



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
**Departamento de Ciencias Biológicas**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**EFEECTO DE DISTINTOS EMULSIFICANTES SOBRE  
LA MICROESTRUCTURA DE LA MASA Y SU  
RELACIÓN CON LA CALIDAD DE PRODUCTOS DE  
PANIFICACIÓN**

---

Analía Verónica Gómez

**Directora**

Dra. María Cecilia Puppo

**Codirectora**

Dra. María Cristina Añón

Año 2011

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET) bajo la dirección de la Dra. María Cecilia Puppo y la codirección de la Dra. María Cristina Añón.

*“... Recuerda que cualquier momento es bueno para comenzar  
y que ninguno es tan terrible para claudicar.  
No olvides que la causa de tu presente es tu pasado,  
así como la causa de tu futuro es tu presente.  
Aprende de los audaces, de los fuertes, de quien no acepta situaciones,  
de quien vivirá a pesar de todo.  
Piensa menos en tus problemas y más en tu trabajo,  
y tus problemas sin alimentarlos morirán.  
Aprende a nacer desde el dolor y a ser más grande  
que el más grande de los obstáculos...”*

*Fragmento del Poema “No culpes a nadie”*

*Pablo Neruda*

*Quisiera dedicar la presente Tesis a mi familia. A mi madre, por su amor, comprensión y apoyo incondicional durante todos estos años. A mi hermana, por estar siempre a mi lado y compartir toda una vida juntas. Y a la memoria de mi padre, por haberme transmitido los valores que me han formado como persona y por enseñarme a no bajar los brazos nunca, aún en los momentos más difíciles.*

## **AGRADECIMIENTOS**

---

*A mis directoras de Tesis, **Dra. María Cecilia Puppo** y **Dra. María Cristina Añón**, excelentes personas quienes a lo largo de estos años han confiado en mí y me han dado la oportunidad de realizar mi doctorado. Gracias por guiarme, acompañarme y transmitirme todos sus conocimientos. Y especialmente gracias por apoyarme y aconsejarme más allá del ámbito profesional.*

*A la **Dra. Evelina G. Ferrer** por el aporte de sus conocimientos en la realización, elaboración e interpretación de los resultados de los ensayos de espectroscopía RAMAN.*

*A la **Dra. Carmen Cecilia Tadini** por recibirme con las puertas abiertas en el Laboratório de Engenharia de Alimentos de la Universidad de San Pablo (Brasil). Gracias por el cariño brindado y por hacerme sentir como en “casa”.*

*A la **Dra. Cristina Ferrero** por su calidad humana y por su constante predisposición. Gracias por su colaboración con este trabajo de Tesis y por su aporte invaluable a mi formación académica.*

*A la **Universidad Nacional de La Plata** y al **Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)**, por haberme abierto sus puertas dándome la posibilidad de realizar mis estudios de postgrado mediante una formación gratuita de excelencia.*

*A las instituciones y entidades que mediante diversos tipos de financiamiento posibilitaron la realización del presente trabajo. Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)**, a la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)** y a la **Universidad Nacional de La Plata (UNLP)**.*

*Al **Molino Campodónico Ltd.** por la donación de la harina de trigo.*

*A **Luciano López Jáuregui**, y por su intermedio a **Molinos Río de la Plata S.A.**, por la donación de los emulsificantes y por habernos permitido hacer uso de sus equipamientos.*

*Al personal de apoyo a la investigación del CIDCA, en especial **Javier, Daniel, Aldo, Diana y Sara** que contribuyeron con su aporte al desarrollo de este trabajo de Tesis.*

*A **mi familia**, por su amor, paciencia y apoyo incondicional. Gracias por estar siempre a mi lado y enseñarme a ser una buena persona.*

*A **Luna y Fidel** por brindarme tanto cariño y llenarme de alegría.*

*A **mis familiares**, los que están cerca y los que están lejos. Por darme siempre palabras de aliento.*

*A mis compañeritas del grupo Trigo: **Jime, Vicky, Nati y Nora** y a mis amigos del CIDCA: **Darío, Vane, Ruth, Sandra y Martín**. A todos gracias por su amistad y por estar a mi lado todos estos años. Por todas las charlas y consejos recibidos, por la compañía, las risas y los llantos! Por ser mis “cables a tierra” en los momentos difíciles.*

*A **Darío y Vane**, nuevamente, por su ayuda y colaboración en la optimización de los gráficos, confección de portada y compaginación de este trabajo de Tesis. Gracias por las largas horas compartidas frente a la PC junto a mí.*

*A todos mis **compañeros del CIDCA**, mis más sinceros agradecimientos.*

*A **Jaqui**, mi amiga del alma. Por estar conmigo en los mejores y peores momentos que me tocaron vivir. Y al Solcito que llegó a su vida, quien ilumina todos los encuentros que compartimos.*

*A mis amigas de la facu: **Iri, Marce, Vir, Caro, Luisa, Vane, Alfon, Vero y Marga**. Porque a pesar de la distancia siempre están presentes.*

*A mis amigas de la pensión: **Tefi, Anto, Juli, Andre, Vero, Cris, Fer y Leila**. Por haberse cruzado en mi camino y llenarme los días de alegría.*

*Y por último, a todos aquellos que no he mencionado anteriormente y que aportaron su granito de arena para que esto hoy fuera posible.*

**MUCHAS GRACIAS!!!**

# ÍNDICE

---



---

<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
Generalidades de trigo y harinas de trigos argentinos.....	2
Legislación Nacional para harinas de trigo .....	3
Principales componentes de la harina .....	4
<i>Almidón</i> .....	4
<i>Proteínas de trigo</i> .....	7
<i>Gluten</i> .....	13
Principales componentes de la masa panaria .....	17
Proceso de panificación .....	19
Envejecimiento del pan.....	21
Incorporación de almidón resistente.....	22
Uso de aditivos en panificación .....	24
Emulsificantes. Aplicaciones en panificación .....	28
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>1.1 Caracterización de la harina.....</b>	<b>38</b>
<b>1.1.1 Humedad.....</b>	<b>38</b>
<b>1.1.2 Gluten.....</b>	<b>38</b>
<b>1.1.3 Contenido Proteico .....</b>	<b>39</b>
<b>1.1.4 Cenizas.....</b>	<b>40</b>
<b>1.1.5 Ensayo Alveográfico.....</b>	<b>41</b>
<b>1.1.6 Ensayo Farinográfico.....</b>	<b>42</b>
<b>1.2 Emulsificantes utilizados.....</b>	<b>44</b>
<b>1.3 Preparación de las muestras de gluten.....</b>	<b>44</b>
<b>1.4 Preparación de las masas .....</b>	<b>45</b>
<b>1.5 Estructura secundaria de las proteínas del gluten.....</b>	<b>45</b>
<b>1.6 Sulfhidrilos libres de las proteínas del gluten .....</b>	<b>48</b>

<b>1.7 Identificación de proteínas totales mediante electroforesis .....</b>	<b>49</b>
<b>1.7.1 Reactivos generales.....</b>	<b>49</b>
<b>1.7.2 Extracción de las proteínas.....</b>	<b>50</b>
<b>1.7.3 Desarrollo.....</b>	<b>51</b>
<b>1.7.4 SDS-PAGE.....</b>	<b>51</b>
<b>1.7.5 NATIVE-PAGE.....</b>	<b>51</b>
<b>1.7.6 2D-SDS-PAGE.....</b>	<b>51</b>
<b>1.7.7 MS-SDS-PAGE.....</b>	<b>52</b>
<b>1.7.8 Coloración.....</b>	<b>53</b>
<b>1.7.9 Obtención de las imágenes y análisis de los geles.....</b>	<b>53</b>
<b>1.8 Análisis de Gliadinas y Gluteninas .....</b>	<b>53</b>
<b>1.8.1 Extracción de Fracciones proteicas .....</b>	<b>54</b>
<b>1.8.2 Separación de Fracciones.....</b>	<b>55</b>
<b>1.9 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....</b>	<b>55</b>
<b>1.10 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....</b>	<b>56</b>
<b>1.10.1 Determinación de la temperatura de transición vítrea (<math>T_g</math>).....</b>	<b>56</b>
<b>1.10.2 Gelatinización y retrogradación del almidón.....</b>	<b>58</b>
<b>1.11 Caracterización Reológica de Masas.....</b>	<b>59</b>
<b>1.11.1 Ensayos Alveográficos y Farinográficos .....</b>	<b>59</b>
<b>1.11.2 Propiedades Texturales de las Masas.....</b>	<b>59</b>
<b>1.12 Evaluación de calidad de los panes .....</b>	<b>68</b>
<b>1.12.1 Curvas de fermentación.....</b>	<b>68</b>
<b>1.12.2 Elaboración de los panes .....</b>	<b>69</b>
<b>1.12.3 Volumen de pan.....</b>	<b>70</b>
<b>1.12.4 Color de la corteza .....</b>	<b>70</b>
<b>1.12.5 Alveolado de la miga.....</b>	<b>71</b>
<b>1.12.6 Textura de la miga.....</b>	<b>73</b>
<b>1.12.7 Humedad de la miga.....</b>	<b>73</b>
<b>1.12.8 Estabilidad de los panes frente al almacenamiento.....</b>	<b>73</b>
<b>1.12.8.1 Textura de la miga.....</b>	<b>74</b>
<b>1.12.8.2 Retención de agua .....</b>	<b>74</b>
<b>1.12.8.3 Retrogradación del almidón.....</b>	<b>74</b>
<b>1.12.8.4 Recristalización de amilosa y amilopectina .....</b>	<b>74</b>
<b>1.13 Formulación de masas con el agregado de almidón resistente.....</b>	<b>75</b>

1.14 Análisis reológico de las masas con almidón resistente .....	76
1.14.1 Ensayos Farinográfico y Alveográfico .....	76
1.14.2 Análisis de Perfil de Textura .....	76
1.14.3 Evaluación de la Extensión Uniaxial.....	77
1.14.4 Ensayos de Viscoelasticidad .....	78
1.14.5 Ensayo de Reofermentación .....	79
1.14.6 Comportamiento térmico de las masas.....	80
1.15 Determinación de la calidad panadera de panes enriquecidos con fibra	80
1.15.1 Volumen específico de pan .....	81
1.15.2 Determinación de humedad de la miga.....	81
1.15.3 Análisis de Firmeza de la miga .....	81
1.16 Análisis estadístico .....	82
1.17 Modelado de Parámetros Reológicos. Modelo cúbico especial y superficie de respuesta .....	82
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>CAPITULO 1 .....</b>	<b>85</b>
<b>Efecto de los emulsificantes sobre la estructura del gluten .....</b>	<b>85</b>
1.1 Microestructura del gluten .....	86
1.2 Agregados proteicos de gluten.....	96
1.3 Composición polipeptídica de agregados proteicos de gluten .....	99
1.4 Gliadinas y Gluteninas presentes en el gluten .....	104
1.5 Microestructura de la red de gluten.....	107
1.6 Transición vítrea del gluten.....	108
1.7 Conclusiones parciales .....	114
<b>CAPITULO 2 .....</b>	<b>116</b>
<b>Efecto de los emulsificantes sobre la estructura y el comportamiento reológico de masas.....</b>	<b>116</b>
2.1 Caracterización de la harina.....	117
2.2 Efecto de los emulsificantes sobre la estructura de masas.....	119
2.2.1 Microestructura de las masas.....	119
2.2.2 Proteínas de las masas.....	121

---

2.3 Efecto de los emulsificantes sobre las propiedades alveográficas y farinográficas.....	129
2.4 Efecto de los emulsificantes sobre las propiedades reológicas de masas .....	134
2.4.1 Textura y relajación de masas .....	134
2.4.2 Viscoelasticidad de masas.....	139
2.5 Conclusiones parciales .....	142
<b>CAPITULO 3.....</b>	<b>144</b>
<b>Efecto de los emulsificantes en panificación .....</b>	<b>144</b>
3.1 Capacidad de expansión de la masa durante la fermentación de masa .....	145
3.2 Calidad de los panes obtenidos.....	146
3.3 Estabilidad de los panes frente al almacenamiento.....	153
3.4 Comportamiento térmico de las masas durante la cocción y almacenamiento. ....	160
3.5 Evaluación del porcentaje de cristalinidad de las migas durante el almacenamiento. ....	165
3.6 Conclusiones parciales .....	168
<b>CAPITULO 4 .....</b>	<b>170</b>
<b>Optimización de una formulación de pan enriquecido en fibra, preparado en planta piloto, utilizando emulsificantes.....</b>	<b>170</b>
4.1 Propiedades reológicas de masas.....	172
4.2 Caracterización reológica de la muestra optimizada .....	182
4.3 Comportamiento térmico de las masas durante la cocción y el almacenamiento .....	186
4.4 Determinación de la calidad panadera .....	190
4.5 Conclusiones parciales .....	191
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>194</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>201</b>

# INTRODUCCION

---

## Generalidades de trigo y harinas de trigos argentinos

Nuestro país es uno de los principales productores de trigo. La cosecha de trigo pan de la campaña 2009/10 fue de 7,5 millones de toneladas. La molienda de trigo pan durante los primeros diez meses de 2010 creció un 3,5% con respecto al mismo período del año 2009, registrando un valor de 5,31 millones de toneladas (Dirección de Mercados Agroalimentarios, MAGyP). En la actualidad, el sector molinero argentino demanda alrededor de 6 millones de toneladas de granos y se espera que en la cosecha 2010/11 se incremente la producción a 13 millones de toneladas (Informe Mensual de Diciembre de 2010 del MAGyP). La producción de trigo pan se concentra en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, que suman en conjunto alrededor del 87 % del total. Sin embargo, en las últimas campañas la producción de trigo pan se ha extendido, y también se cultiva en provincias como Corrientes y Formosa, aunque esto no incrementó el total producido (Tabla 1).

