resistencia máxima a la extensión no fue prácticamente modificada. Las masas con TG no mostraron grandes cambios luego de 9 semanas de almacenamiento, sólo la dosis intermedia disminuyó significativamente la resistencia a la deformación e incrementó su extensibilidad. Comparando todas las masas después de 9 semanas de almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las muestras con alto contenido de Gox (G2 y G3) y TG (T2 y T3) tuvieron mayor resistencia a la extensión con respecto al control, mientras que las masas con Pn (P1, P2 y P3) fueron las que menor Rm presentaron. Lo contrario ocurrió en la extensibilidad de las masas, ya que las masas con Pn desarrollaron mayor extensibilidad que el control, y las masas con altos contenidos de Gox (G3) y TG (T2 y T3) tuvieron menor extensibilidad que el control.

### **2.3. Comportamiento reológico de las masas congeladas aplicando pequeñas deformaciones.**

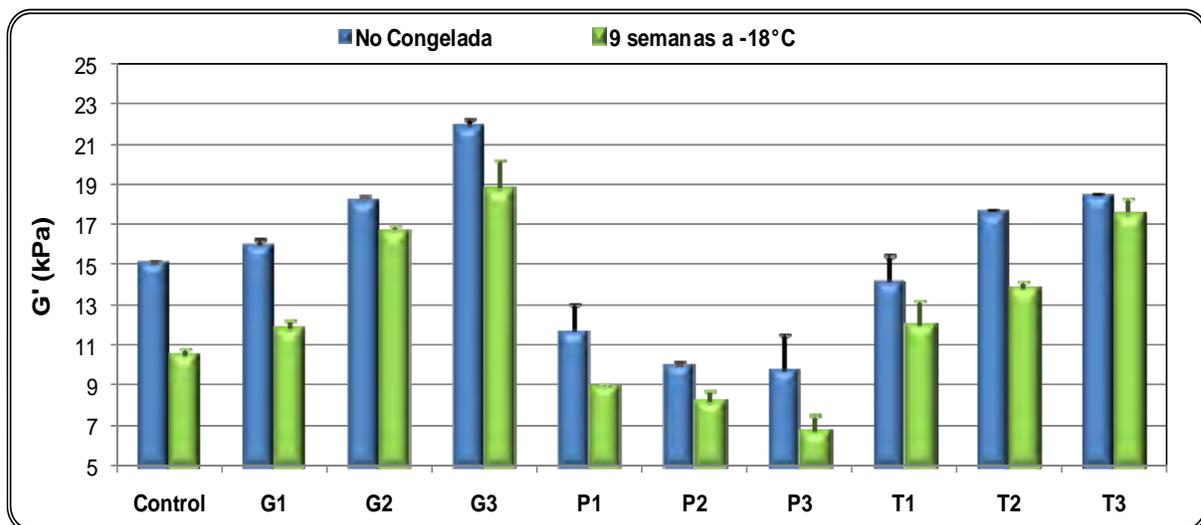
En esta segunda parte se estudiaron las propiedades reológicas dinámicas de las masas aditivadas con las enzimas y congeladas (Reómetro Haake RS600, Karlsruhe, Alemania). Se prepararon masas con 58,5% de agua, 2,2% de NaCl, 3% de levadura en base harina y las mismas dosis de enzimas utilizadas en el ensayo de panificación. Las masas fueron congeladas y almacenadas a -18 °C durante 9 semanas. El uso de levaduras permitió analizar si la adición de las enzimas contrarresta el efecto negativo de la muerte de las levaduras producida durante el congelamiento de las masas. Luego del almacenamiento se descongelaron las masas a 30 °C por 30 min y se realizaron los barridos de frecuencias entre 0,03 Hz y 100 Hz a una deformación constante de 0,016% (rango lineal) a 25 °C. Se utilizó una geometría de platos paralelos rugosos (PP30) y 1 mm de apertura.

**2.3.1. Reología dinámica de las masas.** Todas las masas analizadas presentaron un comportamiento viscoelástico con predominancia en la componente elástica, ya que en todo el rango de frecuencia  $G'$  fue mayor que  $G''$  (datos no mostrados). En las muestras sin congelar, como explicamos en las secciones 1, 2 y 3, se observó que Gox y TG produjeron un aumento significativo de los valores del módulo elástico ( $G'$ ) (Figura 4.12). Una posible explicación a estas observaciones es que el mayor entrecruzamiento entre las proteínas del trigo por acción de estas enzimas provocan la formación de una masa mucho más fuerte y elástica. Por el contrario la enzima Pn causó una disminución significativa del módulo elástico indicando la formación de una masa más blanda y menos elástica.

En general, el almacenamiento de las masas en estado congelado causó una disminución del  $G'$  en todas las muestras. En la masa control el porcentaje de disminución del  $G'$  por efecto del almacenamiento en estado congelado fue ~ 30%, junto con P3 fueron las muestras que mayor porcentaje de disminución tuvieron. En el mismo sentido los resultados de Ribotta *et al.* (2003) muestran una

disminución del módulo complejo ( $G^*$ ) y del módulo elástico ( $G'$ ) de las masas por efecto del congelamiento y almacenamiento en estado congelado. Angioloni *et al.* (2008) también obtuvieron resultados similares ya que observaron una disminución del  $G'$ ,  $G''$  y un aumento de  $\tan \delta$  de las masas después de 60 días de almacenamiento a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ .

Además del efecto mecánico de los cristales de hielo sobre la red de gluten, también la muerte de las levaduras durante el congelamiento podría estar causando un efecto negativo sobre las propiedades viscoelásticas de las masas. Kline y Sugihara (1968), Hsu *et al.* (1979) y Ribotta *et al.* (2003) sugirieron que el ablandamiento de la masa podía ser atribuido a la liberación de sustancias reductoras, tales como el glutatión por las levaduras muertas durante el congelamiento. El glutatión actuaría reduciendo los puentes disulfuro en las proteínas del gluten reduciendo el entrecruzamiento de la red de gluten y en consecuencia su elasticidad.



**Figura 4.12.** Efecto de las enzimas sobre la variación del módulo elástico ( $G'$ ) de las masas con el tiempo de almacenamiento a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . No congelada: masas sin congelar, 9 semanas: masas congeladas durante nueve semanas.

Las muestras con alto contenido de glucosa oxidasa y de transglutaminasa fueron las que menor porcentaje de disminución de  $G'$  presentaron, indicando que

la acción de las enzimas ayudó a mitigar el efecto negativo del congelamiento sobre la elasticidad de las masas. Comparando todas las masas que fueron congeladas y almacenada a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 9 semanas, las muestras con altas dosis de glucosa oxidasa y transglutaminasa presentaron mayores valores de  $G'$  que el control (sin enzima) (Figura 4.12) por lo que las masas con las enzimas fueron más elásticas con mayor capacidad para retener el  $\text{CO}_2$  y expandirse durante la fermentación.

En mayor o en menor medida, las tres enzimas como aditivos permitieron mitigar el deterioro causado por la congelación y el almacenamiento en estado congelado de las masas de pan. La enzima Pn permitió obtener panes a partir de masas congeladas de mejor calidad que el control. El efecto de la enzima Pn sobre el volumen de los panes fue tan alto, que a pesar de que tuvieron mayor porcentaje de deterioro que el control, los panes resultantes siguieron teniendo mejores características. El mayor deterioro se debió principalmente a que la enzima disminuyó el tamaño de los pentosanos causando una redistribución del agua, esto llevó a la formación de un mayor número y tamaño de los cristales de hielo que dañaron la red de gluten. El deterioro se reflejó principalmente en la obtención de una masa floja y débil con baja elasticidad y una excesiva adhesividad.

La enzima glucosa oxidasa permitió obtener panes a partir de masas congeladas con mayor volumen que el control y mejores características texturales de la miga. El efecto oxidante de la enzima sobre las proteínas del gluten ayudó a mitigar los daños causados por el congelamiento y almacenamiento en estado congelado. El mayor grado de entrecruzamiento entre las proteínas del gluten debido a la acción de la Gox permitió contrarrestar el daño causado por los cristales de hielo y por las sustancias reductoras liberadas por las células de levadura muertas durante el congelamiento. Por lo tanto el porcentaje de deterioro de las masas con Gox por el congelamiento fue mucho menor al del control, las masas resultantes fueron más elásticas y más resistentes que la masa control.

Solo la dosis intermedia de transglutaminasa permitió obtener, a partir de masas congeladas, panes con mayor volumen específico y menor firmeza de la

miga. Los nuevos enlaces isopeptídicos introducidos por TG en las proteínas del gluten ayudan a mitigar el daño causado por el congelamiento de la masa. A pesar de que la estructura de la red de gluten formada por la TG es diferente a la formada a partir de puentes disulfuro, la enzima permitió obtener masas con menor porcentaje de deterioro que la masa control.

QUINTA SECCIÓN:

**Uso de enzimas para  
optimizar la formulación  
del pan**

## **1. Optimización de la formulación del pan, utilizando combinaciones de enzimas.**

En las secciones anteriores se analizó detalladamente el efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa sobre la calidad del pan. Consecutivamente se investigó la acción de las mismas sobre cada uno de los componentes de la masa. El análisis de las modificaciones a nivel molecular introducidas por cada una de las enzimas por separado permitió explicar los cambios observados en la calidad del pan. Cada una de ellas actuó de forma diferente sobre las fracciones proteicas y sobre los otros componentes de la harina mediante un mecanismo particular, afectando en diferentes maneras las propiedades de la masa de pan.

La enzima transglutaminasa causó efectos marcados sobre las propiedades de la masa y la calidad del pan. Los nuevos enlaces isopeptídicos introducidos por la enzima modificaron la estructura de la masa causando la pérdida de la extensibilidad por lo que los panes resultantes tuvieron bajo volumen y mala calidad. Debido a estas observaciones previas no se utilizó transglutaminasa en la optimización de la formulación.

La enzima  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1), hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 del almidón, produciendo  $\alpha$ -dextrinas de bajo peso molecular (Bowles 1996). Las amilasas son rutinariamente utilizadas en la panificación y es sabido que su efecto se debe a que incrementa el contenido de azúcares fermentables (Bowles, 1996) y de azúcares reductores. Los azúcares fermentables sirven como sustrato para las levaduras aumentando la producción de CO<sub>2</sub>, 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 & Godon 1987, Bowles 1996). Por último las amilasas actúan disminuyendo la velocidad de endurecimiento de la miga retrasando el envejecimiento del pan. Las dextrinas, producto de la degradación del almidón, interfieren en la reasociación y retrogradación de la amilopectina (León *et al.* 1997, Min *et al.* 1998, Defloor & Delcour 1999).

Las enzimas pentosanasa y glucosa oxidasa incidieron sobre diferentes atributos del pan y mejoraron su calidad, ésto amerita estudiar el efecto cuando se las utiliza en conjunto.

Se prosiguió entonces a estudiar el efecto sinérgico de la combinación de enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y  $\alpha$ -amilasa. En orden a mejorar la respuesta, el efecto de cada enzima fue evaluado en combinación sobre el comportamiento reológico de la masa y los parámetros de calidad del pan fresco como volumen, textura y características de la miga y color de la corteza.

### **1.1. Diseño experimental.**

Para estudiar el efecto de la combinación de las enzimas sobre las propiedades de la masa y la calidad del pan se seleccionaron las siguientes variables independientes:

- Glucosa Oxidasa      0,0003 - 0,005 g / 100 g de harina.
- Pentosanasa            0,003 - 0,018 g / 100 g de harina
- $\alpha$ -amilasa            0,004 - 0,016 g / 100 g de harina

Los niveles de las variables fueron seleccionados de acuerdo a los resultados presentados en los capítulos anteriores y teniendo en cuenta las recomendaciones de los fabricantes.

Mediante un proceso de regresión de superficie de respuesta (Statgraphics plus 5.0) se generó un diseño central compuesto rotatable con tres factores y cinco niveles. Mediante éste diseño se estudió el efecto de los tres factores (enzimas) en 18 panificaciones. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorio para evitar efectos de variables ocultas. Se hicieron cuatro réplicas del punto central para permitir la estimación del error puro mediante la suma de cuadrados. En la Tabla 5.1 se presenta el diseño experimental.

**Tabla 5.1.** Diseño central compuesto rotatable para la optimización de pentosanasa (Pn), Glucosa oxidasa (Gox) y  $\alpha$ -amilasa (AM).

Muestra	Gox*	Pn*	AM*
1	0,0050	0,0180	0,0160
2	0,0027	0,0105	0,0000
3	0,0027	0,0231	0,0100
4	0,0050	0,0030	0,0040
5	0,0003	0,0180	0,0160
6	0,0027	0,0000	0,0100
7	0,0027	0,0105	0,0100
8	0,0003	0,0030	0,0040
9	0,0027	0,0105	0,0100
10	0,0000	0,0105	0,0100
11	0,0050	0,0030	0,0160
12	0,0066	0,0105	0,0100
13	0,0050	0,0180	0,0040
14	0,0003	0,0030	0,0160
15	0,0027	0,0105	0,0100
16	0,0003	0,0180	0,0040
17	0,0027	0,0105	0,0100
18	0,0027	0,0105	0,0201

\*Valores de cada enzima en g / 100 g de harina.

Los resultados fueron analizados mediante el método de regresión múltiple. La calidad de los modelos ajustados fueron evaluados mediante ANOVA (Statgraphics plus 5.0) y para el ajuste de cada modelo de los datos experimentales se obtuvo el coeficiente de determinación  $R^2$ . Se desarrollaron ecuaciones de regresión múltiple solo con coeficientes significativos ( $p \leq 0,05$ ). Los gráficos de superficies de respuestas bidimensionales se generaron para cada parámetro de calidad. El cálculo de las condiciones óptimas para el proceso de panificación combinando enzimas fue determinado usando un método de respuesta múltiple llamado "conveniencia".