**Tabla 1.** Participación por provincia en la producción de trigo pan.

<b>Campaña</b>	<b>Bs. As.</b>	<b>Santa Fe</b>	<b>Córdoba</b>	<b>E. Ríos</b>	<b>Otras</b>	<b>Total</b>
1996/97	67,71%	15,01%	6,71%	4,19%	6,38%	100%
1997/98	72,05%	10,20%	4,16%	3,94%	9,64%	100%
1998/99	60,42%	15,49%	10,71%	5,07%	8,31%	100%
1999/2000	57,19%	18,00%	12,89%	3,80%	8,13%	100%
2000/2001	61,74%	14,00%	12,11%	3,77%	8,38%	100%
2001/2002	56,60%	13,98%	15,26%	3,44%	10,73%	100%
2002/2003	55,55%	13,42%	14,15%	3,78%	13,10%	100%
2003/2004	62,03%	13,03%	14,34%	4,50%	6,10%	100%
2004/2005	61,52%	10,98%	14,65%	5,03%	7,82%	100%
2005/2006	59,26%	14,69%	13,62%	5,66%	6,77%	100%

Fuente: Dirección de Industria Alimentaria con datos de Estimaciones Agrícolas - SAGPyA.

Durante el año 2009 en Argentina de los 6 millones de toneladas de trigo pan que se molieron se obtuvo alrededor de 3,8 millones de toneladas de harina. Según datos suministrados por la MAGyP, en el período acumulado enero-octubre 2010 se produjo un incremento del 3% en la producción de harina de trigo respecto al mismo

período de 2009. Alrededor del 80% de la producción de esta harina tuvo como destino el mercado interno. El 71,3% se destina para elaborar pan y el 28,7% restante para pastas, galletitas y bizcochos, consumo como harina fraccionada y otros (Figura 1). Del total utilizado para la elaboración de pan, el 71,3% lo consumen las pequeñas y medianas empresas artesanales y sólo el 4,7% las panificadoras industriales en la producción de pan y bollería. El consumo por habitante en los primeros diez meses del año 2010 alcanzó los 7,9 kg/mes, superando en un 5,9% el consumo del mismo período del año 2009 (SAGPyA, 2011).



**Figura 1.** Destino de la harina de trigo en el mercado interno.

## Legislación Nacional para harinas de trigo

Las harinas tipificadas comercialmente como: cuatro ceros (0000), tres ceros (000), dos ceros (00), cero (0), medio cero (medio 0), harinilla de primera y harinilla de segunda, corresponden a los productos que se obtienen de la molienda gradual y metódica del endosperma de trigo en cantidad de 70-80% del grano limpio (CAA, 2004) (Tabla 2).

La harina 000 es la que se utiliza comunmente en la elaboración de panes, ya que su alto contenido de proteínas posibilita la formación de gluten y se consigue un buen leudado sin que las piezas pierdan su forma. La harina 0000 es más refinada y más blanca y es utilizada para la elaboración de pastas y en pastelería.

**Tabla 2.** Parámetros principales de los diferentes tipos de harina.

Harina tipo	Humedad (g/100g)	Cenizas (g/100g)	Absorción (g/100g)	Volumen pan (cm <sup>3</sup> )
	Máximo	Máximo		Mínimo
0000	15,0	0,492	56-62	550
000	15,0	0,650	57-63	520
00	14,7	0,678	58-65	500
0	14,7	0,873	60-67	475
½ 0	14,5	1,350	-	-

## Principales componentes de la harina

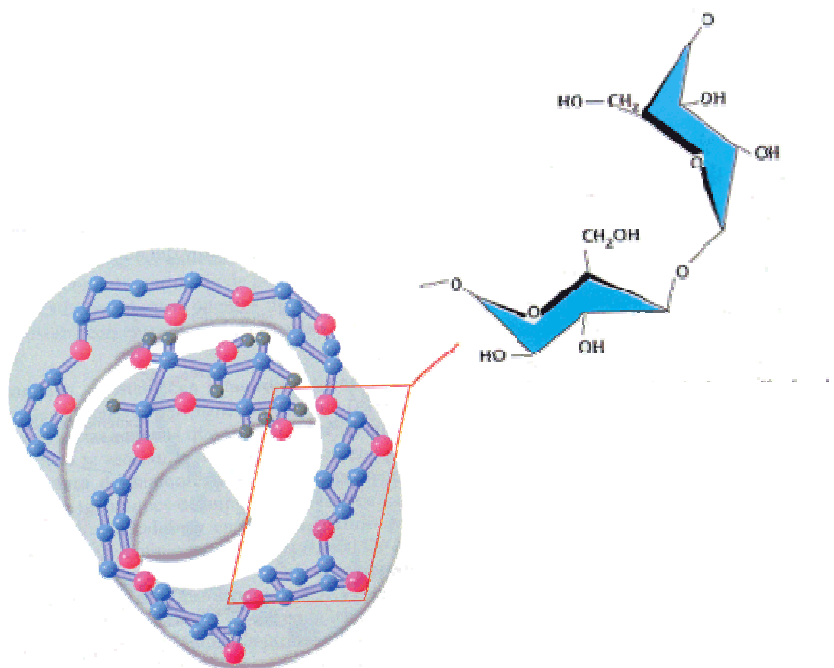
### *Almidón*

Es el carbohidrato mayoritario de la harina de trigo y es extensamente utilizado en la industria alimentaria. Los gránulos de almidón de harina de trigo presentan dos tamaños principales, los pequeños y esféricos (tipo B) de un diámetro menor a 10  $\mu\text{m}$  y los grandes y lenticulares (tipo A) de un diámetro cercano a 20  $\mu\text{m}$  (Prabhasankar y col., 2003). Este polisacárido está compuesto principalmente por polímeros de  $\alpha$ -D-glucanos y pequeñas cantidades de constituyentes no glucídicos: lípidos y proteínas. Los dos carbohidratos de mayor peso molecular que forman parte del almidón son la amilosa y la amilopectina, las cuales están presentes en una relación aproximada de 25:75 (Jane, 2004). La amilosa es un polímero esencialmente lineal, compuesta por 500-6000 unidades de glucosa enlazadas a través de uniones  $\alpha$ -D-1,4 (Figura 2), con escasos puntos de ramificación formados por enlaces  $\alpha$ -D-1,6 (Shibanuma y col., 1994). La conformación espacial que adquiere este polisacárido es de hélice con grupos hidroxilo hacia el exterior y átomos de hidrógeno hacia el interior de la misma, esto le da característica lipofílica al interior de la hélice que le permite asociarse a lípidos formando complejos amilosa-lípido (Figura 3).



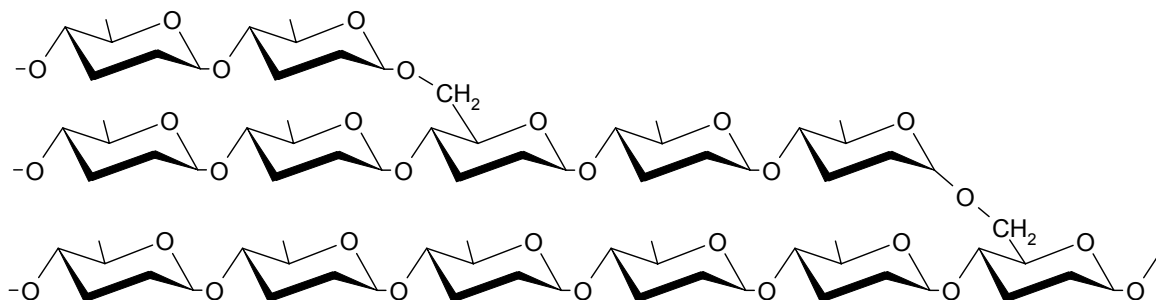


**Figura 2.** Representación esquemática de una molécula de amilosa.



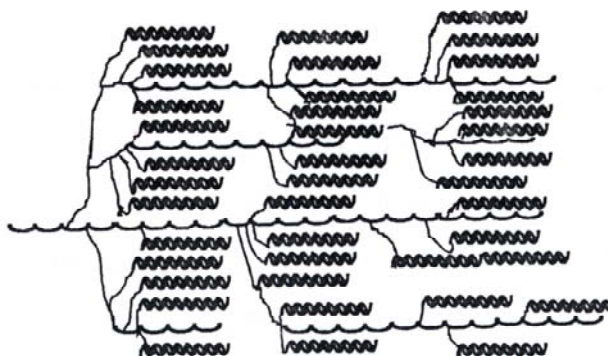
**Figura 3.** Disposición espacial de la molécula de amilosa.

Por su parte, la amilopectina es un polímero ramificado que posee una cadena central similar a la de la amilosa pero con ramificaciones con enlaces  $\alpha$ -D-1,6 cada 9 a 20 unidades de D-glucosa (Whistler y Daniel, 1984) (Figura 4). El enlace  $\alpha$ -D-1,4 imparte a la molécula un giro natural, con lo que la conformación de las cadenas es helicoidal (Greenwood, 1976).



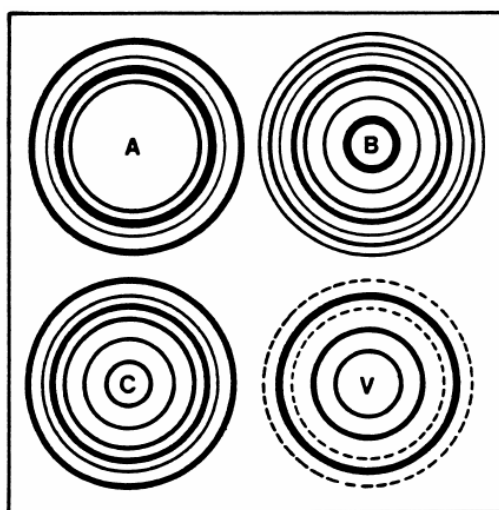
**Figura 4.** Representación esquemática de una molécula de amilopectina.

El modelo actualmente aceptado para la conformación de la amilopectina es en forma de racimo o de “clusters”, que permite explicar la presencia de zonas cristalinas (arreglos de doble hélice) y amorfas (zonas de ramificación densa), con las cadenas de amilosa co-cristalizadas (Figura 5) (Zobel, 1988; Zobel y col., 1988; Imberty y col., 1991; Jovanovich, 1997).



**Figura 5.** Modelo en racimo de la amilopectina

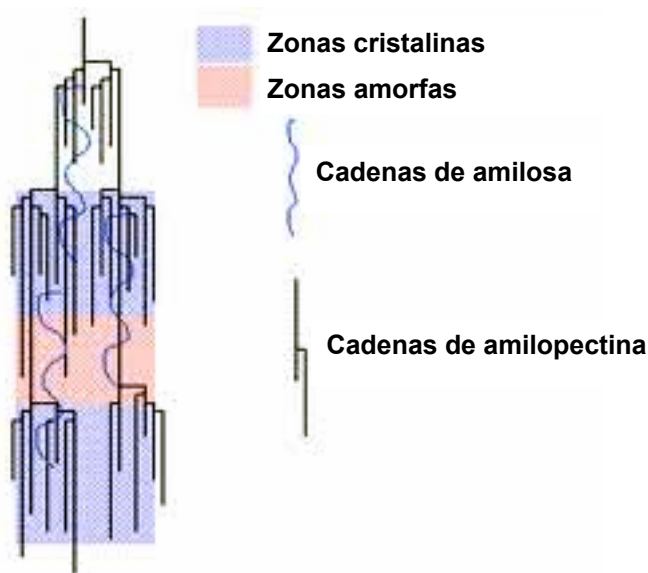
Los gránulos de almidón nativo dan diferentes diagramas de difracción de rayos X, dependiendo del origen botánico. El patrón tipo A corresponde a almidones de cereales (Hayakawa y col., 1997; Abdel-Aal y col., 2002; Yoo y Jane, 2002), el tipo B a almidones de tubérculos y el tipo C a almidones de legumbres (Zobel, 1988; Zobel y col., 1988; Jovanovich, 1997) (Figura 6).



**Figura 6.** Patrones de difracción de rayo X para almidones de cereales (A), tubérculos (B), legumbres (C) y para el complejo amilosa-lípido (V).

La cristalinidad de los gránulos de almidón de cereales es baja (15-30%), por lo que se visualiza al gránulo como una matriz de gel con regiones cristalinas embebidas (Figura 7) (Zobel y col., 1988; Eliasson y Gudmundsson, 1996). La fase amorfa es heterogénea, y consiste en amilosa amorfa y regiones intercristalinas de ramificación densa de amilopectina.

La amilosa posee la capacidad de formar complejos de inclusión con los lípidos que posee la harina. La formación de dichos complejos forma estructuras cristalográficas con un patrón tipo V (Figura 6).



**Figura 7.** Representación de zonas cristalinas y amorfas de amilopectina y amilosa.

### ***Proteínas de trigo***

El 80% de los aspectos de calidad panadera de las harinas se debe a las variaciones producidas en las proteínas que conforman el gluten (Shewry y col., 2001). La cantidad de estas proteínas varía de acuerdo al tipo de trigo, el clima, la época de recolección y la tasa de extracción (rendimiento de molienda).

Las proteínas de trigo han sido objeto de numerosos estudios y constituyen un campo del conocimiento en continua expansión. Los estudios de fraccionamiento de estas proteínas fueron abordados por distintos autores en el siglo pasado y

culminaron en los protocolos de extracción fraccionada propuestos por Osborne (1907) que constituyen la base de la clasificación de las proteínas de los distintos cereales. Este autor dividió las proteínas del grano de trigo en cuatro clases basándose en su solubilidad. Las **albúminas**, solubles en agua; las **globulinas**, solubles en soluciones salinas pero insolubles en agua; las **gliadinas**, solubles en etanol acuoso (concentraciones 60-70%) e insolubles en soluciones acuosas y las **gluteninas**, insolubles en alcoholes y solventes acuosos neutros. Las albúminas y las globulinas cumplen principalmente funciones metabólicas y conforman aproximadamente un 20% de las proteínas totales de la harina de trigo (Singh y MacRitchie, 2001). El 80% restante de las proteínas está formado por las gliadinas y gluteninas, cuya principal función es la de almacenamiento.

El gluten es la red viscoelástica que se obtiene luego de lavar la masa de harina de trigo con agua para remover el almidón y demás componentes solubles. El gluten seco contiene, además de las proteínas, almidón residual (10-15%) y lípidos (Kalichevsky y col., 1992). Las proteínas del gluten están compuestas por:

**GLIADINAS.** Constituyen aproximadamente el 50% de las proteínas de reserva del grano de trigo (Shewry y col., 1986). Son las proteínas responsables de la extensibilidad de la masa y están relacionadas con el comportamiento viscoso de la misma. Son proteínas principalmente monoméricas, con masas moleculares desde 30 hasta 50 kD.

El advenimiento de las técnicas electroforéticas a principio de los años 60 permitió la separación de las distintas fracciones clasificadas en base a su solubilidad. Woychik y col. (1961) clasificaron la fracción de gliadinas en distintos grupos de acuerdo a su movilidad electroforética. Así se las dividió en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  gliadinas, fracciones que a su vez presentan diversos componentes. Las gliadinas son monómeros, algunas poseen puentes disulfuro intracetenarios como las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas, en tanto que en las  $\omega$ -gliadinas estos se encuentran ausentes. Mediante análisis por SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol se observó que las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas presentan pesos moleculares similares, entre 30-45 kD siendo indistinguibles mediante esta técnica (Bietz y Wall, 1972; Ewart, 1973; Kasarda, 1983). Se sabe que las  $\alpha$  y  $\beta$  gliadinas están íntimamente relacionadas en lo que respecta a secuencia de aminoácidos y frecuentemente se incluye a ambos grupos

dentro de las  $\alpha$ -gliadinas (Shewry y Tatham, 1986; Shewry y col., 2001). Las  $\omega$  gliadinas presentan una masa molecular mayor, oscilando entre 50 y 65 kD (Hamauzu y col., 1974). La composición aminoacídica de las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadinas es similar (Tatham y col., 1990), aunque las  $\omega$  gliadinas poseen muy pocos aminoácidos esenciales y prácticamente carecen de metionina y cisteína, son incapaces de formar puentes disulfuro. Estas gliadinas también se caracterizan por tener altos niveles de glutamina (glutamato) (40-50 mol%), prolina (20-30 mol%) y fenilalanina (7-9 mol%) los que representan aproximadamente un 80% del total de los aminoácidos de esta fracción (Wieser, 2007).

Estas proteínas están formadas por un dominio no repetitivo rico en estructura secundaria  $\alpha$ -hélice y por un dominio no repetitivo rico en estructura giros  $\beta$  (Tatham y Shewry, 1985).

Las  $\gamma$  gliadinas se diferencian de las  $\alpha$  y  $\beta$  gliadinas en su contenido en ácido aspártico, prolina, metionina, tirosina, fenilalanina y triptófano. Todas las gliadinas tienen baja cantidad de arginina, lisina y grupos carboxílicos libre como ácido aspártico y glutámico. Los ácidos aspártico y glutámico se encuentran amidados casi en su totalidad (Bietz y col., 1977; Tatham y col., 1990).

Las  $\alpha$  y  $\gamma$  gliadinas constan de 250 a 300 residuos de aminoácidos. Poseen un dominio N-terminal repetitivo que representa entre un tercio y un medio 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 cisteína (Shewry y Tatham, 1990). Las  $\gamma$ -gliadinas poseen ocho residuos de cisteína 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 cisteína ubicados en el mismo dominio que las  $\gamma$ -gliadinas y que forman tres enlaces disulfuro intermoleculares. Estos enlaces disulfuro son importantes ya que favorecen el plegamiento de la estructura proteica de las gliadinas y determinan la naturaleza de las interacciones no covalentes con la red de gluteninas (Wrigley y Bekes, 2002). Las  $\omega$ -gliadinas están formadas por aproximadamente 350 residuos aminoacídicos, dentro de los cuales la Prolina, la Glutamina y la Fenilalanina conforman secuencias repetitivas que representan más del 80% de la composición aminoacídica de estas proteínas. Como se hizo mención anteriormente, las  $\omega$ -gliadinas no contienen

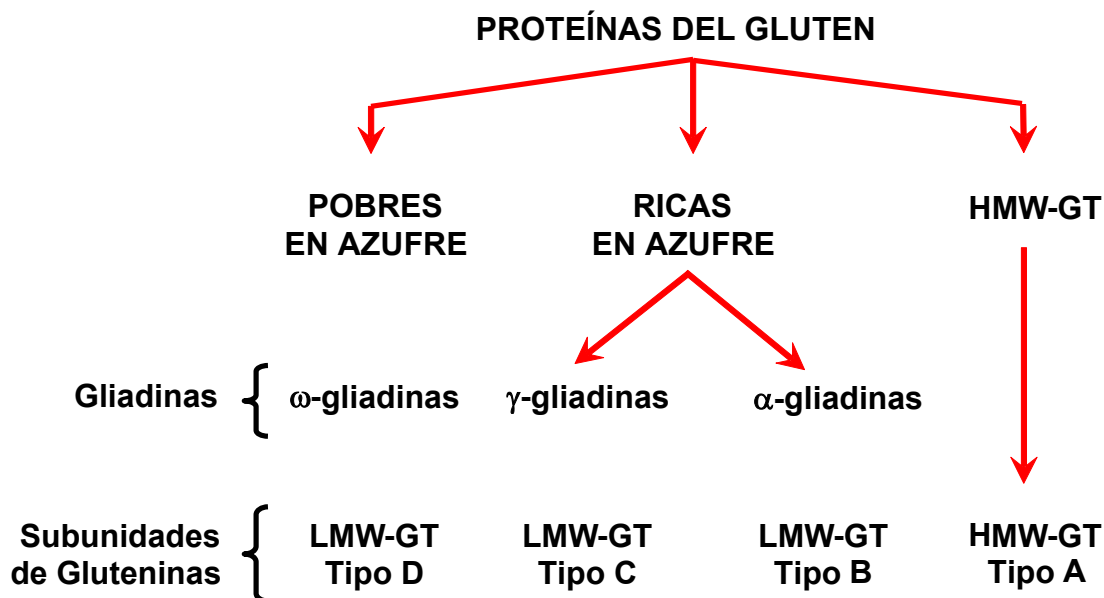
residuos de cisteína, por lo que están limitadas para formar interacciones covalentes en la masa (Tatham y Shewry, 1995).

**GLUTENINAS.** Son las proteínas que proporcionan la fuerza o tenacidad a la masa. También están relacionadas con la elasticidad y el comportamiento sólido de la misma. Son proteínas poliméricas con masas moleculares estimadas mayores a  $10^6$  D (Payne y col., 1980; Wieser y col., 2006).

En el año 1960 con el desarrollo de solventes caotrópicos (urea y detergentes) se pudo ampliar los estudios de las gluteninas que se veían limitados por la baja solubilidad. De esta manera se logró solubilizar hasta un 95% de la totalidad de las proteínas de gluten (Shewry y col., 2001). Mediante electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante en presencia de 2-mercaptoetanol se determinó la presencia de dos tipos principales de componentes, las gluteninas de alto peso molecular (HMW-GT) y las gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GT) (Shewry y col., 1986). Presumiblemente ambas fracciones se encuentran en el trigo agregadas y formando puentes disulfuro intercatenarios, lo que dificulta su extracción en solventes acuosos o etanólicos. Mediante SDS-PAGE se determinó un peso molecular entre 70 y 150 kD para las HMW-GT y de 30-50 kD para las LMW-GT (Bietz y Wall, 1972; Payne y col., 1980). Las subunidades de alto peso molecular forman un 5 a 10% de las gluteninas (Payne, 1986; Wieser, 2007). Las subunidades de bajo peso molecular se asemejan a las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -gliadinas en masa molecular y en secuenciación de aminoácidos, componiendo un 20 a un 30 % del total de las proteínas del gluten (Gupta y col., 1991; Müller y col., 1998; Wieser, 2007). De acuerdo al peso molecular de los polímeros que conforman las gluteninas (aproximadamente veinte millones de Daltons) basado en datos obtenidos por cromatografía de exclusión (Huebner y Wall, 1976), estas proteínas son las que se consideran como las más grandes en la naturaleza y están formadas por mezclas heterogéneas de polímeros unidos por puentes disulfuro pudiéndose luego de romper los mismos, clasificar en cuatro grupos según su movilidad en SDS-PAGE. El grupo A con una masa molecular 80 a 120 kD que corresponde a las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW-GT). El grupo B posee un rango de masas moleculares entre 42 y 51 kD y el grupo C entre 30 a 40 kD y ambos forman parte de las gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GT) (Payne y Corfield, 1979). Finalmente el grupo D, también perteneciente a las LMW-GT es altamente ácido y deriva de las  $\omega$  gliadinas, se ha

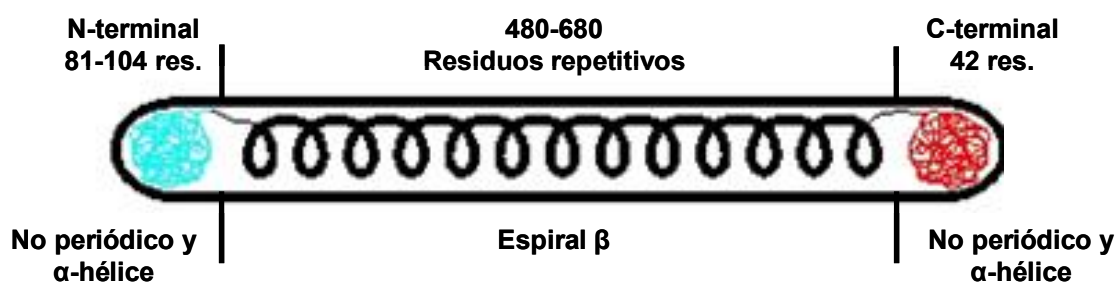
encontrado que el mismo está compuesto por  $\omega$ -gliadinas modificadas que han adquirido residuos de cisteína (Jackson y col., 1983; Masci y col., 1993, 1999; D'Ovidio y Masci, 2004).

En base a las homologías de secuencia aminoacídica Shewry y colaboradores (1986) propusieron un agrupamiento de las proteínas de gluten en: prolaminas ricas en azufre, prolaminas pobres en azufre y gluteninas HMW-GT (Figura 8). Las prolaminas ricas en azufre incluyen a las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas y las gluteninas LMW-GT, las cuales comparten secuencias en común, así como una organización similar con estructura en dominios. Todas presentan varias cisteínas en su secuencia (en regiones no repetitivas), sin embargo en las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas todos los restos sulfhidrilo se encuentran formando puentes disulfuro intracatenarios, mientras que las LMW-GT presentan restos SH libres capaces de formar puentes disulfuro intercatenarios con otras LMW-GT o con las HMW-GT, siendo responsables de sus propiedades de solubilidad (Shewry y Tatham, 1997a). Las  $\omega$ -gliadinas son pobres en azufre pues no presentan cisteína en su composición aminoacídica (Figura 8).