## **2. Efecto de la combinación de enzimas sobre los parámetros de calidad del pan.**

Es extensamente aceptado que entre los criterios de calidad del pan de molde se busca obtener grandes volúmenes con una miga tierna, esponjosa y con una estructura uniforme. Por lo tanto, dependiendo del parámetro medido se planteó maximizar o minimizar la respuesta. Para cada grupo de respuesta una ecuación cuadrática fue formulada con los términos relevantes ( $p \leq 0,05$ ) para obtener un valor de  $R^2$  lo más alto posible. Basados en estas ecuaciones, el comportamiento de respuesta puede ser predicho y presentado como una superficie de respuesta.

En la Tabla 5.2 se presentan el volumen específico del pan y los parámetros de textura de la miga de pan. En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestran los gráficos de los modelos cuadráticos para el volumen específico, la firmeza, elasticidad y masticabilidad de la miga. Los coeficientes de determinación,  $R^2$ , permitieron explicar el 97,2%; 91,8%; 87,3% y 83,5% de la variabilidad de los datos, respectivamente. En el presente estudio, el volumen del pan control (elaborado con la formulación base sin el agregado de ninguna de las enzimas) fue 4,38 cm<sup>3</sup>/g. Casi todas las combinaciones de enzimas ensayadas presentaron mayor volumen específico que el pan control, sin embargo los ensayos N°11, 12 y 13 en cuyas formulaciones tenían un elevado contenido de glucosa oxidasa presentaron un volumen específico de pan similar al control. La enzima glucosa oxidasa es la encargada de aumentar la fuerza de la masa de pan. En el caso de harinas de buena calidad, como son las harinas producidas en Argentina, un elevado contenido de Gox aumenta demasiado la tenacidad de la masa dificultando su expansión durante la fermentación. Sin embargo, bajos contenidos de Gox combinado con otras enzimas, como es el caso de la Pn y la AM, permitieron desarrollar panes con elevado volumen específico (Ensayos N° 3, 5 y 7).

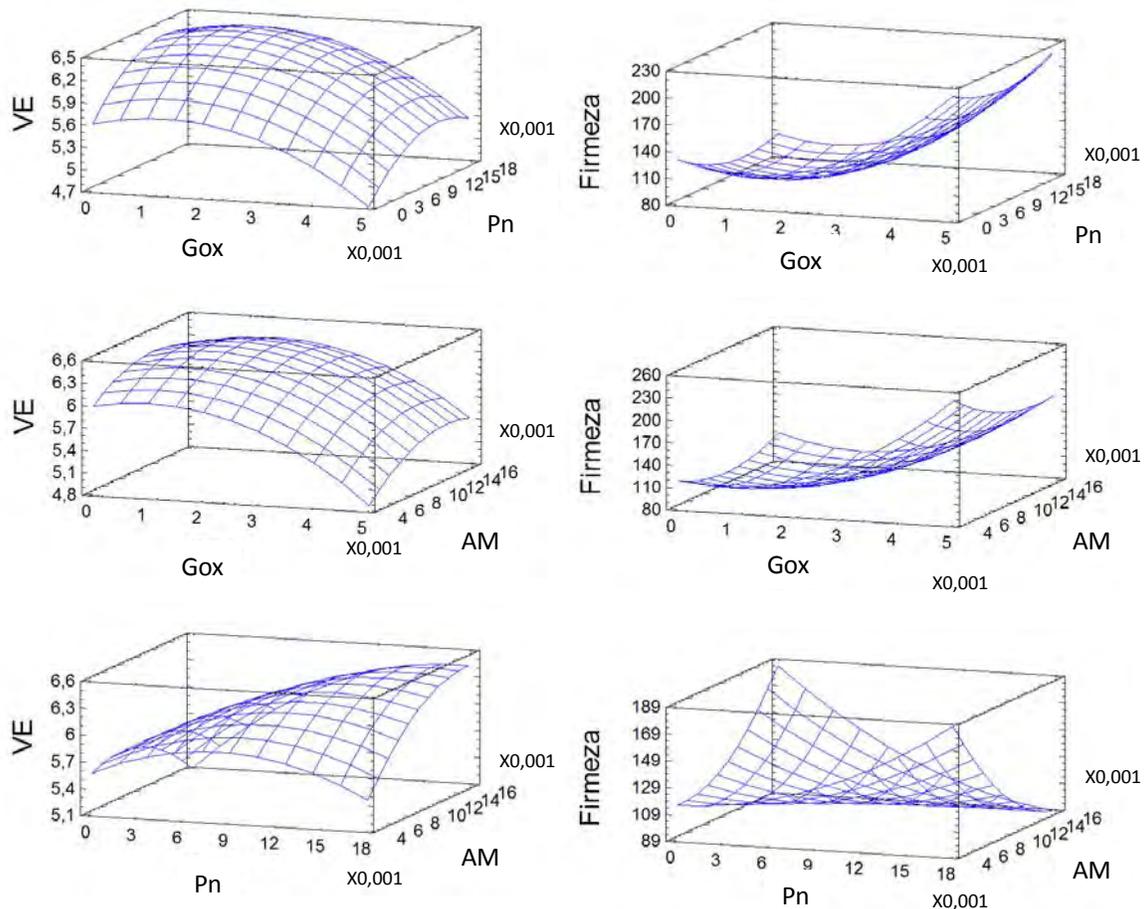
**Tabla 5.2.** Respuesta experimental de los parámetros de calidad del pan.

Ensayo	VE(cm <sup>3</sup> /g)	Firmeza(g)	Elasticidad	Masticabilidad(g)
1	5,59	147	1,80	180
2	5,50	162	1,70	185
3	5,97	135	1,80	166
4	4,68	207	1,42	198
5	6,38	108	1,86	138
6	5,71	127	1,87	165
7	6,33	102	1,94	138
8	5,76	130	1,89	171
9	6,32	101	1,94	138
10	6,43	103	1,95	141
11	4,64	261	1,03	174
12	4,50	302	1,04	199
13	4,23	338	0,99	216
14	5,56	131	1,93	179
15	6,23	112	2,00	160
16	5,55	140	1,97	191
17	6,25	109	1,97	151
18	5,90	151	1,91	198

VE: Volumen específico del pan (cm<sup>3</sup>/g). Propiedades texturales de la miga de pan: firmeza (g), elasticidad y masticabilidad (g).

En la Tabla 5.3 se presentan los coeficientes de regresión significativos de las distintas variables analizadas. Las tres enzimas tuvieron un efecto lineal positivo y cuadrático negativo sobre el volumen específico del pan, además se observó un aporte positivo de la interacción entre pentosanasa y  $\alpha$ -amilasa. Estos resultados indicaron que a medida que se incrementó el contenido de cada enzima aumentó el volumen específico del pan pero este aumento fue hasta un valor óptimo de cada enzima (Figura 5.1), ya que por encima de estos niveles el

volumen específico disminuyó. La combinación de enzimas para maximizar el volumen específico del pan ( $6,56 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) fue Gox  $0,0014$ ; Pn  $0,0158$  y AM  $0,0142 \text{ g} / 100 \text{ g}$  de harina.



**Figura 5.1.** Gráficos de superficie de respuesta del volumen específico del pan (VE,  $\text{cm}^3/\text{g}$ ) y de la firmeza (g) de la miga de pan. Gox, glucosa oxidasa; Pn, pentosanasa; AM,  $\alpha$ -amilasa.

El pan es un producto complejo que se obtiene como resultado de una suma de interacciones entre los principales constituyentes. Es de gran interés estudiar la textura del pan porque se relaciona directamente con el envejecimiento y con la aceptación del consumidor. Por lo tanto, todos los factores que contribuyen a la textura del pan, tienen un impacto sobre los placeres sensoriales al consumirlos. Principalmente se suele analizar la textura de la corteza y de la

miga de pan. Si el producto es fresco recién horneado, se puede observar que la corteza es dura al tacto pero se quiebra rápidamente cuando se trata de doblarla. Se dice entonces que la corteza de pan tiene que ser crujiente al morder. Por el contrario, la miga de pan posee una estructura porosa y aireada, donde todas las celdas (alveolos) de aire se encuentran interconectadas (Cauvain & Young 2000) mediante una matriz sólida constituida por gluten-almidón. En el pan fresco, la miga se caracteriza por ser esponjosa, suave y elástica. En la Tabla 5.2 se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de perfil de textura de la miga de pan de los 18 ensayos. Los parámetros más relevantes fueron la firmeza, la elasticidad y la masticabilidad de la miga de pan. El pan control (sin enzimas) presentó altos valores de firmeza y masticabilidad y baja elasticidad (328 g; 277 g y 1,28; respectivamente). Una baja calidad del pan está asociada a una elevada firmeza y masticabilidad; y con una baja elasticidad. El agregado de enzimas modificó significativamente la textura de la miga de pan.

Los panes que presentaron menor firmeza y masticabilidad, y mayor elasticidad de la miga de pan correspondieron a la siguiente formulación: Gox 0,0027; Pn 0,0105 y AM 0,01 g / 100 g de harina. Valores intermedios de las tres enzimas fueron una buena combinación para mejorar la textura del pan.

La enzima Gox tuvo un efecto lineal negativo y un efecto cuadrático positivo sobre la firmeza y masticabilidad de la miga de pan (Tabla 5.3). Estos resultados estarían indicando que cuando se agregaron bajos niveles de Gox las propiedades texturales de la miga de pan fueron mejoradas. Mientras que cuando el nivel de Gox agregado en la formulación fue alto se observó un aumento de la firmeza y masticabilidad. Modificaciones en las proteínas del gluten, como entrecruzamiento y polimerización, influyen en la estructura y textura de la miga del pan (Oates 2001). La Gox promovió una mayor interacción entre las proteínas del gluten que contribuyeron a la formación de una miga de pan cerrada y compacta.

La enzima AM tuvo un efecto cuadrático positivo sobre la firmeza de la miga y se observó un efecto de la interacción entre AM y Pn (Tabla 5.3). Cómo se observa en la Figura 5.1, a una dada concentración de Gox, la firmeza de la miga de pan disminuyó a medida que se aumentaron los niveles Pn y AM. La

combinación de enzimas que permitió minimizar la firmeza (66,75 g) de la miga fue Gox 0,016; Pn 0,023; AM 0,020 g / 100 g de harina. Las características de la miga del pan fresco se relacionan con el contenido de humedad luego del horneado y con la retrogradación de la amilosa (Eliasson & Larsson 1993a). Los ensayos que tenían en su formulación altos contenidos de Pn y AM, y bajos de Gox fueron los que mejores características texturales tuvieron. Tanto la enzima  $\alpha$ -amilasa como la enzima pentosanasa son conocidas por disminuir la firmeza de la miga de pan (León *et al.* 1997, 2002, Courtin *et al.* 1999, 2001). Sin embargo, el más importante factor en el mejoramiento de la firmeza y la masticabilidad de la miga de pan está relacionado con el incremento del volumen de pan. Previos estudios (Every *et al.* 1998) han encontrado una relación inversa entre el volumen específico del pan y la firmeza de la miga. En este trabajo los resultados fueron similares ya que el coeficiente de correlación de Pearson entre VE y firmeza fue  $r = -0,92$  ( $p \leq 0,05$ ).

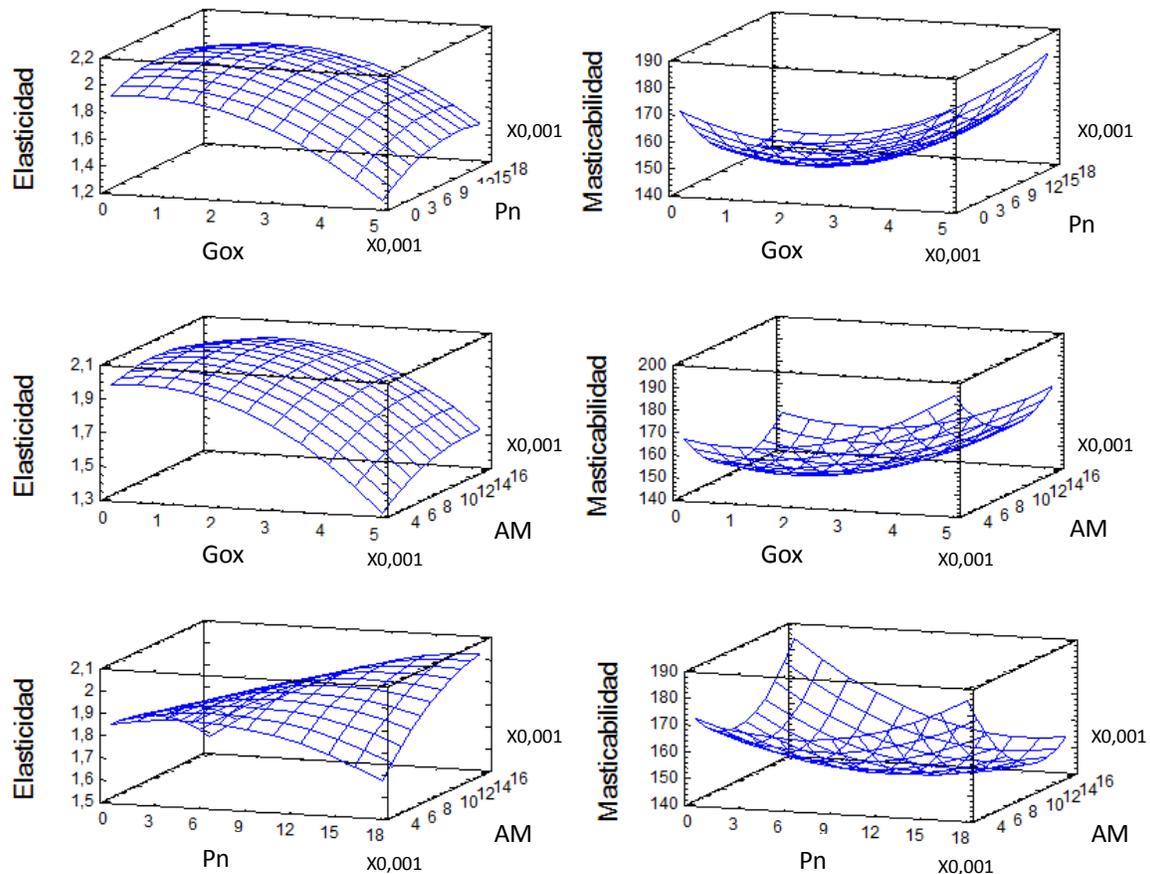
**Tabla 5.3.** Coeficientes significativos de las ecuaciones de regresión de los modelos ajustados para las características del pan.

Factor	VE(cm <sup>3</sup> /g)	Firmeza(g)	Masticabilidad(g)	Elasticidad
<b>constante</b>	5,41929	101,76	201,813	2,06162
<b>A:Gox</b>	137,792	-10435,6	-7205,86	2,24913
<b>B:Pen</b>	51,8812	ns	ns	Ns
<b>C:AM</b>	89,9822	ns	ns	Ns
<b>AA</b>	-75220,8	7,55E+06	1,92E+06	-35164,4
<b>AB</b>	ns	ns	ns	Ns
<b>AC</b>	ns	ns	ns	Ns
<b>BB</b>	-4641,86	ns	ns	Ns
<b>BC</b>	6750	-775667	ns	2916,67
<b>CC</b>	-7234,29	548904	449670	Ns
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>97,17</b>	<b>91,81</b>	<b>83,51</b>	<b>87,26</b>

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación para el modelo ajustado (indica que el modelo así ajustado explica ese porcentaje de la variabilidad de los datos). ns: no significativo ( $p \leq 0,05$ ).

Durante la cocción del pan ocurre la gelatinización y el termoendurecimiento de las proteínas del gluten resultando en una estructura sólida y esponjosa que es la miga del pan cocido (Hoseney *et al.* 2008). Por lo que se puede decir que la miga del pan está compuesta por dos redes, la red de gluten, continua y permanente que forma una matriz entre los gránulos de almidón hinchados y gelatinizados, y la red de polímeros de almidón enredados y gelatinizados. La elasticidad de la miga de pan está fuertemente relacionada con la estructura de las paredes de las celdas de gas y depende principalmente del número y tamaño de los alveolos. La enzima Gox tuvo un efecto lineal positivo y cuadrático negativo sobre la elasticidad de la miga de pan (Tabla 5.3). La disminución de la elasticidad de la miga con el aumento de nivel de Gox puede deberse a que la miga con alto contenido de Gox (Ensayos N° 11, 12 y 13) presentó un mayor número de alveolos (N) de menor tamaño (Am), por lo que la matriz sólida de la miga de pan fue más gruesa y menos aireada (FA) (Tabla 5.4).

La combinación de las enzimas Pn y AM tuvo un efecto positivo sobre la elasticidad (Tabla 5.3). En la Figura 5.2 se observó que para una dada concentración de Gox, a medida que se incrementó el contenido de Pn y AM aumentó la elasticidad de la miga de pan. La enzima AM produce azúcares fermentables lo que promueve una mayor producción de CO<sub>2</sub> por las levaduras y en consecuencia la alta presión de gas promueve la expansión de los alveolos. Los pentosanos de menor tamaño producidos por la enzima Pn, se ubican en las paredes de los alveolos reforzándolos y evitando pérdidas de gas. Por lo tanto, la combinación de AM con Pn permitió una gran expansión de la masa durante la fermentación sin pérdidas de CO<sub>2</sub>, produciendo panes con una miga altamente aireada, grandes alveolos y más elástica. A su vez, la elasticidad del pan está fuertemente relacionada con el volumen de pan, ya que en los panes con alto volumen la miga se vuelve más esponjosa y elástica. El coeficiente de correlación obtenido entre el volumen específico y la elasticidad de la miga de pan fue  $r = 0,87$  ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 5.2.** Gráficos de superficie de respuesta de la elasticidad y masticabilidad (g) de la miga de pan. Gox, glucosa oxidasa; Pn, pentosanasa; AM,  $\alpha$ -amilasa.

En la Tabla 5.4 se presentan los resultados obtenidos del color de la corteza y de los parámetros estructurales de la miga de pan. El color de la corteza de pan es un importante atributo para las preferencias del consumidor. En general la corteza de pan se caracteriza por tener baja humedad y un color oscuro. El color es producido por reacciones químicas, reacciones de Maillard y de caramelización. Los panes en cuya formulación tenían alto contenido de  $\alpha$ -amilasa fueron los que tuvieron menor valor de  $L^*$  indicando la formación de panes con corteza más oscuras y con un marrón más intenso. La enzima AM tuvo un efecto lineal negativo (Tabla 5.5) sobre el color de la corteza del pan indicando que la enzima promueve azúcares reductores para las reacciones de Maillard por lo que los panes se vuelven más oscuros con el incremento del nivel de enzima agregado en la formulación (Figura 5.3). Por lo general el consumidor prefiere panes con

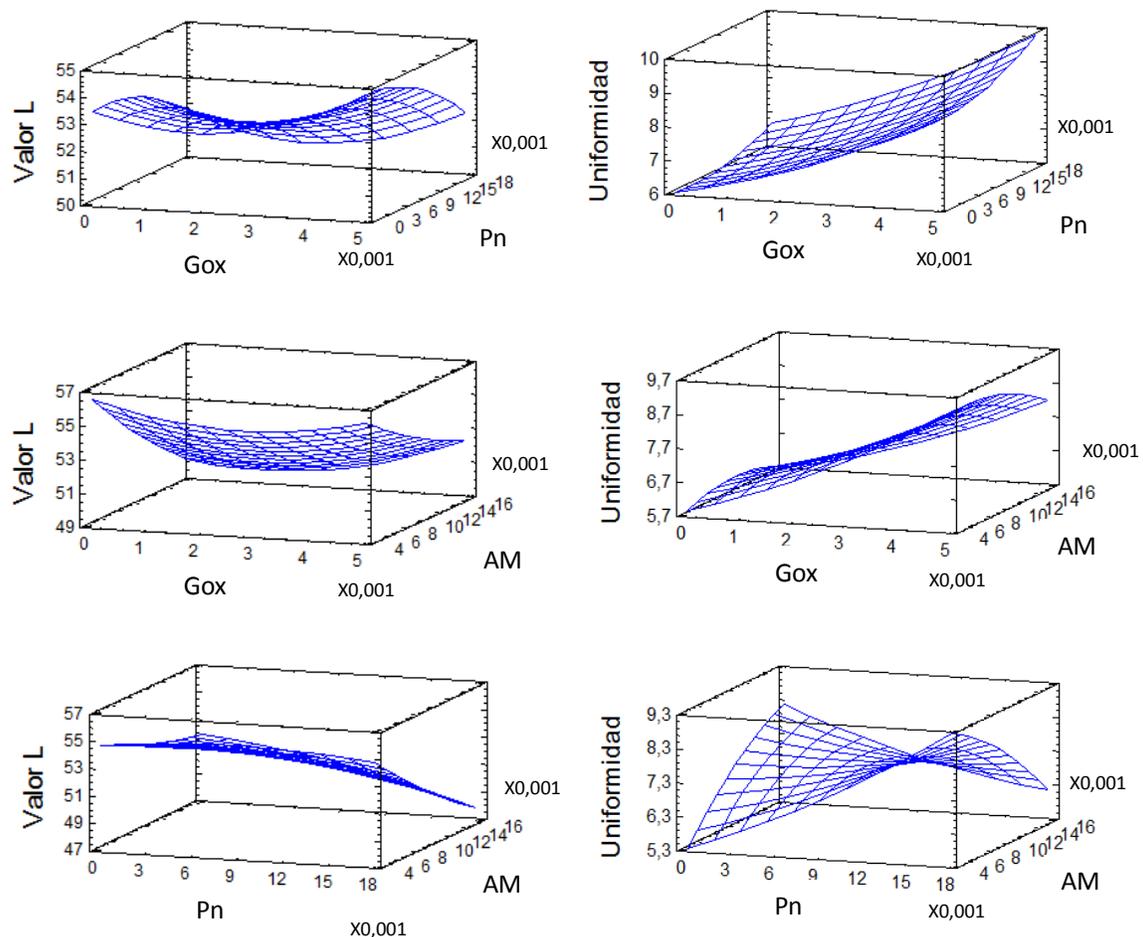
una corteza intermedia entre marrón clara y marrón oscura, sin embargo el efecto de la enzima  $\alpha$ -amilasa sobre el color de la corteza se compensa mejorando el aroma y el sabor producido por los productos de Maillard.

**Tabla 5.4.** Respuesta experimental de los parámetros estructurales de la miga y la luminosidad de la corteza del pan.

Ensayo	L*	Uniformidad	N (1/mm <sup>2</sup> )	Am (mm <sup>2</sup> )	FA
1	49,9	6,513	40,3	0,0248	35,8
2	59,1	5,853	35,1	0,0287	40,1
3	49,0	8,806	39,9	0,0251	38,0
4	54,2	7,375	41,6	0,0241	38,5
5	49,2	5,739	34,6	0,0290	40,3
6	54,7	6,297	46,9	0,0214	33,0
7	52,3	7,650	46,1	0,0218	35,1
8	55,5	6,130	42,2	0,0237	36,6
9	51,6	7,653	45,6	0,0219	35,2
10	50,2	6,774	38,8	0,0259	39,3
11	54,8	10,479	65,9	0,0152	31,1
12	56,2	9,724	61,7	0,0163	32,1
13	56,0	12,873	67,0	0,0151	29,2
14	51,1	5,533	38,6	0,0260	40,9
15	52,4	7,401	47,1	0,0214	33,1
16	54,4	6,731	45,2	0,0223	35,3
17	51,6	7,018	45,0	0,0223	35,6
18	48,3	6,440	44,9	0,0224	35,5

Luminosidad de la corteza del pan (CIE-LAB): L\*. Parámetros estructurales de la miga: N (número de alveolos por unidad de área, 1/mm<sup>2</sup>), Am (área media de los alveolos (mm<sup>2</sup>), FA (fracción de aire). Uniformidad (Relación entre número de alveolos menores a 0,04 mm<sup>2</sup> y el número de alveolos mayores a 0,04 mm<sup>2</sup>).

El marrón intenso de las muestras con AM se ve incrementado cuando en la formulación hay además alto contenido de Pn (Ensayos N° 3, 5 y 10) y se ve disminuido con alto contenido de Gox (Ensayos N° 11, 12 y 13). El primer caso puede deberse a que la enzima Pn al hidrolizar los pentosanos libera azúcares reductores que son utilizados como sustratos en las reacciones de Maillard; además disminuye la retención de agua de la masa y durante el horneado hay mayor sequedad de la superficie del pan favoreciendo las reacciones de Maillard. Por el contrario, la enzima Gox que refuerza la red de gluten promueve una mayor retención de agua durante el horneado, efecto desfavorable para las reacciones de Maillard.



**Figura 5.3.** Gráficos de superficie de respuesta de la luminosidad de la corteza del pan (valor L\*) y la uniformidad de la estructura de la miga de pan (relación entre número de alveolos menores a  $0,04 \text{ mm}^2$  y el número de alveolos mayores a  $0,04 \text{ mm}^2$ ). Gox, glucosa oxidasa; Pn, pentosanasa; AM,  $\alpha$ -amilasa.

La uniformidad de la miga de pan fue determinada como la relación entre el número de alveolos menores a  $0,04 \text{ mm}^2$  y el número de alveolos mayores a  $0,04 \text{ mm}^2$ . Altos valores de ésta relación indican una elevada uniformidad de la miga de pan (Zghal *et al.* 2001). La enzima Gox tuvo un efecto lineal positivo sobre la uniformidad de la miga de pan (Tabla 5.5), indicando que a medida que se incrementó el contenido de Gox la estructura de la miga de pan presentó mayor uniformidad. Sin embargo las muestras con alto contenido de Gox presentaron bajo volumen de pan por lo que la enzima Gox promueve un efecto positivo sobre la uniformidad de la miga y negativo sobre el volumen de pan.

**Tabla 5.5.** Coeficientes significativos de las ecuaciones de regresión de los modelos ajustados para las características de la corteza y de la miga de pan.