**Figura 8.** Clasificación y nomenclatura de las proteínas que conforman el gluten. HMW-GT: gluteninas de alto peso molecular, LMW-GT: gluteninas de bajo peso molecular.

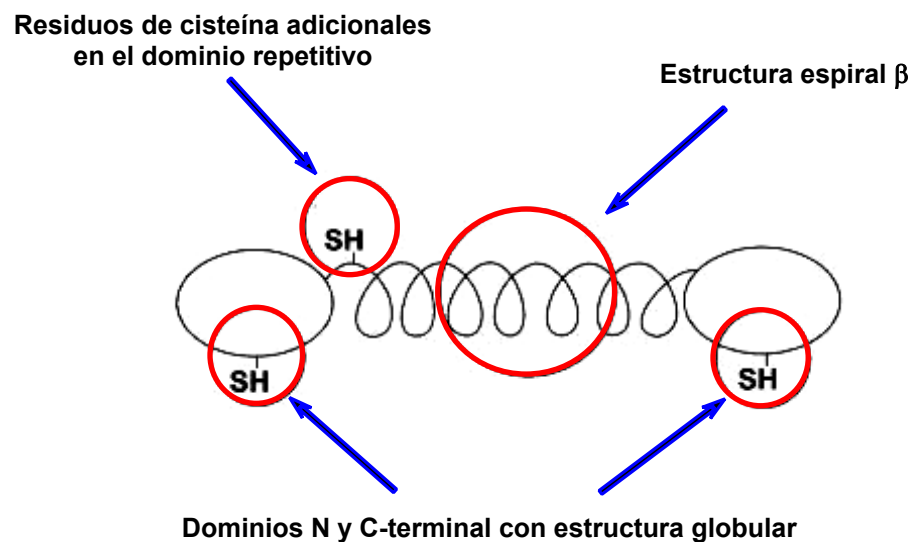
Las gluteninas HMW-GT pertenecen a un tercer grupo que no presenta homología con los anteriores. La agregación y formación de puentes disulfuro intercatenarios es un comportamiento típico de estas proteínas. En la Figura 9 se muestra un modelo estructural basado en datos espectroscópicos detallados por Shewry y col. (2001). Los estudios muestran a las subunidades de gluteninas de alto peso molecular como moléculas alargadas que poseen una estructura espiral  $\beta$  en la región central repetitiva (Goldsbrough y col., 1989; Shewry y Tatham, 1997b; VanDijk y col., 1997a y b) y dos dominios no repetitivos, uno C-terminal y otro N-terminal, el cual presenta el mayor número de cisteínas. Estos residuos proveen de los sitios para la formación de puentes disulfuro intermoleculares. La estructura espiral  $\beta$  de la región central presenta elasticidad intrínseca y es la que conferiría al gluten sus propiedades elásticas (Shewry y col., 2001).



**Figura 9.** Modelo estructural de subunidades de gluteninas HMW-GT basado en estudios predictivos, espectroscópicos e hidrodinámicos (Shewry y col., 2001).

En la Figura 10 se resumen los conocimientos estructurales que se tiene sobre las gluteninas HMW-GT. Las estructuras espiral  $\beta$ , formadas en la región central y estabilizadas por uniones puentes hidrógeno, contribuyen con la elasticidad del gluten. Los residuos de cisteína adicionales en el dominio repetitivo pueden formar puentes disulfuro intercatenarios causando un aumento de la rigidez del polímero. Los dominio N y C-terminal pueden formar puentes disulfuro intercatenarios formando polímeros de HMW-GT con LMW-GT.

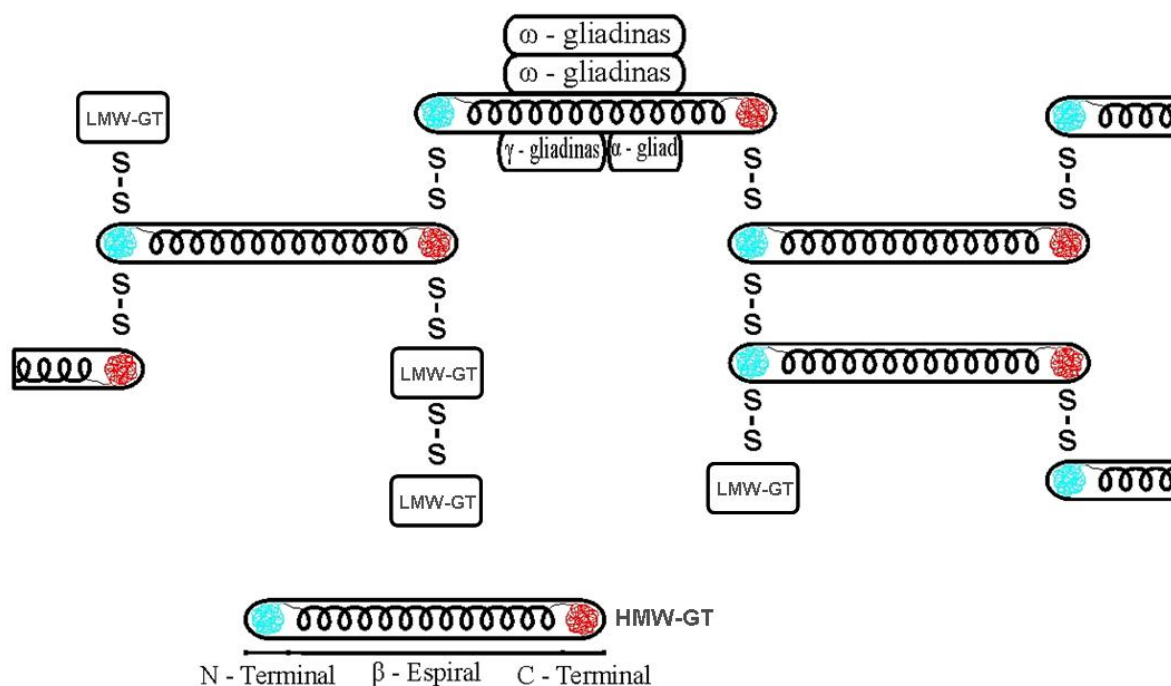




**Figura 10.** Resumen de los conocimientos estructurales de las HMW-GT que pueden determinar la elasticidad del gluten y de la masa (Shewry y col., 2001).

## Gluten

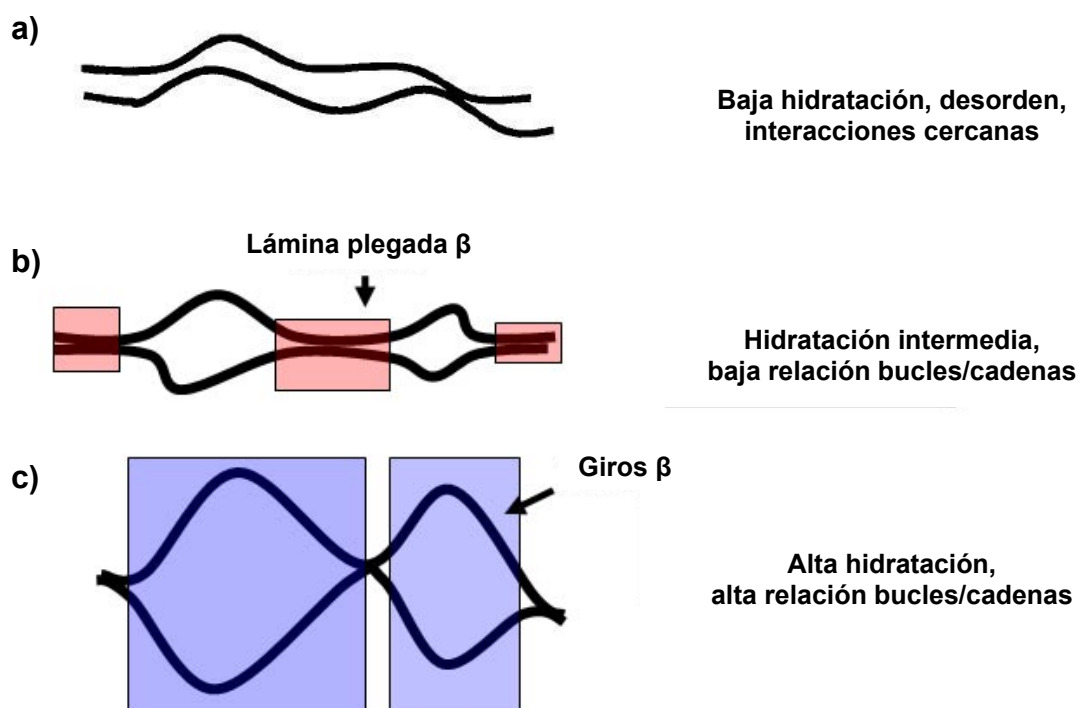
Uno de los modelos estructurales más aceptado para el gluten es el propuesto por Shewry y colaboradores (2001) (Figura 11). Este modelo asigna a las gluteninas HMW el rol de “columna vertebral” de la red proteica, las cuales se encuentran unidas entre sí por uniones puentes disulfuro intermoleculares ubicados en los extremos. A su vez las HMW-GT se unen a las gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GT) también mediante puentes disulfuro formando puntos de ramificación. Esta estructura está estabilizada en gran medida por los puentes disulfuro (intra e intercatenarios) en los extremos de cada subunidad. Estos puentes son los que le otorgan a la masa la tenacidad y elasticidad. Por su parte, las gliadinas interactúan con esta estructura de gluteninas mediante uniones no covalentes, lo cual confiere a la masa las características de extensibilidad (Jeffrey y Saenger, 1994; Belton, 1999; Shewry y col., 2001) (Figura 11).



**Figura 11.** Modelo estructural del gluten. HMW-GT: gluteninas de alta masa molecular, LMW-GT: gluteninas de baja masa molecular.

Popineau y colaboradores (1994) demostraron que en el gluten las cadenas de gluteninas forman estructuras hojas  $\beta$  alineadas en una red extendida de puentes hidrógeno. Posteriormente, Belton (1999) demostró que los puentes hidrógeno generados entre las regiones repetidas de las subunidades de HMW-GT son los que confieren elasticidad a la red de gluten. De acuerdo a los resultados obtenidos en sus investigaciones Belton propuso un modelo para explicar la elasticidad del gluten al cual le dio el nombre de modelo de “bucle y cadena” (“loop and train”). Este modelo propone que en condiciones de baja hidratación se generan numerosas uniones puente hidrógeno entre las estructuras espirales  $\beta$  de las proteínas (Figura 12 a). A medida que los niveles de hidratación aumentan, el sistema es plastificado permitiendo la orientación de los giros  $\beta$  en estructuras espirales  $\beta$  adyacentes para formar estructuras que se asemejan a conformaciones lámina plegada  $\beta$  intercatenarias (Figura 12 b). Un incremento posterior en la hidratación del sistema conlleva a la ruptura de algunos de los puentes hidrógeno intercatenarios con la consecuente formación de enlaces puente hidrógeno entre las proteínas y las moléculas de agua. Este fenómeno da como resultando regiones “bucle”, las cuales

están asociadas a estructuras giros  $\beta$  (Figura 12 c).



**Figura 12.** Modelo “bucle y cadena” (“loop and train”) de Belton (1999). Efecto de la hidratación.

En este modelo las proteínas de gluten están estabilizadas por interacciones no covalentes entre moléculas paralelas. Las HMW-GT inicialmente presentan una conformación en forma de bucle (“loop”) que, al ser sometidas a extensión mecánica, se forman polímeros alineados en los cuales se favorece la formación, en altas proporciones, de conformaciones láminas  $\beta$ . El estiramiento de los polímeros produce primero la deformación de los bucles (“loops”) y posteriormente de las cadenas (“trains”), a la vez que se rompen las interacciones no covalentes. Durante la extensión los puentes disulfuro se rompen y se reestablecen derivando en una red alineada en dirección a la extensión. Sin embargo, puede producirse la restauración del equilibrio de bucles y cadenas espontáneamente, resultando en la relajación de la estructura del polímero (Belton, 1999; Shewry y col., 2001, 2002). Estos modelos estructurales fueron extensamente relacionados con la viscoelasticidad del gluten y con la estabilidad de los polímeros (Belton, 2005; Wellner y col., 2005).

Si bien existen diversos estudios sobre la interacción entre las gliadinas y/o las gluteninas LMW-GT y sus efectos en la panificación, los investigadores han dedicado la mayor parte de sus investigaciones a estudiar principalmente las interacciones existentes entre las gluteninas HMW-GT, a pesar de que sólo representan del 8 al 10 % de las proteínas del gluten (Halford y col., 1992). Con respecto a las gliadinas se sabe que la incorporación de gliadinas totales y de fracciones purificadas de las mismas al gluten disminuye la proporción de entrecruzamiento en la matriz, siendo esta disminución mayor para las fracciones de  $\alpha$  y  $\omega$ -gliadinas (Khatkar y col., 2002b). Estas fracciones mejorarían las propiedades de amasado y cocción de las masas, aunque este comportamiento sería menos pronunciado para las  $\omega$ -gliadinas (Khatkar y col., 2002a). Estos datos sugieren que las gliadinas son capaces de modificar la formación de estructuras lámina plegada  $\beta$  intermoleculares en el polímero de gluten, lo que conlleva a suponer que las mismas actuarían como plastificantes otorgando a la masa su carácter viscoso.

Por otra parte, se ha propuesto que la estructura espiral  $\beta$  de las HMW-GT pueden contribuir con la elasticidad del gluten, aunque es probable que las interacciones puente disulfuro y puente hidrógeno, existentes entre dichas subunidades, también estén involucradas (Belton, 1999; Shewry y col., 1992). Al igual que las interacciones entre las moléculas de gluteninas HMW-GT, las uniones de estas últimas con las LMW-GT también son importantes en la formación de la matriz de gluten. Field y col. (1983) han demostrado que la cantidad de agregados de prolaminas formados durante el amasado correlacionan con la fuerza de la masa, mostrando el rol fundamental que cumplen estos polímeros sobre las propiedades viscoelásticas de la masa.

Además de los enlaces covalentes, las uniones no covalentes entre las proteínas de gluten también son importantes en la determinación de la viscoelasticidad del gluten. Las estructuras lámina plegada  $\beta$ , formadas por los enlaces puente hidrógeno de los dominios repetitivos, proporcionan una fuente de enlaces no covalentes en los polímeros de glutenina, además de los puentes disulfuro. Belton (1999) propuso que este comportamiento contribuiría con las propiedades elásticas de la masa.

## Principales componentes de la masa panaria

Los principales componentes de la masa pan son los siguientes:

- **Harina de trigo:** En la elaboración de productos de panificación tales como pan, cereales para desayuno, pastas y alimentos para bebés, la harina de trigo es la materia prima de principal importancia. Las propiedades únicas de esta harina son debidas a la calidad de sus proteínas (Schofield y Booth, 1983). Estas proteínas pueden sufrir variaciones en función de la variedad, lugar de cultivo, clima y tecnología de molienda. Sus propiedades dependen en gran medida de la capacidad de embeber agua, sin embargo, la mayor parte del agua presente en la masa panaria se encuentra interaccionando con el almidón, el cual constituye las 4/5 parte de la harina. La capacidad de las proteínas de gluten para formar la red viscoelástica está influenciada por el pH de la masa y la actividad proteolítica de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas. Una harina fresca tiene un pH de 6-6,2. El pH óptimo para la panificación es 5, esto significa que las harinas almacenadas son más aptas para la panificación, ya que el almacenamiento acidifica la harina. La viscosidad y elasticidad de la masa dependen principalmente de la cantidad de agua que se agrega, la temperatura a la que se amasa y el tiempo transcurrido desde el amasado.

- **Agua:** Juega un papel fundamental en la formación de la masa, ya que contribuye a la incorporación total de los ingredientes. Hidrata al almidón y permite la formación del gluten, lo cual da como resultado una masa extensible y elástica capaz de retener el CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación.

Tradicionalmente la masa es preparada por la combinación de harina y agua. La distribución e hinchamiento de las partículas de harina luego del mezclado favorece la formación de una matriz de proteínas que retiene el almidón (Campos y col., 1997). Durante el proceso de amasado, la masa aumenta la resistencia a la extensión. Una vez que la misma ha alcanzado su punto óptimo de desarrollo está apta para panificar, ya que en este momento se alcanzan las propiedades reológicas adecuadas (Spies, 1990).

- **Sal:** Actúa principalmente sobre la formación de gluten, ya que las gliadinas tienen menor solubilidad en solución salina, dando lugar a la formación de una mayor cantidad de gluten. Como consecuencia de las fuerzas de atracción electrostáticas que actúan en la red formada en presencia de sal, el gluten obtenido presenta fibras más cortas y es menos elástico, esto conduce a la obtención de una masa más compacta que la elaborada sin sal. Otra de las propiedades de la sal es controlar la actividad de la levadura durante la fermentación. Además, favorece la coloración y las características texturales de los productos horneados. También influye en el estado de conservación de los panes, debido a su capacidad higroscópica (Shiu y Yeh, 2001; Angioloni y Dalla Rosa, 2005; Farahnaky y Hill, 2007).

- **Agentes leudantes:** La levadura biológica más comúnmente utilizada en panificación es la *Saccharomyces cerevisiae* spp. Su función principal es transformar los azúcares en CO<sub>2</sub>, alcohol etílico y energía. Aproximadamente la mitad del peso del azúcar consumido por las levaduras durante la fermentación de la masa es transformado en alcohol. Por su parte, el CO<sub>2</sub> producido en esta etapa se disuelve en la masa en la forma de bicarbonato, lo cual provoca la acidificación de la masa. La acumulación de CO<sub>2</sub> en las burbujas no comienza hasta que la masa está saturada con el bicarbonato generado. La mayor parte del CO<sub>2</sub> (80-100%) y casi la totalidad del etanol generado son retenidos en la matriz de la masa hasta el momento del horneado, instante en el cual la masa manifiesta una expansión de aproximadamente tres veces su volumen (Jackel, 1969). Cerca de la mitad de este incremento es generado por el dióxido de carbono y el resto de la expansión es causada por la evaporación del etanol (Moore y Hosney, 1985). El incremento final de volumen ocurre cuando la masa es colocada en el horno. Este fenómeno es el resultado de un aumento del volumen de las burbujas como consecuencia del incremento de la temperatura; de una disminución en la solubilidad del CO<sub>2</sub> al aumentar la temperatura, de la evaporación del etanol en la masa y de un incremento en la actividad de las enzimas de las levaduras a mayores temperaturas antes de ser inactivadas a alrededor de 40-50°C (Maloney y Foy, 2003). Finalmente el CO<sub>2</sub> generado es retenido por la red de gluten y el resultado final es la obtención de un pan con una miga esponjosa.

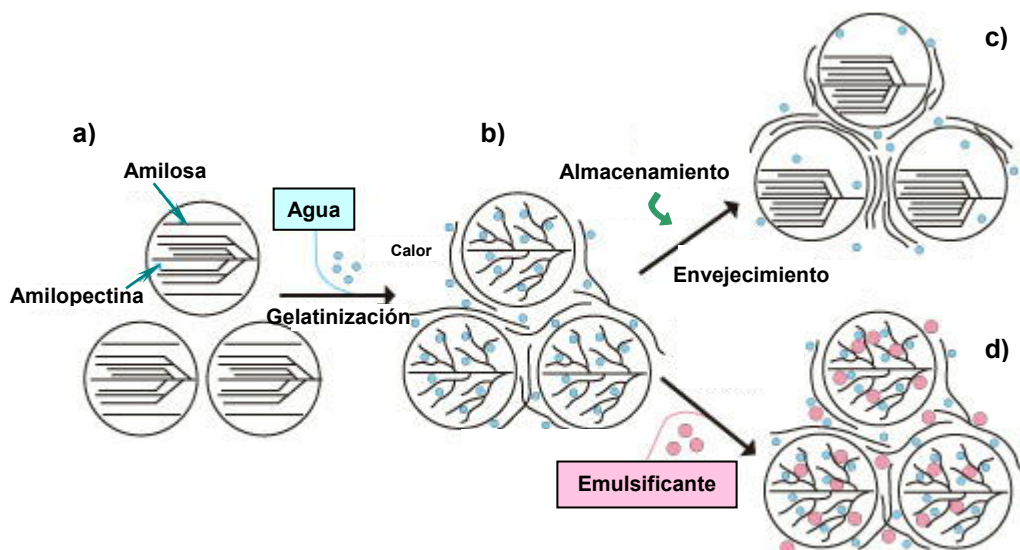
## Proceso de panificación

La panificación es un proceso en el cual se obtiene un producto fermentado por levaduras a base de harina y agua. En dicho producto se forma una matriz de gluten que atrapa el gas generado durante la fermentación, influyendo directamente en la formación de la estructura de la miga. La estructura y calidad sensorial del pan depende de la naturaleza de dicha matriz (Cauvain, 2003).

La metodología de panificación tradicional argentina se destaca por utilizar escasa levadura y realizar fermentaciones muy largas. Estas variables de proceso también condicionan la calidad panadera, pudiendo modificar la vida útil del producto (Ribotta y col., 2004; Ponzio y col., 2008).

Durante el amasado las partículas de harina se hidratan lentamente. A su vez, y gracias al trabajo mecánico que se aplica durante el proceso, las moléculas de gluten interaccionan entre sí y dan lugar a la formación de la red tridimensional, lo que se traduce en una masa cohesiva, extensible y con capacidad de retener los gases producidos en la fermentación. El almidón también se integra en la red de gluten, al igual que el resto de los componentes de la harina. A la vez que se desarrolla la red de gluten, la masa incorpora aire en forma de diminutas burbujas que serán las responsables del alveolado final de la miga de pan. Durante el amasado las amililasas se activan y se generan azúcares fermentables que constituyen el sustrato para la acción de las levaduras, las cuales transformarán estos azúcares en alcohol, CO<sub>2</sub> y otros compuestos menores que influirán en el aroma final del pan. Como resultado de este proceso la masa se expande y cambia sus propiedades físicas, facilitando el laminado y la formación de las piezas. En los procesos de panificación es habitual realizar una fermentación inicial, en el bollo de masa, antes del formado definitivo de las piezas, y otra final, con la pieza ya formada. La primera persigue un cambio en la reología de las masas que facilita su manejo, formación o mecanización, e influirá en la calidad del pan producido; estos cambios dependerán de la temperatura y el tiempo de amasado (Basaran y Gocmen, 2003; Calderon-Dominguez y col., 2004). La segunda pretende incrementar el tamaño de las piezas para obtener un producto esponjoso. Una vez fermentadas las piezas deben introducirse en el horno. La expansión del volumen de las piezas durante la primera fase del horneado está influenciada por dos factores:

por un lado los gases ocluidos en el interior de las piezas se expanden al incrementarse la temperatura; por otro, parte del agua y del etanol presentes en las masas se evaporan, pasan a los alvéolos y favorecen la expansión (Gómez-Pallarés y col., 2007). Cuando la masa alcanza cierta temperatura el almidón comienza a gelatinizar (Figura 13 a y b), mientras que el gluten se deshidrata y desnaturaliza. Estos cambios marcan el final de la expansión de las piezas y dan lugar a la miga final. La gelatinización es la destrucción irreversible del orden molecular del gránulo de almidón (Atwell y col., 1988). Durante el calentamiento los gránulos de almidón absorben agua y se hinchan perdiendo su estructura semi-cristalina. Una pequeña cantidad de almidón, principalmente amilosa, es liberada en la región intergranular, lo que conduce a un aumento de la viscosidad (Figura 13 b). Parte de la amilosa solubilizada forma complejos de inclusión con los lípidos polares de la harina de trigo.



**Figura 13.** Fenómeno de envejecimiento del pan. **a)** Almidón nativo, **b)** Almidón gelatinizado, **c)** Almidón retrogradado, **d)** Efecto anti-envejecimiento de los emulsificantes sobre el almidón

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una metodología muy utilizada para estudiar la gelatinización y la retrogradación del almidón. La temperatura de transición y la entalpía de gelatinización determinadas por DSC pueden relacionarse con la cristalinidad de los gránulos de almidón (Krueger y col., 1987; Zobel y col., 1988; Cooke y Gidley, 1992; Ottenhof y Farhat, 2004; Primo-Martin y col., 2006;



Baks y col., 2007; Leblanc y col., 2008). Un alto grado de cristalinidad ha sido asociado a elevadas temperaturas de transición (Barichelo y col., 1990; Stauffer, 1991; Primo-Martin y col., 2007).

## **Envejecimiento del pan**

La calidad y la vida útil de los productos de panadería se encuentran normalmente limitadas por un deterioro físico-químico denominado envejecimiento (staling), el cual da como resultado un endurecimiento de la miga del pan y la pérdida del aroma a pan recién horneado. El envejecimiento del pan es la causa principal de su corta vida útil, transformándolo en uno de los alimentos más perecederos. Este proceso se genera durante el enfriamiento y almacenamiento del pan, período durante el cual las moléculas de almidón se reasocian dando lugar a un estado más ordenado o cristalino (Atwell y col., 1988; Gray y Bemiller, 2003; Rodríguez-Sandoval y col., 2005). El envejecimiento es un proceso complejo e involucra varios fenómenos tales como la pérdida de la crujibilidad de la corteza, el aumento de la firmeza y la disminución de la elasticidad de la miga y los cambios en el aroma y sabor del pan (Schiraldi y col., 1996; Cauvain 1998; Gray y Bemiller, 2003). La pérdida de la textura crocante de la corteza está relacionada con la transferencia de humedad desde la miga, lo cual genera un ablandamiento en la corteza dando como resultado una textura coriácea. El desarrollo de la dureza en la miga es un fenómeno en el que influyen principalmente la pérdida de humedad y la recristalización de la amilopectina (Czuchajowska y Pomeranz, 1989; He y Hosney, 1990; Piazza y Masi, 1995; Hug-Iten y col., 1999; Baik y Chinachoti, 2000; Gray y Bemiller, 2003).