Factor	L*	N (1/mm <sup>2</sup> )	Área Media (mm <sup>2</sup> )	Uniformidad
<b>constante</b>	57,8088	23,3607	0,0319043	2,22846
<b>A:Gox</b>	ns	-462,446	0,0889284	442,635
<b>B:Pen</b>	216,786	ns	ns	ns
<b>C:AM</b>	-536,329	ns	ns	ns
<b>AA</b>	179126	ns	ns	ns
<b>AB</b>	ns	ns	ns	ns
<b>AC</b>	ns	ns	ns	ns
<b>BB</b>	ns	ns	ns	ns
<b>BC</b>	ns	-161250	63,8889	-27386,1
<b>CC</b>	ns	ns	ns	ns
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>87,5</b>	<b>76,68</b>	<b>76,3</b>	<b>74,85</b>

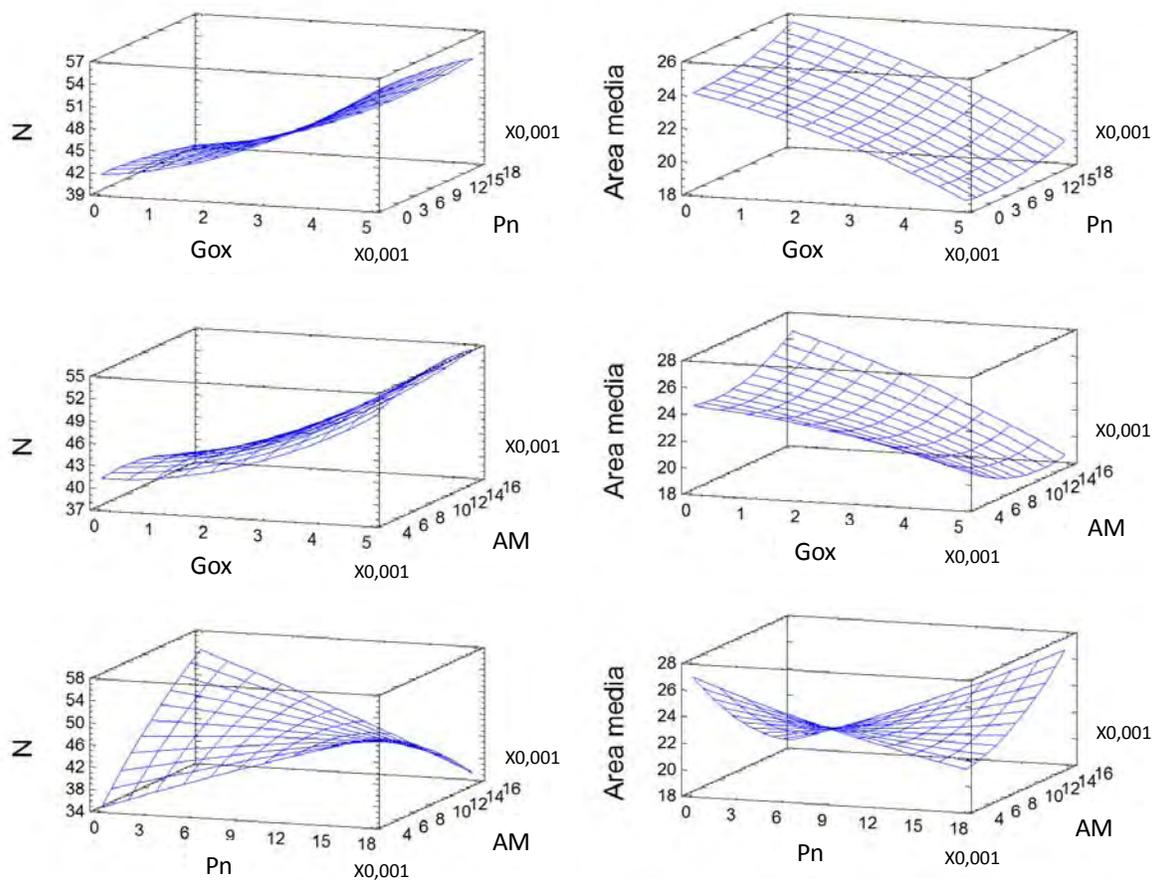
R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación para el modelo ajustado (indica que el modelo así ajustado explica ese porcentaje de la variabilidad de los datos). ns: no significativo ( $p \leq 0,05$ ).

La combinación de Pn y AM ejerció un efecto negativo sobre la uniformidad de la miga de pan (Tabla 5.5). En la Figura 5.3 se observó que individualmente AM y Pn a una dada concentración de Gox, aumentaron la uniformidad de la miga a medida que se incrementó el nivel de la enzima. Sin embargo, cuando ambas enzimas son combinadas en la formulación se observó que la uniformidad aumentó solo hasta ciertos valores óptimos y luego comenzó a disminuir.

Otros dos parámetros importantes de la estructura de la miga de pan que pueden ser analizados son el número de alveolos por unidad de área (N) y el área media (Am) de los alveolos. En la Figura 5.4 se presentan los gráficos de superficie de respuesta de N y Am. A medida que se incrementó el contenido de Gox en la formulación, la miga de los panes presentó un menor tamaño de alveolos y, consecuentemente, un mayor contenido de alveolos por unidad de área (Figura 5.4). La combinación de las enzimas Pn y AM ejerció un efecto negativo sobre N y un efecto positivo sobre el Am (Tabla 5.5), indicando que a medida que se incrementan las dosis de las dos enzimas al mismo tiempo, los panes desarrollan una estructura de la miga con alveolos de mayor tamaño y con un menor número de alveolos por unidad de área (Figura 5.4).

Kamman (1970) postuló que la estructura física y visual de la miga de pan son factores de calidad que se relacionan entre sí y que deberían ser considerados como una sola entidad. Además sostuvo que la textura física de la miga está determinada en gran medida por el espesor de la pared de los alveolos, el tamaño de los alveolos y la uniformidad. Pylar (1988) señaló que la sensación percibida al tacto o en la boca por la miga de pan está fuertemente influida por su estructura de la miga; ya que cuando ésta es fina, con paredes delgadas y con una distribución de tamaño de alveolos uniforme, denota una textura más suave que las estructuras abiertas y con paredes alveolares gruesas. Sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios, principalmente con respecto a la uniformidad de la miga. La uniformidad de la miga de pan correlacionó positivamente con la firmeza de la miga ( $r = 0,81$ ) y negativamente con la elasticidad ( $r = -0,81$ ) ( $p \leq 0,05$ ). También se obtuvo una correlación inversa entre el volumen específico del pan y la uniformidad ( $r = -0,65$ ). La combinación de

enzimas que permitió obtener panes con elevado volumen y baja firmeza cuasó a la vez la formación de una miga poco uniforme, por lo que el desarrollo de elevados volúmenes de pan fue desventajoso para la uniformidad de la miga. Gox es la enzima que principalmente influye en la uniformidad de la miga, su acción causa un mayor grado de entrecruzamiento entre las proteínas de la masa lo que lleva a la formación de una miga con alveolos pequeños, uniformemente distribuidos y con paredes alveolares gruesas, y estas características de la miga se reflejan en un aumento de la firmeza. El número de alveolos por unidad de área (N) y el área media (Am) de los alveolos también correlacionaron con la firmeza de la miga de pan (0,81 y - 0,71; respectivamente); N fue directamente proporcional a la firmeza de la miga mientras que el Am fue inversamente proporcional.



**Figura 5.4.** Gráficos de superficie de respuesta del número de alveolos por unidad de área (N,  $1/\text{mm}^2$ ) y el área media de los alveolos (Am,  $\text{mm}^2$ ). Gox, glucosa oxidasa; Pn, pentosanasa; AM,  $\alpha$ -amilasa.

En la Figura 5.5 se presentan fotografías de rodajas de panes del control (sin enzima) y de los ensayos más significativos. Como puede observarse el control presentó un bajo volumen específico del pan y la miga tuvo alveolos pequeños uniformemente distribuidos y con gruesas paredes alveolares. En los ensayos experimentales 14, 16, 9 y 10 se observó que a medida que aumentó el volumen de pan gracias al agregado de las enzimas, la miga de los panes presentó alveolos de mayor tamaño, no uniformemente distribuidos por lo que la estructura de la miga estuvo más aireada y las paredes de los alveolos fueron más finas.



**Figura 5.5.** Fotografías de rodajas de panes de algunos ensayos seleccionados. Los valores en las figuras corresponden a los volúmenes específicos de los panes. Control (sin enzimas), número de los ensayos correspondientes a la Tabla 5.1.

### 3. Efecto de la combinación de enzimas sobre las propiedades de la masa de pan.

Mediante ensayos de perfil de textura se analizó el efecto de la combinación de enzimas sobre las propiedades viscoelásticas de las masas. Los parámetros de mayor importancia fueron la dureza y la adhesividad de las masas. Las respuestas experimentales de las propiedades reológicas de los 18 ensayos son presentadas en la Tabla 5.6. La dureza de la masa es la fuerza máxima del primer ciclo de compresión de la curva característica del análisis de perfil de textura (TPA), por lo

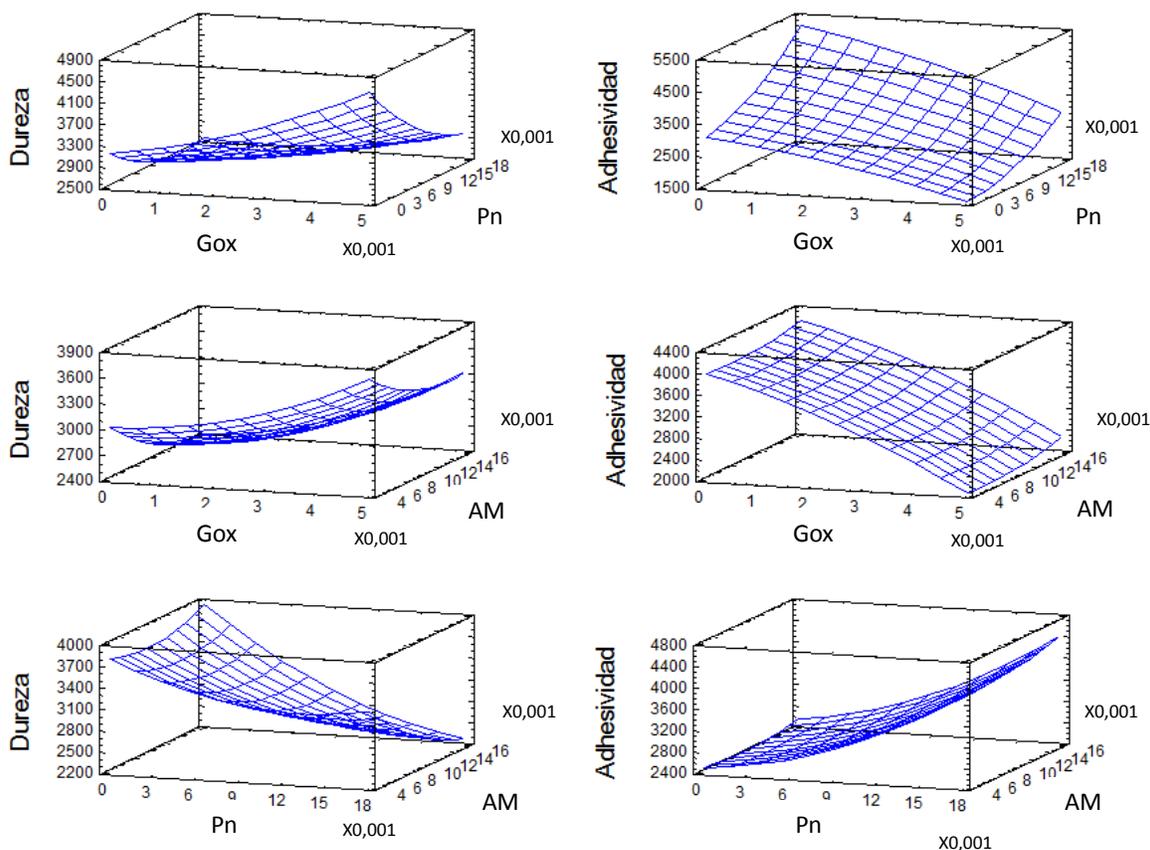
tanto este parámetro es una medida de la resistencia que ejerce la masa frente a la deformación. En general, las masas en cuya formulación contenían altos niveles de glucosa oxidasa y bajos niveles de Pn y AM presentaron una elevada dureza de la masa. La enzima Gox tuvo un efecto lineal positivo sobre la dureza de la masa, mientras que Pn y AM tuvieron un efecto lineal negativo (Tabla 5.7). Altos niveles de Gox causaron un elevado entrecruzamiento entre las proteínas del gluten, por lo que la masa fue fuerte y resistente. Estos mismos ensayos resultaron con bajos volúmenes específicos de pan debido a la alta resistencia de la masa que dificultó su expansión durante la fermentación.

**Tabla 5.6.** Respuesta experimental de las propiedades reológicas de la masa.

Ensayo	Dureza (g)*	Adhesividad (g seg)*
1	2703	3250
2	3573	3533
3	2350	5640
4	4060	1814
5	2577	4821
6	4015	2446
7	2760	3073
8	3263	2895
9	2784	3100
10	2676	4518
11	4543	1563
12	3743	1399
13	4096	2459
14	2659	3479
15	2777	3018
16	3189	4965
17	2793	3015
18	2784	3760

\*Parámetros obtenidos a partir de la curva característica del análisis de perfil de textura.

En la Figura 5.6 se observó que a medida que se incrementó individualmente el contenido de Pn y AM la masa resultó menos dura, este efecto fue mayor cuando las enzimas fueron combinadas.



**Figura 5.6.** Gráficos de superficie de respuesta de los parámetros texturales de la masa, dureza (g) y adhesividad (g seg). Gox, glucosa oxidasa; Pn, pentosanasa; AM,  $\alpha$ -amilasa.

Una masa con elevada adhesividad puede presentar problemas de maleabilidad durante el proceso de elaboración; sin embargo, masas con muy baja adhesividad pueden ser muy secas y duras. Se busca entonces, que las masas de pan tengan valores adecuados de adhesividad ya que proveen una buena performance en el proceso de panificación. La enzima Pn tuvo un efecto lineal positivo sobre la adhesividad de la masa, mientras que la enzima Gox tuvo un efecto lineal negativo ( $R^2 = 93,9$ ) (Tabla 5.7). En los ensayos donde la formulación contenía un elevado contenido de Pn, la masa resultante fue

altamente adhesiva (Figura 5.6). Altos niveles de Pn conducen a una excesiva hidrólisis de los pentosanos (solubles e insolubles en agua) provocando efectos negativos sobre las masas de pan (Courtin *et al.* 1999, 2001). Por el contrario, elevados valores de Gox en la formulación, disminuyen considerablemente la adhesividad resultando en una masa seca y dura (Vemulapalli *et al.* 1998) a causa de la gelación oxidativa de los pentosanos solubles en agua. Los valores intermedios de adhesividad de las masas fueron obtenidos mediante la combinación de dosis intermedias de las tres enzimas.

**Tabla 5.7.** Coeficientes significativos de las ecuaciones de regresión de los modelos ajustados para las propiedades de la masa.

Factor	Dureza (g)	Adhesividad (g seg)
constante	3538	3289,49
A:Gox	108937	-170753
B:Pen	-38672,1	34454,6
C:AM	-84438,2	ns
AA	ns	ns
AB	ns	ns
AC	ns	ns
BB	ns	ns
BC	ns	ns
CC	ns	ns
R <sup>2</sup>	<b>87,09</b>	<b>93,89</b>

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación para el modelo ajustado (indica que el modelo así ajustado explica ese porcentaje de la variabilidad de los datos). ns: no significativo ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4. Optimización.

Para hacer el análisis de superficie de respuesta las 18 panificaciones se realizaron mediante la metodología de pan de molde utilizada en programas de mejoramiento de trigo según norma IRAM 15858-1. Al tratarse de panes de molde, en la primera optimización se buscó maximizar el volumen específico del pan y la uniformidad de la miga, y minimizar la firmeza y masticabilidad de la miga

simultáneamente. Los resultados de la primera optimización indicaron que la combinación de 0,0026% de Gox; 0,016% de Pn y 0,0098% de AM permiten obtener un pan con 43% más de volumen que el control (sin enzima), con una miga tierna y uniforme (Tabla 5.8). Las enzimas AM y Pn contribuyeron principalmente en el aumento del volumen específico y en la disminución de la firmeza y masticabilidad de la miga, mientras que la enzima Gox fue la encargada de mejorar la uniformidad de la miga.

**Tabla 5.8.** Valores esperados de las variables de respuestas para cada optimización

<b>Optimización 1</b>		<b>Optimización 2</b>	
<b>Variables de Respuesta</b>	<b>Valor Esperado</b>	<b>Variables de Respuesta</b>	<b>Valor Esperado</b>
<b>VE</b>	6,27	<b>VE</b>	6,00
<b>Firmeza</b>	114,20	<b>Firmeza</b>	135,45
<b>Masticabilidad</b>	150,74	<b>Masticabilidad</b>	153,06
<b>Uniformidad</b>	7,91	<b>Uniformidad</b>	7,95
		<b>Adhesividad</b>	2583,29

A nivel industrial, el pan de molde se elabora principalmente mediante una línea de procesos totalmente automatizados. Por lo que una elevada adhesividad de la masa es un inconveniente para el método de elaboración. Para la segunda optimización se buscó maximizar el volumen específico y la uniformidad, y minimizar la firmeza, masticabilidad de la miga y la adhesividad de la masa. La combinación de 0,0037% de Gox, 0,0089% de Pn y 0,0105% de AM permiten obtener una masa con baja adhesividad y un pan con 37% más de volumen que el control (Tabla 5.8). En este caso se observó que agregando menor contenido de Pn y mayor contenido de Gox se podía obtener un pan con un poco de menos volumen que en la primera optimización pero con una masa con una adhesividad conveniente para el proceso de elaboración.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

El pan es un alimento de relativamente bajo costo por lo que ocupa una posición de gran importancia en la nutrición mundial y se incluye en la primera y más ancha franja de la nueva pirámide nutricional. Además de ser consumido por toda la población, para los más necesitados es la base de su alimentación diaria.

En la Argentina, mayormente se consume el pan elaborado en las panaderías artesanales y la calidad del mismo depende principalmente de la harina que se utiliza para su elaboración. En muchos casos es necesario utilizar aditivos para mejorar la calidad y la conservación del pan y así responder a las exigencias de los consumidores. Por años, en las panaderías artesanales de la Argentina se utilizó como aditivo el bromato de potasio porque respondía eficazmente en la elaboración del pan con largas fermentaciones. Desde la prohibición del bromato de potasio no se ha conseguido aún un aditivo o una combinación de aditivos que permita reemplazarlo.

Una alternativa que se ha comenzado a utilizar en los últimos años son las enzimas, ya que al ser químicamente proteínas son consideradas naturales y seguras para la salud. En este trabajo se analizó la aplicación de las enzimas transglutaminasa, glucosa oxidasa y pentosanasa sobre la elaboración del pan. En primer lugar se estudió individualmente el efecto de cada enzima sobre la calidad del pan y posteriormente se investigaron químicamente las modificaciones introducidas por cada una de ellas para así poder explicar su acción.

La enzima pentosanasa causó un efecto positivo sobre la calidad del pan, ya que aumentó significativamente el volumen específico y disminuyó la firmeza y masticabilidad de la miga. Estos efectos se debieron a varias modificaciones que fueron introducidas por la enzima en la compleja mezcla de componentes que constituyen al pan. La enzima pentosanasa hidrolizó los enlaces  $\beta$ -1,4 entre las xilosas que componen la cadena principal de los pentosanos aumentando así el contenido de pentosanos solubles en agua. El menor tamaño de los pentosanos causó cambios en las interacciones principalmente entre las proteínas del gluten modificando la solubilidad de las gliadinas y de las gluteninas, la formación de los puentes disulfuro y la redistribución del agua desde los pentosanos hacia el gluten. La red de proteínas que constituyen al macropolímero de gluteninas presentó

bajos valores de  $G'$  y  $G''$  indicando la formación de un gel de proteínas menos elástico y más viscoso. Esto también fue corroborado mediante el análisis de la microestructura de la masa, en las cuales se observó que la estructura de la red de gluten fue más abierta con un mayor número y tamaño de poros y con fibras proteicas poco continuas. Las propiedades reológicas de la masa resultante indicaron la formación de una masa más viscosa con baja resistencia a la extensión y elevada extensibilidad. Los pentosanos de menor tamaño, debido a la acción de la enzima Pn, se reubicaron en las interfaces de las celdas de gas entre la matriz proteína-almidón y el  $\text{CO}_2$  mejorando la capacidad de expansión de los alveolos sin que ocurran pérdidas de gas y permitiendo una mayor expansión de la masa durante la fermentación. En resumen la enzima pentosanasa causó la hidrólisis de pentosanos de gran tamaño lo que modificó las interacciones principalmente entre las gliadinas y promovió la formación de una masa más viscosa y extensible mejorando la capacidad de retención del  $\text{CO}_2$  y consecuentemente la calidad del pan.

El agregado de una alta concentración de glucosa oxidasa en la formulación del pan causó una disminución del volumen específico. A pesar del bajo volumen desarrollado en estos panes, no se observó un efecto negativo de la enzima sobre la firmeza y masticabilidad de la miga. La enzima glucosa oxidasa promovió la formación de puentes disulfuro y enlaces ditirosina entre las proteínas constituyendo una red de proteínas fuerte y cerrada. Su efecto fue principalmente sobre las albuminas, globulinas y gluteninas de alto peso molecular. Estos resultados fueron corroborados por medio de la disminución de grupos sulfhidrilo libres de las proteínas, el aumento del contenido del macropolímero de gluteninas y por la presencia de agregados de gran tamaño en las electroforesis de las proteínas. La red de proteínas del macropolímero de gluteninas presentó elevados valores de  $G'$  y  $G''$  indicando la formación de un gel de proteínas fuerte y elástico. Mediante microscopía electrónica de barrido se observó la formación de una matriz proteica cerrada con fibras de gluten gruesas. El efecto oxidante de la enzima causó la formación de una masa altamente resistente a la extensión por lo que la presión del  $\text{CO}_2$  producto de la acción de las levaduras no fue suficiente

para expandir la masa durante la fermentación. La baja calidad del pan obtenido por el agregado de glucosa oxidasa pudo deberse principalmente a que las harinas producidas en Argentina son de muy buena calidad, con un elevado contenido de proteínas. Por lo que el efecto oxidante de la enzima conduce a la formación de una masa excesivamente tenaz que impide obtener un elevado volumen de pan. El uso de la enzima glucosa oxidasa en harinas de menor calidad y en bajas dosis o en combinación con otras enzimas sería una buena alternativa para mejorar la calidad de los productos obtenidos a partir de ella.

La enzima transglutaminasa disminuyó el volumen específico del pan cuando las dosis utilizadas fueron elevadas. También se observó un deterioro en las características texturales de la miga ya que los panes presentaron una elevada firmeza y masticabilidad. Esta enzima promovió la formación de enlaces isopeptídicos entre residuos de glutamina y lisina de las proteínas de la harina. Estos nuevos enlaces isopeptídicos permitieron la formación de grandes agregados proteicos que quedaron retenidos en el gel stacking de las electroforesis. Sin embargo los entrecruzamientos causaron cambios estructurales de las proteínas modificando las interacciones que se establecen entre ellas como son las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y puentes de hidrógeno que tienen un importante rol en la estructura de la masa. Por lo tanto la enzima transglutaminasa aumentó el tamaño de los agregados proteicos pero contrariamente a lo esperado aumentó también la solubilidad de las proteínas en SDS y en consecuencia se observó una disminución del contenido del macropolímero de gluteninas. A medida que se incrementó la dosis de transglutaminasa el macropolímero de gluteninas pasó de ser un gel débil a una solución macromolecular entrelazada. Los enlaces introducidos por la enzima transglutaminasa causaron la formación de una red proteica de diferente naturaleza a aquella formada mediante puentes disulfuro y como consecuencia la masa fue menos extensible. La transglutaminasa posee una elevada capacidad de formar agregados pero esta polimerización no conduce necesariamente a mejores propiedades de la masa. La enzima transglutaminasa causó efectos marcados sobre las propiedades de la masa y la calidad del pan. Las masas resultantes

fueron altamente resistentes a la extensión, tenaces, poco extensibles por lo que los panes resultantes tuvieron bajo volumen y mala calidad.

La elaboración del pan mediante la tecnología de masas congeladas permite brindar al consumidor un producto fresco y recién horneado. Sin embargo, cuando las masas son congeladas y almacenadas durante tiempos prolongados sufren deterioro de la calidad. Uno de los principales motivos de la pérdida de calidad se debe a la disminución de la capacidad del gluten de retener CO<sub>2</sub>. Por lo que el uso de enzimas que mejoren las características de la red de gluten permitió mitigar el deterioro causado por el congelamiento. Se estudió el efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa sobre la calidad de los panes y las masas elaboradas mediante la metodología de masas congeladas.

El congelamiento y almacenamiento en estado congelado de las masas causó un deterioro de la calidad del pan elaborado con las enzimas, sin embargo la calidad de los mismos fue mejor que el control (sin enzima). La enzima pentosanasa permitió obtener panes con mayor volumen y menor firmeza que el control después de 9 semanas de almacenamiento de las masas a -18 °C. Sin embargo los panes con pentosanasa tuvieron un mayor porcentaje de deterioro que el control. Este efecto se debió a que la enzima disminuyó el tamaño de los pentosanos dejando un mayor porcentaje de agua libre con la que se formaron un mayor número de cristales y/o cristales de gran tamaño que dañaron la red de gluten. Las propiedades reológicas de las masas fueron modificadas debido al almacenamiento durante 9 semanas a -18 °C. Las masas con pentosanasa que fueron congeladas presentaron una elevada adhesividad y extensibilidad lo que dificultó mucho su maleabilidad.

La enzima glucosa oxidasa fue la enzima que mitigó en mayor medida el deterioro debido al congelamiento de la masa. Después de 9 semanas de almacenamiento de las masas a -18 °C, altas dosis de la enzima glucosa oxidasa permitieron obtener panes con mayor volumen específico y menor firmeza que el control. El porcentaje de deterioro debido al almacenamiento en estado congelado también fue menor al del control por lo que estos resultados indicaron que el incremento de la fuerza de la masa por acción de la enzima contrarresta, al menos

parcialmente, el daño causado la red de gluten. Las masas elaboradas con alto contenido de glucosa oxidasa presentaron una disminución de la resistencia a la extensión y un incremento de la extensibilidad con el aumento del tiempo de almacenamiento en estado congelado. A pesar del deterioro observado debido al congelamiento, esta enzima permitió mitigar el daño, ya que las masas presentaron mayores valores de resistencia que la masa control (sin enzima). El efecto oxidante de la enzima glucosa oxidasa mitigó el deterioro de la red gluten causado por los cristales de hielo y por las sustancias reductoras (glutati6n) liberadas por las células de levaduras muertas durante el congelamiento de las masas de pan.

Por último, el efecto de la transglutaminasa en masas congeladas fue dependiente de la dosis de enzima utilizada para la elaboración de las masas de pan. Sólo la dosis intermedia de enzima tuvo mayor volumen específico de pan y menor firmeza que el control (sin enzima) al cabo de las 9 semanas de almacenamiento a -18 °C mitigando el deterioro. La enzima trasglutaminasa induce la formación de polímeros de alto peso molecular, modificando la elasticidad y la fuerza de la masa, esto permitió contrarrestar la depolimerización del gluten debido a las sustancias reductoras liberadas por las levaduras durante el congelamiento y al daño mecánico ocasionado por los cristales de hielo. Las masas elaboradas con elevadas dosis de transglutaminasa tuvieron el menor porcentaje de disminución del módulo elástico debido al efecto del congelamiento mitigando el deterioro de la red proteica.