El principal componente involucrado en el envejecimiento del pan es el almidón, el cual sufre una transformación en su estructura denominada retrogradación que ocurre principalmente en dos etapas: una rápida gelación y parcial cristalización de la amilosa (durante las primeras 24 h) por la formación de segmentos de dobles hélices; y una lenta recristalización de cadenas cortas de amilopectina (Figura 13 c) (Kim y D'Appolonia, 1977; Morad y D'Appolonia, 1980; Miles y col., 1985; Toufeili y col., 1999; Rodríguez-Sandoval y col., 2005). Entre un 15-30% de amilosa y amilopectina de almidón gelatinizado pueden manifestar este cambio, mientras que

el resto del almidón permanece amorfo (Schiraldi y Fessas, 2001).

Existen numerosos estudios sobre el efecto antienviejimiento que ejercen ciertos emulsificantes en el pan (Krog, 1981; Eliasson, 1983; Joensson y Toernaes, 1987; Rogers y col., 1988; Stauffer, 1990; Knightly, 1996; Stampfli y Nersten, 1995, Azizi y Rao, 2004). Estos aditivos actúan sobre la amilosa y la amilopectina retardando el proceso de envejecimiento (Figura 13 d). El mecanismo por el cual retardan el endurecimiento de la miga está basado en su habilidad para formar complejos con la amilosa. Este proceso varía de acuerdo al emulsificante, la cantidad utilizada y el balance hidrofílico-lipofílico que posee cada uno. Rao y col. (1992) encontraron que estos factores también influían en la interacción de estos aditivos con la amilopectina durante la recristalización de la misma (Kamel y Ponte, 1993) y el aumento del volumen del pan. Así, por ejemplo, De Stefanis y col. (1977) encontraron que el SSL no sólo formaba complejos con la amilosa, sino también con la amilopectina. La reducción en la dureza de la miga, también es un fenómeno relacionado con la acción de los emulsificantes sobre la amilopectina (Pisesookbunternng y D'Appolonia, 1983; Joensson y Toernase, 1987; Krog y col., 1989; Xu y col., 1992; Azizi y Rao, 2004; Koocheki y col., 2009).

## **Incorporación de almidón resistente**

En la actualidad existe una creciente demanda por alimentos saludables que generen beneficios en la salud del consumidor. Dentro de este contexto los alimentos funcionales que contienen fibra alimentaria (FA) son foco de diversos estudios relacionados a la reducción en los niveles de colesterol plasmático y a una baja respuesta glicémica, como también al aumento de la velocidad del tránsito intestinal, al secuestro y aumento de la secreción de sustancias tóxicas, al aumento de la secreción de ácido biliares y estrógenos, a la mejora de la calidad de la microflora intestinal y a la reducción de incidencia de cáncer de colon (Sgarbieri y Pacheco, 1999; Waszczynskyj y col., 2001). Según la American Association of Cereal Chemists (AACC, 2001) “la fibra alimentaria es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Incluye

polisacáridos, oligosacáridos, lignina y otras sustancias asociadas de las plantas. La fibra alimentaria promueve efectos fisiológicos benéficos incluyendo atenuación del nivel del colesterol y/o atenuación en los niveles de glucosa en sangre”. De acuerdo a la clasificación de la AACC (2001), los constituyentes de la fibra alimentaria se dividen según lo expresado en la Tabla 3.

El almidón, principal fuente de carbohidratos, es el polisacárido de almacenamiento más abundante en plantas. Según su función nutricional se clasifica en almidón glucémico (digerible) y almidón resistente. Los almidones glucémicos son aquellos que son degradados hasta glucosa por enzimas del tracto digestivo; los almidones resistentes (AR) escapan de la digestión en el intestino delgado, pero son fermentados en el colon por la microflora bacteriana (Nugent, 2005; Sajilata y col., 2006).

**Tabla 3.** Constituyentes de la fibra alimentaria (AACC, 2001).

	Tipo	Sub-tipo
Polisacáridos no almidonosos y oligosacáridos resistentes	Celulosa	-
	Hemicelulosa	Arabinoxilanos Arabinogalactanos
	Polifruktosas	Inulina Oligofruktanos
	Galacto-oligosacáridos	-
	Gomas	-
	Mucílagos	-
	Pectinas	-
Carbohidratos análogos	Dextrinas no digeribles	Maltodextrinas resistentes (de maíz u otras fuentes) Dextrinas resistentes de papa
	Componentes de carbohidratos sintéticos	Polidextrosa Metil celulosa Hidroxiopropil metil celulosa
	Almidones no digeribles (resistentes)	-
Lignina	-	-
Sustancias asociadas al complejo de polisacáridos no almidonosos y lignina en plantas	Ceras	-
	Fitato	-
	Cutina	-
	Saponinas	-
	Suberina	-
	Taninos	-

El almidón resistente se define como “la suma del almidón y sus productos de degradación que no son absorbidos en el intestino delgado de individuos saludables” (ASP, 1992). Numerosos ensayos han demostrado que el almidón resistente posee funciones fisiológicas similares a las de la fibra dietaria (ASP, 1992; Eerlingen y Delcour, 1995; Nugent, 2005). A pesar de no ser considerado un aditivo alimentario, el almidón resistente posee un color blanco, y se presenta en forma de polvo, siendo una opción para su aplicación en alimentos ricos en almidón. Cuando se compara con otras fibras, el almidón resistente de maíz (ARM) presenta ventajas sobre éstas, ya que posee mejor apariencia, sabor y textura que estimulan su consumo. Algunos almidones como el Hi-Maize® 260 (National Starch) poseen una proporción de AR de alrededor de 60% (base seca), y son resistentes a altas temperaturas, pudiendo de esta manera ser sometidos a procesos como la cocción de pan. Otra gran ventaja que posee este almidón es que su absorción de agua también es reducida, solamente un 25% mayor a la absorción de la harina, comparado con otro tipo de fibras cuya absorción es de 3 a 5 veces superior a la harina. El fabricante recomienda la sustitución de un 5 a 17% de harina de trigo por ARM (National Starch, 2005).

La cantidad de estudios relacionados a la tecnología de producción de pan como alimento funcional con mayor contenido de almidón resistente (AR) (Morita y col., 2002; Hung y Morita, 2004; Hung y col., 2005) aumenta en forma directa al número de trabajos que correlacionan el uso de AR como fuente de FA y su potencial uso en alimentos funcionales (Goñi y col., 1997; Åkerberg y col., 1998; Queiroz-Monici y col., 2005; Rosin y col., 2002; Yamada y col., 2005). Tecnológicamente, la sustitución de harina de trigo por AR afecta la calidad del pan, por la dilución del gluten (Michniewicz y col., 1991). Por lo tanto, cualquiera sea el tipo de fibra adicionada a panes, es necesario ajustar los parámetros de las masas para que el producto final presente alta calidad y así obtener productos aceptables por los consumidores.

## **Uso de aditivos en panificación**

Las harinas obtenidas de los trigos cultivados en Argentina difieren notablemente en calidad industrial, según la zona de procedencia del cereal. Estas diferencias se

deben a las diversas razones genéticas y ambientales que se encuentran interrelacionadas (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 diversos tipos (oxidantes, enzimas, hidrocoloides, emulsificantes, entre otros) para mejorar el rendimiento de harinas de calidad inferior. Por otra parte, la mecanización e industrialización de la panadería ha hecho imprescindible el empleo de estos aditivos, con el objetivo de mejorar la calidad de los productos obtenidos.

Dada la variación de calidad de las harinas y la necesidad de mantener una buena calidad de pan, que sea aceptable para el consumo, el análisis del efecto de diversos aditivos comerciales sobre las harinas de diferentes aptitudes panaderas contribuirá a optimizar el uso de los mismos y mejorar el aprovechamiento de harinas que no son de buena calidad panadera.

Los principales efectos que ejercen los oxidantes sobre la harina de trigo son la maduración de la misma; el blanqueo y la fuerza conferida a la matriz formada por la masa y el gluten luego del amasado. En el primer caso los oxidantes más utilizados son la azodicarbonamida (ADA) y el dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), los cuales actúan acelerando el proceso de maduración de la harina (Neukom y Kuendig, 1962; Tsen, 1963, 1964). En condiciones normales este proceso demora de 1 a 2 meses, mientras que con el agregados de estos aditivos se logra madurar la harina en unos pocos minutos (Tsen, 1963, 1964, 1969). Uno de los blanqueadores más empleado es el peróxido de benzoilo, el cual actúa sobre los pigmentos carotenoides de la harina. Este oxidante es un polvo blanco que se agrega a la harina en una proporción de 25 a 100 partes por millón (ppm) (Stauffer, 1990). Por último, los oxidantes que ejercen un efecto reforzador en la masa tienen como función principal oxidar los grupos sulfhidrilos libres de las proteínas y provocar la formación de enlaces puente disulfuro, lo cual generará una matriz de gluten más fuerte. Estos cambios estructurales darán como resultado una masa más elástica, mejorando las condiciones mecánicas de la misma, lo cual conllevará a un aumento en el volumen de los panes (Stauffer, 1990). Algunos de los oxidantes reforzadores de masa permitidos más utilizados hoy en día son el ácido ascórbico y la ADA, entre otros (Tsen, 1963, 1964, 1965; Elkassabany 1980a, 1980b; Dong y Hosney 1995).

En los últimos años el uso de enzimas en panificación ha pasado a ser una alternativa cada vez más frecuente. Las mismas mejoran la calidad panadera de las

harinas, son naturales, seguras y no tóxicas. Se pueden utilizar para modificar el almidón, las proteínas, los pentosanos y los lípidos de la harina de trigo con el fin de modificar su estructura y mejorar su funcionalidad en el pan. Dentro de las enzimas comunmente utilizadas en panificación se encuentran las  $\alpha$ -amilasas, las cuales hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,4 del almidón, produciendo  $\alpha$ -dextrinas de bajo peso molecular (Bowles, 1996; Rosell y col., 2001a; Gupta y col., 2003). Esta acción genera azúcares fermentables y reductores. Los primeros sirven de nutrientes para las levaduras aumentando la producción de  $\text{CO}_2$ , mientras que los segundos promueven la generación de los productos de la reacción de Maillard intensificando el sabor, el aroma y el color del pan (Drapron y Gordon, 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 y col., 1997; Min y col., 1998; Defloor y Delcour, 1999). Otras de las enzimas utilizadas son las proteasas, las cuales hidrolizan los péptidos de las proteínas provocando un aumento en la hidrofiliidad de las mismas, disminuyendo la tendencia a la agregación mediante uniones hidrofóbicas. Al hidrolizar la proteína del gluten la masa se volverá menos elástica. Por su parte, las pentosanasas actúan sobre los polisacáridos no almidonosos (arabinosilanos) de la masa catalizando la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 de la cadena central de D-xilosa de los arabinosilanos, reduciendo su tamaño molecular (Jeffries, 1996; Biely y col., 1997; Courtin y Delcour, 2001). Este fenómeno tiene como consecuencia la disminución de velocidad de difusión de  $\text{CO}_2$  en la masa estabilizando las celdas de gas. Por otra parte se incrementa la viscosidad de la fase acuosa de la masa mejorando las características del pan tales como volumen, firmeza y estructura de la miga, así como también disminuyendo la retrogradación del almidón (Hoseney, 1984; Biliaderis y col., 1995; Gan y col., 1995; Courtin y col., 2001; Haros y col., 2002). Por último las transglutaminasas son enzimas que catalizan la formación de la unión peptídica entre residuos de lisina y glutamina (Seguro y col., 1996) y también cataliza la incorporación de prolaminas en las proteínas mediante un enlace tipo amida con residuos de glutamina (Nielson, 1995). En el gluten catalizan el entrecruzamiento entre las proteínas mediante enlaces intra e intermoleculares, la polimerización de las proteínas del gluten puede conducir a un incremento de la elasticidad y una mejora en la fuerza de la masa, por lo que se producirá una mejora

en la calidad panadera (Larré y col., 1998, 2000; Gerrard y col., 1998; Basman y col., 2002; Rosell y col., 2003; Autio y col., 2005).