Generalmente para la elaboración del pan no se utiliza un solo aditivo si no una mezcla de ellos. Se buscó entonces optimizar la formulación usando las enzimas como aditivos. No se utilizó la enzima transglutaminasa debido a que las modificaciones que introduce en la red de gluten le causan la pérdida irreversible de la extensibilidad impidiendo la expansión de las piezas de pan durante la fermentación. La optimización de la formulación se realizó utilizando pentosanasa, glucosa oxidasa y  $\alpha$ -amilasa. En este caso se utilizó  $\alpha$ -amilasa porque es rutinariamente agregada en todas las formulaciones para elaborar pan. Se obtuvieron dos combinaciones de enzimas dependiendo de los parámetros que se

preferieron optimizar. En la primera optimización se buscó maximizar el volumen de pan y la uniformidad de la miga, y minimizar la firmeza y masticabilidad de la miga. Una combinación de dosis intermedias de glucosa oxidasa, pentosanasa y  $\alpha$ -amilasa permitió obtener un pan de muy buena calidad. Las enzimas pentosanasa y  $\alpha$ -amilasa contribuyeron principalmente en aumentar el volumen específico del pan y disminuir la firmeza y masticabilidad, mientras que la enzima glucosa oxidasa contribuyó principalmente en la uniformidad de la miga. Para la segunda optimización además de mejorar las propiedades antes mencionadas se buscó también minimizar la adhesividad de la masa con el objetivo de evitar inconvenientes durante el proceso industrial de elaboración del pan. El agregado de un mayor contenido de glucosa oxidasa y un menor contenido de pentosanasa en la formulación permitió obtener un pan con un poco de menos volumen que en la primera optimización pero con una masa con una adhesividad conveniente para el proceso de elaboración.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- AACC. American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC. Ninth Edition. The Association. USA.
- Addo K, Pomeranz Y. 1991. Lipid binding and fatty acid distribution in flour, dough and baked and steamed bread. *Cereal Chemistry*, 68: 570–572.
- Ahmed S, Jones FR. 1990. A review of particulate reinforcement theories for polymer composites. *Journal of Materials Science*, 25: 4933–4942.
- Alexandre MC, Popineau Y, Viroben G, Chiarello M, Leion A, Guegen J. 1993. Wheat  $\gamma$ -gliadin as a substrate for bovine plasma factor XII. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 2208-2214.
- Allen WG. 1999. Alternative oxidants as dough conditioners. *Cereal Food World*, 44: 642-649.
- 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.
- Amemiya JI, Menjivar JA. 1992. Comparison of small and large deformation measurement to characterize the rheology of wheat flour dough. *Journal Food Engineering*, 16: 91-108.
- Anderson OD, Greene FC, Yip RE, Halford NG, Shewry PR, Malpica-Romero JM. 1989. Nucleotide sequence of two highmolecular- weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cultivar Cheyenne. *Nucleic Acids Research*, 17: 461-462.
- Andrews JL, Hay RL, Skerritt JH, Sutton KH. 1994. HPLC and immunoassay-based glutenin subunit analysis: screening for dough properties in wheats grown under different environmental conditions. *Journal of Cereal Science*, 20: 203–215.
- Angioloni A, Balestra F, Pinnavaia GG, Dalla Rosa M. 2008. Small and large deformation tests for the evaluation of frozen dough viscoelastic behavior. *Journal of Food Engineering*, 87: 527–531
- Armero E, Collar C. 1998. Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives. *Journal of Cereal Science*, 28:165-174.
- Atwell WA. 1998. Method for reducing syruing in refrigerated doughs. Patent Application WO 97/26794.

- 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, Sinda E. 1992. Frozen doughs: Rheological changes and yeast viability. *Cereal Chemistry*, 69: 409 - 413.
- Autio K, Kruus K, Knaapila A, Gerber N, Flander L, Buchert J. 2005. Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53:1039-1045.
- Bak P, Nielsen IL, Thogersen HC, Poulsen CH. 2000. A method for testing the strengthening effect of oxidative enzyme in dough. *Special Publication: Royal Society of Chemistry*. Vol 212, *Wheat Structure, Biochemistry and Functionally*, pp. 361-367.
- 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 (4): 1054–1059.
- Barrett F. 1975. Role of bread in international nutrition. *Cereal Foods World*, 20: 323
- Basman A, Koksel H, Ng PKW. 2002. Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. *European Food Research Technology*, 215: 419-424.
- Bauer N, Koehler P, Wieser H, Schieberle P. 2003. Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. II. Rheological properties. *Cereal Chemistry*, 80:787-790.
- Belitz H, Grosch W. 1999. Polysaccharides. En: *Food Chemistry, Second Edition*. Editado por Belitz H, Grosch W. Springer, Germany. 237-318.
- Belton PS, Colquhoun IJ, Grant A, Wellner N, Field JM, Shewry PR, Tatham AS. 1995. FTIR and NMR studies of a highMr Subunit of glutenin. *International Journal of Biological Macromolecules* 17: 74–80.
- Belton P. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 29:103-107.

- Belton PS. 2005. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 41: 203–211
- Berglund PT, Shelton DR. 1993. Effect of frozen storage duration on firming properties of breads baked from frozen doughs. *Cereal Foods World*, 38: 89–90, 92–93.
- BetcheL W. 1955. A review of bread staling research. *Cereal Chemistry*, 13:108-121.
- Bettge AD, Morris CF. 2000 Relationships among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry*, 77: 241-247.
- Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M, Kluepfel D. 1997. Endobeta-1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, 57: 151–166.
- Bietz J. 1979. Recent advances in the isolation and characterization of cereal protein. *Cereal Foods World*, 24:199-207.
- Bietz J, Wall J. 1980. Identity of high molecular weight gliadin and ethanol-soluble glutenin subunits of wheat: relation to gluten structure. *Cereal Chemistry*, 57:415-421.
- Biliaderis CG, Izydorczyk MS, Rattan O. 1995. Effect of arabinoxylans on bread-making quality of wheat flours. *Food Chemistry*, 5: 165–171.
- Bonet A, Rosell CM, Caballero PA, Gómez M, Pérez-Munuera I, Lluch. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 99:408-415.
- Bottomley R, Kearns H, Schofield J. 1982. Characterization of wheat flour and gluten proteins using buffers containing sodium dodecyl sulphate. *Journal of Science of Food Agriculture*, 33: 481-491.
- Bourne MC. 1978. Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7): 62–66.
- Bowles LK. 1996. Amylolytic enzymes. In Hebeda RE, Zobel HF (Eds.). *Baked goods freshness: Technology, evaluation and inhibition of staling*. New York, NY: Marcel Dekker. 105-129.
- Bushuk W, MacRitchie F. 1987. Wheat proteins: aspect of structure that are related to breadmaking quality. En: *Protein Quality and Effects of Processing*. Editado por Phillips R, Finley J. Marcel Dekker, USA. 357-361.

- Caballero PA, Gomez M, Rosell CM. 2006. Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *European Food Research and Technology*, 224 (5): 525-534.
- Caballero PA, Gómez M, Rosell CM. 2007. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of Food Engineering*, 81: 42–53.
- Cauvain SP. 1998. Improving the control of staling in frozen bakery products. *Food Science and Technology*, 9: 56-61.
- Cauvain SP, Young LS. 2000. *Bakery Food Manufacture y Quality: Water Control and Effects*, Oxford, Blackwell Science.
- Cauvain SP. 2004. How much more bread research do we need. *Getreidetechnologie*, 58: 364-366.
- Cauvain SP. 2007. Dough retarding and freezing. En: Cauvain SP, Young LS, editores. *Technology of breadmaking*, 2ª ed. New York: Springer. 175–205.
- Carr NO, Daniels NWR, Frazier PJ. 1992. Lipid interactions in breadmaking. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 31: 237-258.
- Chen CH, Bushuk W, 1970. Nature of proteins in Triticale and its parental species I. Solubility characteristics and amino-acid composition of endosperm proteins. *Canadian Journal of Plant Science*, 50: 9-14.
- Chung OK. 1986. Lipid-protein interactions in wheat flour, dough, gluten, and protein fractions. *Cereal Food World*, 31: 242-256.
- C.I.E. 1986. *Colorimetrie*, 2nd. ed. Publication C.I.E. N° 15, 2. Viena: Central Bureau of the Comisión Internationale de L´Eclairage.
- Civille GV, Szczesniak AS. 1973. Guidelines to training a textura profile panel. *Journal of Texture Studies*, 4: 204-223.
- Colot V, Bartels D, Thompson R, Flavell R. 1989. Molecular characterization of an active wheat MW glutenin gene and its relation to other wheat and barley prolamin genes. *Molecular and General Genetics*, 216:81-90.
- Cornec M, Popineau Y, Lefebvre J. 1994. Characterisation of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *Journal of Cereal Science*, 19: 131–139.

- Cornish GB, Bekes F, Allen HM, Martin DJ. 2001. Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52:1339–1348.
- 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, Gelders GG, Delcour JA. 2001. The use of two endoxylanases with different substrate selectivity provides insight into the functionality of arabinoxylans in wheat flour breadmaking. *Cereal Chemistry*, 78: 564–571.
- Courtin CW, Delcour JA. 2001. Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-noextractable arabinixylan. *Journal of Cereal Science*, 35: 301-312.
- Courtin CM, Delcour JA. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, 35: 225–243.
- Courtin CM and Delcour JA. 2005. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat processing. *International Wheat Quality Conference*. St. Paul, USA: AACC, Inc. 123-146.
- Coutinho PM, Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- Crowe NL, Rasper VF. 1988. The ability of chlorine and chlorine-related oxidants to induce oxidative gelation in wheat flour pentosans. *Journal of Cereal Science*, 7: 283–294.
- Cuniberti M. 2004. Propuesta de clasificación del Trigo Argentino. *IDIA INTA*, 6: 21-25.
- Decock P, Cappelle S. 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science and Technology*, 16 (1–3), 113–120.
- 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.

- Dragsdorf RD, Varriano-Marston E. 1980. Bread-staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with  $\alpha$ -amylases from different sources. *Cereal Chemistry*, 57: 310–314.
- Drapron R, Godon B. 1987. Role of enzymes in baking. In Kruger JE, Lineback D, and Stauffer CE (Eds.). *Enzymes and their role in cereal technology*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. 281–324.
- Don C, Lichtendonk WJ, Plijter JJ, Hamer RJ. 2003a. Glutenin macropolymer: a gel formed by particles. *Journal of Cereal Science*, 37: 1–7.
- Don C, Lichtendonk WJ, Plijter JJ, Hamer RJ. 2003b. Understanding the link between GMP and dough: from glutenin particles in flour towards developed dough. *Journal of Cereal Science*, 38: 157–165.
- Don C, Lichtendonk WJ, Plijter JJ, Hamer RJ. 2003c. Glutenin macropolymer is a gel formed by particles: average particle size determines the gel rigidity. In: Dickinson E, van Vliet T. (Eds.), *Food Colloids—Biopolymers and Materials 2002*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 275–281.
- Don C, Lookhart G, Naeem H, MacRitchie F, Hamer RJ. 2005. Heat stress and genotype affect the glutenin particles of the glutenin macropolymer-gel fraction. *Journal of Cereal Science*, 42: 69-80.
- Dornez E, Gebruers K, Cuyvers S, Delcour JA, Courtin CM. 2007. Impact of wheat flour-associated endoxylanases on arabinoxylan in dough after mixing and resting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7149-7155.
- Dunnewind B, van Vliet T, Orsel R. 2002. Effect of oxidative enzymes on bulk rheological properties of wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*, 36: 357–366.
- 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.
- El-Hady EA, El-Samahy SK, Seibel W, Brümmer JM. 1996. Changes in Gas Production and Retention in Non-Prefermented Frozen Wheat Doughs. 1996. *Cereal Chemistry*, 73(4):472-477.

- El-Hady EA, El-Samahy SK, Brümmer JM. 1999. Effect of oxidants, sodium-stearoyl-2-lactylate and their mixtures on rheological and baking properties of nonprefermented frozen doughs. *Lebensmittel. Wissenschaft Technologie*, 32: 446–454.
- Eliasson A, Gudmundsson M. 1996. Starch: Physicochemical and functional aspects. En: *Carbohydrates in Food*. Editado por Eliasson A, Marcel Dekker, USA. 431-503.
- Eliasson A, Larsson K. 1993a. Bread. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson A, Larsson K. Marcel Dekker, USA. 325-363.
- Eliasson A, Larsson K. 1993b. A molecular colloidal approach. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson A, Larson K. Marcel Dekker, USA. 376.
- Every D, Gerrard J, Gilpin M, Ross M, Newberry M. 1998. Staling in starch bread: The effect of gluten additions on specific loaf volume and firming rate. *Starch/Stärke*, 50(10): 443–446.
- Ewart JAD. 1989. Hypothesis for how linear glutenin holds gas in dough. *Food Chemistry*, 32 (2): 135-150.
- Ewart JAD. 1979. Glutenin structure protein complex in wheat flour responsible for dough viscoelasticity. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 30: 482 – 492
- Ewart JAD. 1979. Glutenin structure. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 23: 687-699.
- Faridi H, Faubion JM. 1990. Dough rheology and baked product texture. New York City, NY: Avi Books. 1–3, 356–358.
- Fausch H, Ku" ndig W, Neukom H. 1963. Ferulic acid as a component of a glycoprotein from wheat flour. *Nature*, 199 - 287.
- Fessas D, Schiraldi A. 2003. Interactions between arabinoxylans and wheat proteins. *Food Chemistry*.
- Figueroa-Espinoza MC, Rouau X. 1998. Oxidative crosslinking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal Chemistry*, 75: 259–265.
- Finney KF, Barmore MA. 1948. Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. *Cereal Chemistry*, 25: 291-312.

- Fu-min Ma, Zhang Wang, Shi-ying Xu, Rong-rong Lu. 2009. The interaction between water-insoluble pentosan and gluten of the whole wheat. *European Food Research and Technology*, 229 (2): 231-238.
- 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.
- Gerrard JA, Fayle SE, Wilson AJ, Newberry MP, Ross M, Kavale S. 1998. Dough properties and crumb strength as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63: 472-475.
- Gerrard JA, Newberry MP, Ross M, Wilson AJ, Fayle SE, Kavale S. 2000. Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 65: 312–314.
- Gerrard JA, Fayle SE, Brown PA, Sutton KH, Simmonds GL, Rasiah I. 2001. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. *Journal of Food Science*, 66:782-786.
- Giannou V, Kessoglou V, Tzia C. 2003. Qualita` and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends in Food Science and Technology*, 14: 99–108.
- Giannou V, Tzia C. 2007. Frozen dough bread: quality and textural behaviour during prolonged storage – prediction of final product characteristics. *Journal of Food Engineering*, 79 (3): 929–934.
- Gil MJ, Callejo MJ, Rodriguez G, Ruiz MV. 1999. Keeping qualites of white pan bread upon storage. Effect of selected enzymes on bread firmnes and elasticity. *Z. Lebensmittel Untersuchung Forschung*, 208: 394-399.
- Graveland A, Bongers P, Bosveld P. 1979. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 30:71-84.
- Graveland A. 1980. Extraction of wheat proteins with sodium dodecyl sulphate. *Annales de Technologie Agricole*, 29: 113-123.
- Graveland A, Bosveld P, Lichtendonk WJ, Moonen JHE. 1980. Superoxide involvement in the reduction of disulfide bonds of wheat gel proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93: 1189–1195.

- Graveland A, Bosveld P, Lichtendorf W, Marseille J, Moonen J, Scheepstra A. 1985. A model for the molecular structure of the glutenins from wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 3: 1-16.
- Gray JA, BeMiller JN. 2003. Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 1–20.
- Graybosch RA, Peterson CJ, Moore KJ, Stearns M and Grant DL. 1993. Comparative effects of wheat flour protein, lipid and pentosan composition in relation to baking and milling quality. *Cereal Chemistry*, 70: 95–101.
- Greenwood C. 1976. Starch. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 1. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereal Chemists. USA. 119-157.
- Grosch W, Wieser H. 1999. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science*, 29: 1–16.
- Gruppen H, Komelink FJM, Voragen AGJ. 1993. Water unextractable cell wall material from wheat flour. III. A structural model for arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 19: 111–128.
- Gujral HS, Rosell CM. 2004. Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Research International*, 37: 75–81.
- Gudmundsson M, Eliasson AC, Bengtson S, Aman P. 1991. The effects of water-soluble arabinoxylan on gelatinization and retrogradation of starch. *Starch / Stärke*, 43: 5–10.
- Gupta RB, Singh NK, Shepherd KW. 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 57–64.
- Gupta RB, Shepherd KW. 1990. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutelin. I. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 65–74.
- Gupta RB, Khan K, MacRitchie F. 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science*, 17: 23-41.

- Gupta RB, Paul JG, Cornish GB, Palmer GA, Bekes F, Rathjen AJ. 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *Journal of Cereal Science*, 19: 9–17.
- 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. *Patente USA*, 4,990,343.
- Haarasilta S, Pullinen T. 1992. Novel enzyme combination. A new tool to improve baking results. *Agro-Food-Industry Hi-Tech. Italy*, 3:12-13.
- Hamer RJ, van Vliet T. 2000. Understanding the structure and properties of gluten: an overview. In: Shewry PR, Tatham AS. (Eds.), *Wheat Gluten—Proceedings of the 7th International Workshop Gluten*, Royal Society of Chemistry, Cambridge. 125–131.
- Hanft F, Koeler P. 2006. Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 86:1699-1704.
- Haros M, Rosell CM, Benedito C. 2002. Improvement of flour quality through carbohydrases treatment during wheat tempering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4126-4130.
- Hashimoto S, Shogren M, Pomeranz Y. 1987. Cereal pentosans: estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. *Cereal Chemistry*, 64:30-34.
- Havet M, Mankai M, Le Bail A. 2000. Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough. *Journal of Food Engineering*, 45: 139–145.
- He H, Hoseney RC. 1990. Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. *Cereal Chemistry*, 67: 603–605.
- 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.

- Hoseneý RC. 1994a. Structure of Cereal. En: Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists, USA. 1-27.
- Hoseneý RC. 1994b. Rheology of doughs and batters. En: Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists, USA. 213-228.
- Hoseneý RC. 1994c. Gluten proteins. En: Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists, USA. 197-211.
- Hoseneý RC. 1994d. Dry Milling of Cereal. En: Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition. Editado por Hoseneý, C. American Association of Cereal Chemists, USA. 125-145.
- Hoseneý RC, Sievert D, Delcour JA. 2008. Bread and other baked products. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, in the press. doi: 10.1002/14356007.a04\_331.
- Hsu K, Hoseneý RC, Seib P. 1979. Frozen dough. II. Effects of freezing and storing conditions on the stability of yeasted doughs. *Cereal Chemistry*, 56:424-426
- Huang WN, Yuan YL, Kim YS, Chung OK. 2008. Effects of Transglutaminase on Rheology, Microstructure, and Baking Properties of Frozen Dough. *Cereal Chemistry*, 85(3):301–306
- Hug-Iten S, Handschin S, Conde-Petit B, Escher F. 1999. Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 32: 255–260.
- Humphris ADL, McMaster TJ, Miles MJ, Gilbert SM, Shewry PR , Tatham AS. 2000. Atomic force microscopy (AFM) study of interaction of HMW subunits of wheat glutenin. *Cereal Chemistry*. 77:107-110.
- Inoue Y, Bushuk W. 1991. Studies on frozen doughs. I. Effects of frozen storage and freeze-thaw cycles on baking and rheological properties. *Cereal Chemistry*. 68: 627-631.
- Inoue Y, Bushuk W. 1992. Studies on frozen doughs. II. Flour quality requirements for bread production from frozen dough. *Cereal Chemistry*, 69: 423–428.

- Inoue Y, Sapirstein H, Takayanagi S, Bushuk W. 1994. Studies on frozen doughs. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. *Cereal Chemistry*, 71: 118-121.
- Izydorczyk MS, Biliaderis CG, Bushuk W. 1990. Oxidative gelation studies of water-soluble pentosans from wheat. *Journal of Cereal Science*, 11:153-169.
- Jackson EA, Holt LM, Payne PI. 1983. Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 66: 29–37.
- Jeffrey GA, Saenger W. 1994. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, Berlin.
- Jeffries TW. 1996. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Current Opinions in Biotechnology*, 7: 337–342.
- Jiang Z, Li X, Yang S, Li L, Tan S. 2005. Improvement of the bread making quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*. *Food Research International*, 38:37-43.
- Jiang Z, Le Bail A, Wu A. 2008. Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. *Journal of Cereal Science*, 47: 172–179.
- Jiménez T, Martínez-Anaya MA. 2001. Amylases and hemicellulases in breadmaking, degradation by-products and potential relationship with functionality. *Food Science and Technology International*, 7 (1):5–14.
- Johnson RH, Welch EA. 1968. Baked goods dough and method. US Patent Application US, 3: 368-903.
- Joshi P, Brimelow C. 2002. Colour measurement of food by colour reflectance. En *Colour in food*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, LLC. Editado por Douglas B. MacDougall.
- Kamman PW. 1970. Factors affecting the grain and texture of white bread. *Bakers Digest*, 44(2): 34–38.

- Kasarda DD, Bernardin J, Nimmo C. 1976. Wheat proteins. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 1. Ed. Pomeranz Y, American Association of Cereal Chemists. USA. 158-236.
- Kasarda DD. 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. En: *Wheat is Unique*. Ed. Pomeranz Y, American Association of Cereal Chemistry, St Paul, MN. 277–302.
- Kasarda DD. 1999. 'Glutenin Polymers: The in Vitro to in Vivo Transition. *Cereal Food World*, 44: 566–571.
- Kenny S, Wehrle K, Dennehy T, Arendt E. 1999. Correlations between empirical and fundamental rheology measurements and baking performance of frozen bread dough. *Cereal Chemistry*, 76: 421– 425.
- Khatkar BS, Fido RJ, Tatham AS, Schofield JD. 2002. Functional properties of wheat gliadins. II. Effects on dynamic rheological properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 35: 307- 313.
- Khan K, Bushuk W. 1979. Studies of glutenin. XII. Comparison of SDS-PAGE of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chemistry*, 56:63-68.
- Kim SK, D'Appolonia BL. (1977a). Bread staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread and bread staling rate. *Cereal Chemistry*, 54: 225–229.
- Kim SK, D'Appolonia BL. (1977b). Effect of pentosans on the retrogradation of wheat starch gels. *Cereal Chemistry*, 54: 150–160.
- Kim YS, Huang W, Dub G, Pan Z, Chung O. 2008. Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. *Food Research International*.
- Kline L, Sugihara T. 1968. Factors affecting the stability of frozen bread doughs. I. Prepared by straight dough method. *Baker's Dig*, 42(5):44-50.
- Koh B-K, Ng PKW. 2009. Effects of Ferulic Acid and Transglutaminase on Hard Wheat Flour Dough and Bread. *Cereal Chemistry*. 86(1):18–22.
- Krueger BR, Knutson CA, Inglett GE and 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. *CRC 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.
- Larré C, Deshayes G, Lefebvre J, Popineau Y. 1998. Hydrated gluten modified by a transglutaminase. *Nahrung*, 42:155-157.
- Larré C, Denery-Papini S, Popineau Y, Deshayes G, Desserre C, Lefebvre J. 2000. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 77:121-127.
- Laurikainen T, Härkönen H, Autio K, Poutanen K. 1998. Effects of enzymes in fibre-enriched baking. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 76, 239–249.
- Larroque O, Gianibelli M, Gómez Sánchez M, MacRitchie F. 2000. Procedure for obtaining stable extracts of cereal flour and whole meal for size-exclusion HPLC analysis. *Cereal Chemistry*, 77:448-450.
- Le Bail A, Grinand C, Le Cleach S, Martinez S, Quilin E. 1999. Influence of storage conditions on frozen French bread dough. *Journal of Food Engineering*, 39, 289–291.
- Lee MR, Swanson BG, Baik BK. 2001. Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*, 78:701-706.
- Lefebvre J, Popineau Y, Deshayes G, Lavenant L. 2000. Temperature-induced changes in the dynamic rheological behaviour and size distribution of polymeric proteins for glutes from wheat near isogenic lines differing in HMW-GS composition. *Cereal Chemistry*, 77: 193-201.
- Lefebvre J, van Vliet T. 2003. Physico-chemical aspects of gluten proteins. *Progress in Biotechnology*, 23: 94–102.
- Lefebvre J, Pruska-Kedzior A, Kedzior Z, Lavenant L. 2003. A phenomenological analysis of wheat gluten viscoelastic response in retardation and in dynamic experiments over a large time scale. *Journal of Cereal Science*, 38: 257–267.

- León AE, Durán E, de Barber BC. 1997. 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. 2002. Utilization of enzyme mixtures to retard bread crumb staling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6): 1416–1419.
- 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, Republica Argentina.
- Lindahl L. 1990. Rheological properties in wheat flour systems. Molecular and interfacial basis. Thesis Doctoral. Lund University, Sweden.
- Lindsay M, Skerritt J. 1999 The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 10:247-253.
- Lindsay MP, Skerritt JH. 2000. Immunocytochemical localization of gluten proteins uncovers structural organization of glutenin macropolymer. *Cereal Chemistry*, 77: 360–369.
- Losche IK. 1995. The world of ingredients. En: *Enzymes in Baking*. 22-25.
- Mackenzie JK. 1950. The elastic constants of a solid containing spherical holes. *Proceedings of the Physical Society*, 63B: 2–11.
- MacKey J. 1975. The boundaries and subdivision of the genus *Triticum*. *Int. Bot. Congr.*, 12<sup>th</sup>, 2: 509.
- MacRitchie F. 1981. Flour lipids: Theoretical aspects and functional properties. *Cereal Chemistry*, 58: 156-158.
- Martin ML, Zeleznak KJ, Hosney RC. 1991. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. *Cereal Chemistry*, 68: 498–503.
- Martínez-Anaya MA, Jiménez T. 1997a. Functionality of enzyme that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 205:209-214.

- Martínez-Anaya MA, Jiménez T. 1997b. Rheological properties of enzyme supplemented doughs. *Journal of Texture Studies*, 28: 569–583.
- Martínez-Anaya MA, Jiménez T. 1998. Physical properties of enzyme supplemented doughs and relationship to bread quality parameters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 206:134-142.
- Masi P, Cavella S, Sepe M. 1998. Characterization of dynamic viscoelastic behavior of wheat flour doughs at different moisture content. *Cereal Chemistry*, 75:428-432.
- Matuda TG, Parra DF, Lugão AB, Tadini CC. 2005. Influence of vegetable shortening and emulsifiers on the unfrozen water content and textural properties of frozen French bread dough. *LWT – Food Science and Technology*, 38: 275–280.
- Matz SA. 1995. *The chemistry and technology of cereals as food and feed*. AVI Books.
- Matz S. 1999. Ingredients from wheat. En: *Bakery Technology and Engineering*, 3<sup>o</sup> Edition. Editado por Matz S. Pan-Tech Internarional, USA. 1-21.
- McCleary BV, Gibson TS, Allen H, Gams TC. 1986. Enzymic hydrolysis and industrial importance of barley-glucans and wheat flour pentosans. *Starch/Stärke*, 38, 433–437.
- Medina-Rodríguez CL, Torres P, Martínez-Bustos F, Ramirez-Wong B, Paredes-López O and Castaño-Tostado E. 2009. Effect of Microbial Transglutaminase on Dough Proteins of Hard and Soft (*Triticum aestivium*) and Durum (*Triticum durum*) Wheat Cultivars *Cereal Chemistry*, 86(2):127–132.
- Metakovskii EV, Wrigley CW, Bekes F, Gupta RB. 1990. Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41: 289–306.
- Meuser F, Suckow P. 1986. *Chemistry and physics of baking*. Ed. Blanshard MV, Frazier PJ, Galliard T. The Royal Society of Chemistry, London. 42-61.
- Miller KA, Hosenev RC. 1999. Effect of oxidation on the dynamic rheological properties of wheat flour- water dough. *Cereal Chemistry*, 76:100-104.