Los hidrocoloides son polisacáridos y proteínas que provienen de diferentes fuentes tales como plantas, algas, microorganismos y animales. Estos aditivos se pueden agregar a las harinas de trigo con el fin de mejorar la calidad panadera (Davidou y col., 1996; Collar y col., 1998, 1999; León y col., 2000) y para retardar el envejecimiento de los panes durante el almacenamiento (Bárcenas y col., 2003; Guarda y col., 2004). También han sido utilizados para optimizar las formulaciones de pan sin gluten (McCarthy y col., 2005; Lazaridou y col., 2007). Debido a que estas moléculas sufren degradación parcial en el tracto digestivo, también podrían contribuir, dependiendo del nivel utilizado, con el contenido total de fibra de las harinas. A diferencia de otros aditivos que poco influyen en el nivel de absorción de agua de las harinas, la adición de este tipo de compuestos afectará fuertemente este parámetro debido a que son altamente hidrofílicos (Linlaud y col., 2009). La Goma xántica induce el fortalecimiento de la masa, aumenta la absorción de agua y la capacidad de la masa para retener gas (Mandala y col., 2007). También aumenta el volumen específico del pan y la actividad de agua de la miga (Collar y col., 1999; Rosell y col., 2001b). La Goma Guar mejora la tolerancia al mezclado en productos panificados y la vida útil a través de la retención de humedad. La Goma Garrofín da como resultado un mayor rendimiento mejorando la textura final de los panes y aumenta la viscosidad en la masa (Maier y col., 1993). Por último, la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) mejora la calidad de panes congelados almacenados y extiende la vida útil de los productos horneados a través de la prevención de la pérdida de agua durante la cocción (Dziezak, 1991; Bárcenas y col., 2004).

Entre los aditivos más usados en productos panificados se encuentran los emulsificantes. Debido a que estos surfactantes constituyen una parte fundamental de este trabajo de tesis, las propiedades, características y beneficios que ejercen en la panificación se exponen en detalle en el Inciso siguiente.

## Emulsificantes. Aplicaciones en panificación

Algunos ensayos han demostrado que los emulsificantes ejercen efectos deseados en el proceso de elaboración del pan (Gómez y col., 2004; Ribotta y col., 2004; Aamodt y col., 2003, 2005a y b; Selomulyo y Zhou, 2007; Koocheki y col., 2009). Durante el período de preparación de las piezas ayudan a retener más aire en las masas, aumentan la fuerza y la extensibilidad. En la fermentación aumentan la retención de gas y evitan el colapso de las masas. En el horneado mejoran la textura y disminuyen la pérdida de agua. También interactúan con las moléculas de amilosa y amilopectina retardando el envejecimiento del pan (Lakshminarayan y col., 2006). Por lo tanto, prolongan la vida útil y las características texturales de los productos terminados.

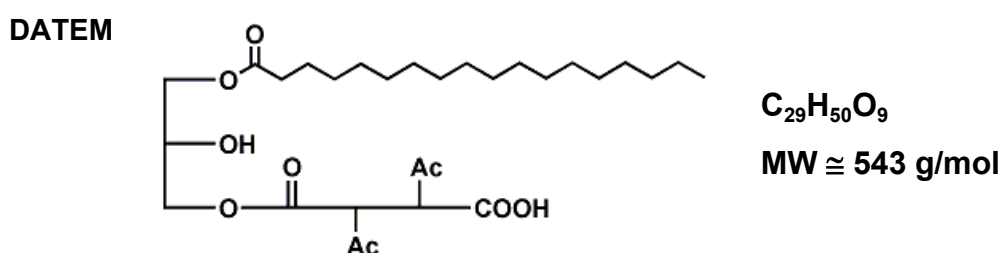
Entre los emulsificantes más utilizados en panificación se pueden mencionar el Estearoil Lactilato de Sodio (SSL), los Ésteres de Mono y Diglicéridos de Ácido Diacetil Tartárico (DATEM), el Estearoil Lactilato de Calcio (CSL) y los Polisorbatos (Stampfli y Nersten, 1995) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de los emulsificantes usados en panificación.

Clasificación	Emulsificante	Abreviatura	Suavizante de masa	Reforzador de masa
<b>Anfotéricos</b>				
	Lecitina	-	Bueno	-
<b>Iónicos</b>				
Aniónicos	Esteres de mono y diglicéridos del ácido diacetil tartárico	DATEM	Leve	Excelente
	Estearoil Lactilato de Sodio	SSL	Muy bueno	Excelente
	Estearoil Lactilato de Calcio	CSL	Bueno	Excelente
<b>No iónicos</b>				
	Monodiglicéridos	MDG		
	Monodiglicéridos destilados	DMG	Excelente	-
	Monoglicéridos etoxilados	EMG	Pobre	Muy bueno
	Esteres de ácidos grasos y sacarosa	SE	Bueno	Excelente
	Polisorbato 60	PS-60	Leve	Muy bueno

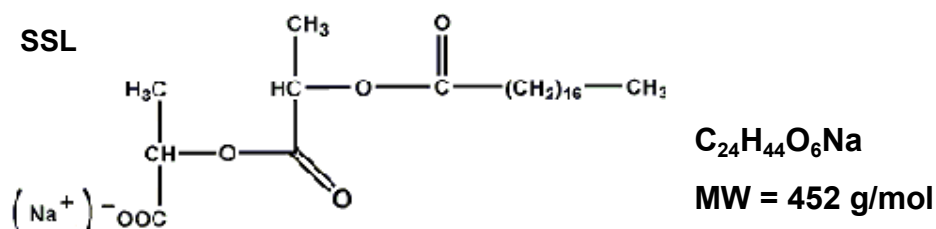


Los ésteres de mono y diglicéridos del ácido diacetil tartárico (DATEM) son derivados del glicerol y están esterificados con ácidos grasos comestibles y con ácido diacetil tartárico (Figura 14). El DATEM es un emulsificante iónico que forma dispersiones en agua fría o caliente y posee un balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de 9,2 (Stauffer, 1990; Armero y Collar, 1996; Köhler, 2001; Indrani y Rao, 2003). Según el Sistema Internacional de Numeración (INS, International Numeration System) su código INS es el 472e y la concentración máxima permitida por el CAA, según Resolución Mercosur GMS N° 02/08, es de 2,0%.



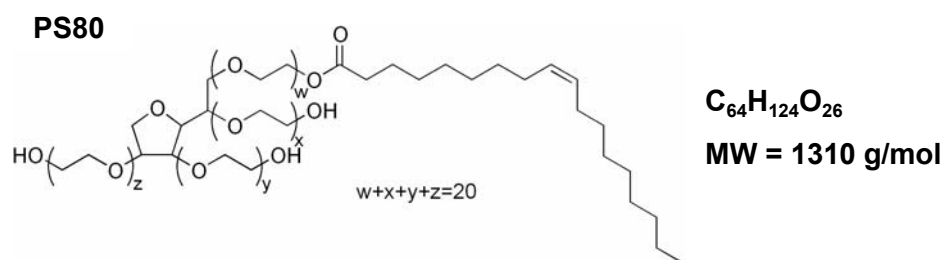
**Figura 14.** Fórmula química y peso molecular de los ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM).

El estearoil lactilato de sodio (SSL) es un emulsificante iónico obtenido a partir de la síntesis de ácidos grasos y el ácido láctico (Figura 15). Este aditivo posee un elevado balance HLB (21), lo cual le confiere un alto carácter hidrofílico (Stauffer, 1990; Armero y Collar, 1996; Indrani y Rao, 2003; Boutte y Skogerson, 2004). Su número INS es el 481i y la concentración máxima permitida es de 0,5% (CAA).



**Figura 15.** Fórmula química y peso molecular del Estearoil Lactilato de Sodio (SSL).

El monooleato de polioxietilen (20) sorbitán (Polisorbato 80, PS80) es un emulsificante no iónico que se obtiene a partir de la oxidación de los ésteres de sorbitan con óxido de etileno (Figura 16). Posee un balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de 15 (Stauffer, 1990; Indrani y Rao., 2003; Cottrell y van Peij, 2004) y su INS es el 433. En el caso de este aditivo, el CAA no indica una concentración máxima permitida.



**Figura 16.** Fórmula química y peso molecular del Polisorbato 80 (PS80).

El tipo de matriz formada va a determinar la calidad reológica de la masa. Es por esta razón que el estudio del efecto de los emulsificantes sobre las propiedades reológicas y estructurales de la masa es de suma importancia por ser determinante de la calidad panadera; y ha sido llevado a cabo por diversos investigadores.

El DATEM es añadido a la masa para reforzar el gluten, dar un volumen de pan mayor y una estructura de miga más fina y uniforme (Stauffer, 1990). Mostró ser efectivo para disminuir la velocidad de endurecimiento (retardar el envejecimiento) y mejorar el volumen de panes obtenidos a partir de masas frescas y congeladas (Xu y col., 1992; Nemeth y col., 1996; Kenny y col., 1999; Ravi y col., 2000; Indrani y Rao, 2003; Azizi y Rao, 2004; Bollaín y Collar, 2004; Gómez y col., 2004; Ribotta y col., 2004; Koocheki y col., 2009). Este emulsificante forma una matriz fuerte que produce un pan de buen volumen y textura (Ribotta y col., 2004) sugiriendo una posible unión del DATEM a los sitios hidrofóbicos superficiales de las proteínas de gluten, que podría inducir su agregación. Xiujin y col. (2007) estudiaron el efecto del DATEM en concentraciones de 0,03 a 1% (b.h.) en la calidad de panes chinos preparados al vapor (Chinese Steam Bread, CSB). Sus resultados mostraron un efecto complejo del DATEM sobre las propiedades reológicas de las masas, informando una disminución en la absorción de agua en comparación con la de

masa pan, en la que dicho parámetro aumentó. La retención de gas, la fuerza y estructura de gluten mejoraron en presencia de DATEM. También lo hicieron la elasticidad, tenacidad y blancura, aunque no se detectaron cambios en el volumen. El color, la estructura y suavidad de la miga mejoraron con el agregado de emulsificante, encontrándose un nivel óptimo para CSB de 0,1% (b.h.). Aamodt y col. (2003) estudiaron el efecto de niveles de 0,45% de DATEM en los parámetros reológicos de masa y la calidad de panes tipo hogaza. El DATEM reforzó la masa y mejoró las características (altura, relación de forma, área de rodaja y firmeza de miga) de panes tipo bollo; aunque no mejoró la aceptabilidad global de los mismos, medida mediante un panel sensorial entrenado. Estos mismos autores estudiaron también el efecto del DATEM en las características de panes obtenidos con cultivares de alta (HMW-GT 5+10) y de baja (HMW-GT 2+12) calidad de gluteninas y preparados a escala de laboratorio (Aamodt y col., 2004, 2005a y b). En estos ensayos encontraron que el emulsificante a un nivel de 0,45% no tuvo efecto significativo en la calidad del pan, mientras que a 0,9% (Aamodt y col., 2004, 2005a y b) tuvo un efecto significativo en el área, altura y apariencia total de los panes, especialmente en las variedades de alta calidad proteica (5+10). Ravi y col. (2000) evaluaron la acción de diversos aditivos sobre masas elaboradas con harina de trigo. Los emulsificantes utilizados fueron SSL, DATEM y GMS (glicerol monoestearato) en niveles de 0,25% a 1%. Los resultados mostraron que la incorporación de todos los emulsificantes aumentó la estabilidad de la masa y provocó una disminución en la extensibilidad. El agregado de 0,25% de los mismos generó una mayor resistencia a la extensión, siendo el DATEM el que presentó el mayor incremento.

El SSL es considerado un emulsionante acondicionador apto para todo tipo de masa y es principalmente debido a su efecto reforzador. También promueve la emulsificación y la incorporación de aire (Stauffer, 1990; Armero y Collar 1996, 1998; Keetels y col., 1996; El-Hady y col., 1999; Ravi y col., 2000; Indrani y Rao, 2003; Azizi y Rao, 2004; Gómez y col., 2004). Además, disminuye el porcentaje de recristalización del almidón (Eliasson, 1983) y prolonga la vida útil del pan (Tenney, 1978; Rusch, 1981; Xu y col., 1992). Kenny y col. (1999) demostraron que la adición de SSL a piezas de masa congeladas durante 2, 5 y 8 semanas provocó un aumento significativo de volumen de pan muy superior al del pan sin el agregado de este aditivo. En el mismo trabajo se realizaron ensayos con un extensógrafo y se comprobó que el agregado de SSL produjo masas más fuertes cuya relación R/E

(resistencia/extensibilidad) fue mayor que la de la masa sin aditivo. Al igual que el DATEM, este emulsificante interactuaría con las proteínas del gluten uniéndose a los sitios hidrofóbicos de las proteínas y promoviendo así la agregación de las mismas en la masa (Ribotta y col., 2004; Shiau, 2004). Manohar y Rao (1999) estudiaron el efecto del agregado de SSL, entre otros aditivos, sobre las propiedades reológicas de masas de harina de trigo. Estos autores encontraron que concentraciones de 0,5% de este emulsificante disminuyeron la dureza, la consistencia y la adhesividad de la masa control. Por su parte, Shiau (2004) estudió el efecto del SSL sobre las propiedades viscoelásticas de masas. Los estudios de reología dinámica realizados en el rango de temperatura 30-50 °C en masas con niveles de SSL entre 0,5-1,5% (base harina) mostraron que a medida que se incrementó la concentración de aditivo también lo hicieron significativamente los valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y del módulo de pérdida ( $G''$ ).