- Min BC, Yoon SH, Kim JW, Lee YW, Kim YB, Park KH. 1998. Cloning of novel maltooligosaccharide-producing amylases as antistaling agents for bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 779–782.
- Morrison WR, Law RV, Snape CE. 1993. Evidence for inclusion complexes of lipids with V-amylase in maize, rice and oat starches. *Journal of Cereal Science*, 18: 107–109.
- Motoki M, Seguro K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 204-210.
- Mujoo R, Ng PKW. 2003. Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 80: 703-706.
- Ng P, Bushuk W. 1987. Glutenin of marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 64:324-327.
- Nicolas Y, Paques M, Ende van den D, Dhont JKG, Polanen van RC, Knaebel A, Steyer A, Munch JP, Blijdestein TBJ, Aken van GA. 2003. *Food Hydrocolloids*, 17: 907–913.
- Nielson PM. 1995. Reaction and potential industrial applications of transglutaminase – review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9:119-156.
- Oates CG. 2001. Bread microstructure. En: *Bread staling*. Ed. Chinachoti and Vodovotz. Boca Raton, USA: CRC. 149–162.
- Olesen T, Qi Si J, Donelyan V. 1994. Use of lipase in baking. *International Patent Application WO 94/04035*.
- Orth RA, Bushuk W. 1972. A comparative study of proteins of wheats of diverse baking quality. *Cereal Chemistry*, 49: 268-275.
- Osborne TB, Vorhees CG. 1893. The proteins of the wheat kernel. *Journal of the American Chemical Society*, 15: 392-471.
- Osborne TB. 1907. Proteins of the wheat kernel. *Publication of the Carnegie Institution Washington*, 84:1-119.

- Ottenhof MA, Farhat IA. 2004. The effect of gluten on the retrogradation of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 40 (3): 269-274.
- 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.
- Payne PI, Corfield KG. 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta*, 145: 83–88.
- Payne PI, Nightingale MA, Krattiger AF, Holt LM. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality in British-grown wheat varieties. *Journal of Food Science and Agriculture*, 40: 51–65.
- Peighambardoust SH, van der Goot AJ, Hamer RJ, Boom RM. 2005. Effect of simple shear on the physical properties of glutenin macro polymer (GMP). *Journal of Cereal Science*, 42: 59-68.
- Perlin AS. 1951a. Isolation and composition of the soluble pentosans of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 28: 370–381.
- Perlin AS. 1951b. Structure of the soluble pentosans of wheat flours. *Cereal Chemistry*, 28: 282–393.
- Perron CE, Lukow OM, Bushuk W, Townley-Smith F. 1999. The blending potential of diverse wheat cultivars in a frozen dough system. *Cereal Foods World*, 44(9): 667–672.
- Pezolet M, Bononfant S, Dousseau F, Popineau Y. 1992. Conformation of wheat gluten proteins. Comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 299: 247–250.
- Phimolsiripol Y, Siripatrawan U, Tulyathan V, Cleland JD. 2008. Effects of freezing and temperature fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality. *Journal of Food Engineering*, 84: 48-56.
- Pitts EG, Rafalski JA, Hedgecoth C. 1988. Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of a genomic gene region for a low molecular weight glutenin. *Nucleic Acids Research*, 16:11376.

- Pogna N, Redaelli R, Dachkevitch A, Dal Belin Peruffo A. 1994. Genetics of wheat quality and its improvement by conventional and biotechnological breeding. En: *Wheat Production, Properties and Quality*. Editado por Bushuk W, Rasper V. Chapman Hall. USA. 205 - 224.
- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577–591.
- Popineau Y, Bonenfant S, Cornec M, Pezolet M. 1994. A study by infrared spectroscopy of the conformations of gluten proteins differing in their gliadin and glutenin composition. *Journal of Cereal Science*, 20:15-20.
- Poulsen C, Hostrup BP. 1998. Purification and characterization of a hexose oxidase with excellent strengthening effects in bread. *Cereal Chemistry*, 75: 51–57.
- 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.
- Primo-Martin C, Wang M, Lichtendonk WJ, Plijter J, Hamer RJ. 2005. An explanation for the combined effect of xylanase and glucose oxidase in dough systems. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 85: 1186 –1196.
- Pritchard PE. 1993. The glutenin fraction (gel-protein) of wheat protein - a new tool in the prediction of baking quality. *Aspects of Applied Biology*, 36: 75-84.
- Pyler EJ. 1988. *Baking Science and Technology*. Vol. I-II. 3° ed. Sosland Pub Co, Kansas MO, USA. 1–1369.
- Rasiah IA, Suttom 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.
- Ribotta PD, León AE, Añón MC. 2001. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2): 913–918.
- Ribotta PD, León AE, Añón MC. 2003. Effect of yeast freezing in frozen dough. *Cereal Chemistry*, 80: 454-458.

- Ribotta PD, Ausar SF, Morcillo MH, Perez GT, Beltramo DM, Leon AE. 2004. Production of gluten-free bread using soybean flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1969-1974.
- Rojas J, Rosell C, Benedito de Barber C, Pérez-Manuera I, Lluch M. 2000. The baking process of wheat rolls followed by cryo-scanning electron microscopy. *European Food Research Technology*, 212: 57-63.
- Rouau X, El-Hayek ML, Moreau D. 1994. Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. *Journal of Cereal Science*, 19: 259–272.
- 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.
- Sandstedt R. 1961. The function of starch in the baking of bread. *Baker's Dig.* 35: 36-41.
- Sapirstein H, Roller R, Bushuk W. 1994. Instrumental measurement of bread crumb grain by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 71:383-391.
- Schofield JD. 1994. WHEAT Production, Properties and Quality. Ed. Bushuk W, Rasper VF. 1° ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK. 73–99.
- 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.
- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K. 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. 2006. *Journal of Cereal Science*, 43: 152–159
- Shah AR, Shah RK, Madamwar D. 2005. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, 97: 2047-2053.
- Sharadanant R, Khan K. 2003. Effect of Hydrophilic Gums on the Quality of Frozen Dough: II. Bread Characteristics. *Cereal Chemistry*. 80(6):773 –780.
- Shewry PR, Tatham AS, Forde J, Kreis M, Mifflin BJ. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science*, 4: 97–106.

- Shewry PR, Tatham AS. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemical Journal*, 267: 1–12.
- Shewry PR, Halford NG, Tatham AS. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 15: 105–120.
- Shewry PR, Tatham AS. 1997. 'Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins' in *Journal of Cereal Science*, 25: 207–227
- Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat Project. *Trend in Food Science & Technology*, 11: 433 - 441.
- Shewry PR, Halford NG, Tatham AS, Popineau Y, Lafiandra D, Belton PS. 2003. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Advances in Food and Nutritional Research*, 45: 219–301.
- Singh N, Shepherd K, Langridge P, Gruen L. 1991. Purification and biochemical characterization of triticin, a legume-like protein in wheat endosperm. *Journal of Cereal Science*, 13:207-220.
- Singh H. 1991. Modification of food protein by covalent cross-linking. *Trends Food science and Technology*, 8: 196-200.
- Skerit JH, Luch H, Bekes F. 1999. Depolymerization of the glutenin macropolymer during dough mixing: I. Changes in levels, molecular weight distribution, and overall composition. *Cereal Chemistry*, 76: 395-401.
- Skovmand B, Fox P, Villareal R. 1984. Triticale in commercial agriculture: Progress and promise. *Advances in Agronomy*, 37: 1-45.
- Stauffer CE. 2007. Principles of Dough Formation. En: *Technology of Breadmaking*, 2° ed. Springer US. 309-310.
- Steffe JF. 1996. *Rheological methods in food processing engineering*. 2° ed. Freeman Press, MI.
- Shibamura K, Takeda Y, Hizukuri S, Shibata S. 1994. Molecular structures of some wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, 25: 111–116.
- Tan J, Zhang H, Gao X. 1997. SEM image processing for food structure analysis. *Journal of Texture Studies*, 28: 657–672.

- Tatham AS, Shewry PR. 1985. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$  and  $\omega$ -gliadins. *Journal of Cereal Science*. 3: 104–113.
- Tatham AS, Field JM, Smith SJ, Shewry PR. 1987. The conformations of wheat gluten proteins. II. Aggregated gliadins and low molecular subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 5:203-214.
- Tatham A. 1995. The structures of wheat protein. En: *Wheat Structure. Biochemistry and Funcctionality*. Editado por Schofield, Journal Royal society of Chemistry, England. 53-63.
- Tilley KA, Benjamin RE, Bagorogoza KE, Moses Okot-Kotber B, Praskash O, Kwen H. 2001. Tyrosine cross-links: Molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2627-2632.
- Thompson RD, Bartels D, Harberd NP. 1985. Nucleotide sequence of a gene from chromosome 1D of wheat encoding a HMW glutenin subunit. *Nucleic Acids Research*, 13: 6833-6846.
- Thomson NH, Miles MJ, Popineau Y, Harries J, Shewry PR, Tatham AS. 1999. Small angle X-ray scattering of wheat seed storage proteins:  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, and  $\omega$ -gliadins and the high molecular weight (HMW) subunits of glutenin. *Biochim. Biophys. Acta* 1430: 359-366.
- Torquato S. 1998. Morphology and effective properties of disordered heterogeneous media. *International Journal of Solids and Structures*, 35: 2385–2406.
- Torquato S. 2000. Modeling of physical properties of composite materials. *International Journal of Solids and Structures*, 37: 411–422.
- van Oort M, van Straaten F, Laane C. 1995. Pentosans and pentosanases in bread-making. *International Food Ingredients*, 2:23-27
- van Vliet T. 1999. Factors determining small-deformation behavior of gel. En: *Food Emulsions and Foam Interfaces, Interactions and Stability*. Ed. Dickinson E and Rodríguez Patino JW. R. Soc. Chem.: Cambridge, UK. 307-317

- VardaKou M, Katapodis P, Samiotaki M, Ketos D, Panayotou G, Christakopoulos P. 2003. Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water un-extractable arabinoxylan. *International journal of biological macromolecules* 33: 129-134.
- Varriano-Marston E, Hsu KH, Mahdi J. 1980. Rheological and structural changes in frozen dough. *Baker's Digest*, 54: 32–34.
- 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.
- Veraverbeke WS, Delcour JA. 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42: 179–208.
- Vinkx CJA, Van Nieuwenhove CG, Delcour JA. 1991. Physicochemical and functional properties of rye non-starch polysaccharides. III. Oxidative gelation of a fraction containing water-soluble pentosans and proteins. *Cereal Chemistry*, 68: 617–622.
- Wang FC, Sun XS. 2002. Frequency dependence of viscoelastic properties of bread crumb and relation to bread staling. *Cereal Chemistry*, 79(1): 108–114.
- Wang 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, 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.
- Wang R, Zhou W, Yu HH, Chow WF. 2006. Effects of green tea extract on the quality of bread made from unfrozen and frozen dough processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 857–864.
- Warren WE, Kraynik AM. 1997. Linear elastic behavior of a low-density Kelvin foam with open cells. *Journal of Applied Mechanics*, 64: 787–794.

- Weegels PL, Marseille JP, de Jager AM, Hamer RJ. 1990. Structure - Function relationships of gluten protein. Ed. Bushuk W, Tkachuk R. AACC, Inc., USA. 98-111.
- Weegels P, van der Pijpekamp A, Graveland A, Harmer R, Schofield J. 1996. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Journal of Cereal Science*, 23:103-111.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. 1996. Functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 23, 1-17.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. 1997. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. II. Changes in composition. *Journal of Cereal Science*, 25, 155-163.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. 1997. Functional properties of low Mr wheat proteins. III. Effects on composition of the glutenin macropolymer during dough mixing and resting. *Journal of Cereal Science*, 25, 165-173.
- Wellner N, Mills EN, 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.
- Whilster R, Daniel J. 1984. Molecular structure of Starch. En: *Starch Chemistry and Technology*. Ed. Whilster R, BeMiller J, Paschal E. Academic Press. NY. EUA. 153-182.
- Wieser H, Mödl A, Seilmeier W, Belitz H. 1987. HPLC of gliadins from different wheat varieties: amino acid composition and N-terminal amino acid sequence of components. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. A*, 185:371-378.
- Wieser H. 2003. The use of redox agents. In: Cauvain, S.P. (Ed.), *Bread Making—Improving Quality*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, pp. 424–446.
- Wieser H. 2006. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*.
- Wolt MJ, D'Appolonia BL. 1984a. Factors involved in the stability of frozen dough. I. The influence of yeast reducing compounds on frozen dough stability. *Cereal Chemistry*. 61: 209-212.

- Wolt MJ, D'Appolonia BL. 1984b. Factors involved in the stability of frozen dough. II. The effect of yeast type, flour type, and dough additives on frozen-dough stability. *Cereal Chemistry*, 61: 213-221.
- Wrigley C, Andrews J, Bekes F, Gras P, Gupta R, MacRitchie F, Skerritt J. 1998. Protein-protein interactions-essential to dough rheology. En: *Interactions: The Keys to Cereal Quality*. Ed. Hamer R, Hoseney R. American Association of Cereal Chemists, USA. 18-20.
- Xu J, Bietz JA, Carriere CJ. 2007. Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. *Food Chemistry*, 101: 1025–1030
- Yi J, Kerr WL. 2009. Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1474–1483.
- Zghal MC, Scanlon MG, Sapirstein HD. 1999. Prediction of bread crumb density by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 76: 734–742.
- Zghal M, Scanlon M, Sapirstein H. 2001. Effects of flour strength, baking absorption, and processing conditions on the structure and mechanical properties of bread crumb. *Cereal Chemistry*, 78(1): 1–7.