En cuanto a calidad panadera, algunos investigadores estudiaron el efecto de diferentes emulsificantes en panes distintos al pan francés, del tipo panes planos o chatos. Farvili y col. (1995) estudiaron el efecto de emulsificantes tales como SSL y DATEM en la calidad de panes tipo árabe ("pita"). Encontraron que el mejor nivel utilizado para mejorar la calidad fue 0,5% y que el SSL resultó mejor que el DATEM en el aumento de la suavidad del producto. Este aditivo a su vez ayudó a mantener la textura de la pieza, aunque no influenció en la aptitud del pan para enrollarse o plegarse. Indrani y Rao (2003) estudiaron el efecto de diferentes emulsificantes en panes hindúes ("parotta"). Estos panes aumentaron su relación diámetro/espesor con el agregado de SSL y DATEM, pero el porcentaje de aceptabilidad global resultó mayor para el primero. Los surfactantes con mayor índice hidrofílico/lipofílico HLB, como el SSL, resultaron beneficiosos en la mejora de la calidad de pan parotta. En general, un mayor HLB produce panes con mayor volumen y de miga más blanda (Breyer y Walker 1983; Indrani y Rao 2003). Así mismo Malakei y col. (1981) recomendaron el uso de SSL 0,5% para mejorar la calidad de panes persas o iraníes ("barbari").

Un emulsificante no tan ampliamente utilizado en la industria panadera como el DATEM y el SSL es el Polisorbato 80. Este aditivo, al ser no iónico, interactuaría con las proteínas de gluten sólo por uniones hidrofóbicas mediadas por su cola carbonada. Mejora la retención de gas, la textura y el volumen de pan (Stampfli y Nersten, 1995; Brandt, 1996). Si bien no existen muchos trabajos que informen

sobre los efectos que ejerce este emulsificante en las propiedades reológicas de las masas de harina de trigo y calidad de los panes, Rusch (1981) ha informado que a niveles de 0,25%, este aditivo refuerza la masa de manera similar a lo observado para los monoglicéridos etoxilados (EMG) y el SSL. Por su parte, Gómez y col. (2004) observaron que el agregado de concentraciones de 0,3% y 0,7% (base harina) de PS80 provocó una disminución en la absorción de agua y en la tenacidad, y un aumento en el tiempo de desarrollo y en la extensibilidad de la masa. Provocó un aumento del volumen de los panes frescos, así como también una disminución en la dureza luego de almacenarlos durante 8 días (Gómez y col., 2004). Indrani y Rao (2003) estudiaron el efecto de DATEM, SSL y PS60 (Polisorbato 60) al 0,5% en masas para elaborar un pan hindú denominado “parotta”. La formulación contenía harina de trigo, sal, azúcar, huevos, aceite y agua. El análisis de la textura de las masas mostró que los emulsificantes provocaron una disminución de la dureza y la adhesividad y un aumento en la cohesividad.

De acuerdo a lo expuesto hasta el momento, se supone que por su carácter anfifílico los emulsificantes favorecerían las interacciones entre los distintos componentes de la masa, aunque los mecanismos de acción no están del todo dilucidados. El emulsificante se localizaría entre el almidón y las proteínas de gluten mejorando así la adherencia entre estos componentes durante la formación de la estructura. El estudio a nivel molecular de la interacción entre los emulsificantes y los principales componentes de la masa panaria (almidón, gluten y agua) con nuevas técnicas de análisis permitiría tener un conocimiento más profundo y específico de dicha interacción. El conocimiento derivado de este estudio permitiría elaborar un modelo que explique el mecanismo de acción de estos emulsificantes durante la elaboración de masa y predecir su efecto en la calidad del producto terminado.

## **HIPÓTESIS**

- Los emulsificantes SSL y el DATEM modifican la red de gluten en forma específica.
- Los emulsificantes SSL y DATEM, solos o en mezclas, y en determinados niveles mejoran las propiedades reológicas de la masa.
- Los emulsificantes SSL y DATEM aumentan la estabilidad de la masa, mejorando la capacidad de retención de gases, obteniéndose panes de mayor volumen y buena textura de miga.
- El SSL y el DATEM retardan durante el almacenamiento, el comienzo de la recristalización del almidón, provocando de esta manera un aumento en la vida útil de los productos panificados.
- El SSL y el DATEM resultan aditivos indispensables para mejorar la calidad de panes nutricionales adicionados con fibra alimentaria.

## OBJETIVOS

---

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de diferentes emulsificantes sobre el comportamiento estructural y reológico de la masa de harina de trigo y la calidad del pan.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Evaluar el efecto de los emulsificantes SSL, DATEM y la mezcla equiproporcional de ambos, en diferentes niveles, sobre la microestructura de la matriz de gluten.
- ✓ Analizar el tipo de polipéptidos o subunidades proteicas que estabilizan la matriz de gluten formado en presencia de los emulsificantes.
- ✓ Estudiar los posibles cambios estructurales producidos por los emulsificantes en las proteínas de gluten.
- ✓ Evaluar el efecto de los emulsificantes sobre la microestructura y reología de la masa.
- ✓ Estudiar los mecanismos de acción de los emulsificantes en el proceso de panificación mediante el análisis de las interacciones que establecen con los principales componentes de la harina: proteínas de gluten y almidón.
- ✓ Evaluar el efecto de los emulsificantes sobre la calidad de las piezas de pan y su efecto en la conservación de las mismas.
- ✓ Analizar el efecto de diferentes emulsificantes en la calidad de masa pan elaborada con almidón resistente de maíz como fibra alimentaria.
- ✓ Optimizar la formulación, ajustando el nivel de emulsificantes, para obtener un pan nutricional, enriquecido en fibra, de alta calidad.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 1.1 Caracterización de la harina

La harina de trigo utilizada en este trabajo de tesis es una harina tipo 000, de la campaña 2004-2005 (Molino Campodónico Ltd.). Esta harina es una harina de trigo pan (*Triticum aestivum L.*) formada por mezcla de trigos provenientes de las zona II (sur de la Pcia. de Santa Fe, sureste de la Pcia. de Córdoba y centro y norte de la Pcia. de Buenos Aires) y de la zona IV (sudeste de la Pcia. de Buenos Aires) que se utiliza comúnmente para panificación.

### 1.1.1 Humedad

Se determinó el contenido de humedad sobre 2 g ± 1 mg de harina mediante evaporación de agua en una estufa con circulación forzada de aire a 135 °C durante 2 h. El ensayo se continuó hasta obtener peso constante y el porcentaje de humedad se determinó por diferencia de pesada antes y después de calentar la muestra (AACC 44-19, 2000). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 1.1.2 Gluten

El procedimiento constó de diferentes pasos (Adaptado de IRAM 15864:1995). Se pesaron por duplicado 10 ± 0,01 gr de harina y se colocaron en las cámaras de ensayo del Glutomatic 2200 – Perten (Suecia). Se adicionaron 4,9 mL de agua, se amasó automáticamente durante 60 s. Se lavó la masa durante 5 min. Las piezas de gluten se centrifugaron en centrifuga Centrifuge 2015 – Perten (Suecia) a 2415 x g durante 1 minuto para separar el agua residual. El gluten se pesó y se determinó porcentaje de gluten húmedo según la ecuación 1.1 (Ec.1.1). Las determinaciones de gluten húmedo y seco se realizaron por triplicado.

$$\% \text{ Gluten Húmedo} = \frac{m_1}{m} \times 100 \times \frac{100 - 13,5}{100 - H} \quad \text{Ec. 1.1}$$

donde:

El contenido de gluten húmedo está referido a harina de 13,5% de humedad

$m_1$  = masa de gluten húmedo (g)

$m$  = masa de harina (g)

$H$  = humedad de la harina (%)

El gluten húmedo se secó durante 4 min a  $150 \pm 3$  °C en equipo Glutork 2020 – Perten (Suecia). Se pesó y se determinó gluten seco según la ecuación 1.2 (Ec. 1.2):

$$\% \text{ Gluten Seco} = \frac{m_2}{m} \times 100 \times \frac{100 - 13,5}{100 - H} \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde:

El contenido de gluten seco está referido a harina de 13,5% de humedad

$m_2$  = masa de gluten seco (g)

$m$  = masa de harina (g)

$H$  = humedad de la harina (%)

### 1.1.3 Contenido Proteico

Se determinó el contenido de proteínas por el método de Kjeldahl utilizando un equipo Büchi 320 (Suiza). Se procedió a digerir las muestras, para lo cual se colocaron 0,6 gr de muestra en el tubo de digestión,  $H_2SO_4$  concentrado (20 mL) y una mezcla catalizadora de sulfato de potasio:sulfato de cobre (relación 10:1). Se calentó hasta alcanzar una temperatura de 370 °C y se mantuvo esta temperatura hasta lograr la completa digestión de la muestra (desaparición de gases sulfurosos blancos). De esta manera se aseguró la completa oxidación de la materia orgánica. Se retiró, se dejó enfriar y se agregaron 100 mL de agua destilada.

Luego de la digestión se realizó la destilación por arrastre con vapor del  $NH_3$  mediante el agregado de hidróxido de sodio 40%. El  $NH_3$  se recogió por burbujeo del vapor en 50 mL de una solución de ácido bórico al 4% (pH 4,65). Se procedió a valorar el ácido neutralizado por el amoníaco (titulación directa). Para la titulación se utilizó el indicador ácido/base Mortimer (mezcla de rojo de metilo y azul de

bromofenol), que vira a pH 4,7. Una vez finalizada la etapa de la destilación, el amoníaco solubilizado provocó un aumento del pH y la solución viró de color rojizo a azulado. Se valoró dosificando con un ácido de concentración conocida (HCl 0,1N) hasta alcanzar nuevamente el valor inicial de pH correspondiente a una solución rojiza de igual color que el blanco.

El porcentaje de nitrógeno se calculó utilizando la ecuación 1.3 (Ec. 1.3):

$$\%N = \frac{(V_m - V_b) \times N \times P_{meq. N}}{\rho_m} \times 100 \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde:

$V_m$ : volumen de HCl consumidos en la titulación de la muestra (mL)

$V_b$ : volumen de HCl consumidos en la titulación del blanco (mL)

$\rho_m$ : peso de la muestra, expresado en base seca (g)

N: Normalidad del HCl utilizado en la titulación

$P_{meq N}$ : peso del miliequivalente del N

Para estimar el porcentaje de proteínas se multiplicó el % N por un factor  $F = 5,7$  (factor utilizado para trigo). La determinación de proteínas se realizó por triplicado.

#### 1.1.4 Cenizas

En cápsula de porcelana calcinada y tarada se pesó cerca de 1 gramo de muestra con precisión de décima de mg. Se calcinó sobre tela metálica hasta residuo carbonoso y se llevó a mufla a  $900 \pm 25$  °C. Se calcinó hasta obtener un residuo prácticamente blanco (IRAM 15851). El porcentaje de cenizas se calculó por diferencia de pesada antes y después de calentar en la mufla. El valor de cenizas de la harina fue suministrado por el Molino Campodónico Ltd.

### 1.1.5 Ensayo Alveográfico

El ensayo alveográfico se utiliza para estimar la calidad de trigos y harinas destinadas a todos los tipos de panificación. Sirve para el control del proceso de molienda, selección de mezclas de trigo para la producción de harinas y verificación de la acción de aditivos autorizados en el comportamiento de la harina.

El principio del funcionamiento del Alveógrafo se basa en la extensión tridimensional de un disco de masa que bajo la acción de una presión de aire se infla y toma la forma de una burbuja. Se mide la presión en el interior de la burbuja hasta que ésta explota. Los cambios de presión se traducen en un gráfico de tenacidad vs. extensibilidad de la masa. De modo que el equipo está diseñado para medir la resistencia a la expansión y la extensibilidad de la masa durante el ensayo. El método de ensayo alveográfico está normalizado internacionalmente; en la práctica se aplica el método de acuerdo a la NORMA IRAM 15857:1995 que coincide en su totalidad con la norma ISO 5530-4:1991, por lo cual puede considerarse como equivalente al documento internacional.

Se procedió según la metodología IRAM 15857:1995 e ISO 5530-4:1991. Se pesaron  $250 \pm 0,5$  g de harina (cuya humedad fue previamente determinada) y se mezcló en la cámara del alveógrafo con solución de NaCl al 2,5% p/v para formar la masa. Se dejó amasar 1 minuto para que se forme la masa. Se paró el motor y se reincorporó a la masa la harina adherida a las paredes. Se encendió el motor y se amasó durante 6 min. La masa fue extraída por una ranura que posee el equipo y fueron cortadas piezas que luego se laminaron. Se cortaron cilindros de masa de 45 mm de diámetro y se depositaron en un recinto termostatzado (25 °C) donde se dejaron reposar. El ensayo se inició 28 min después de haber comenzado el amasado. Las piezas se colocaron de a una por vez en el centro del dispositivo para inflar la masa. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

Del Alveograma se obtuvieron los parámetros que se muestran en la Figura 1.1:

- ✓ **Tenacidad (P):** Presión correspondiente a la resistencia máxima de la masa a la deformación. Depende de la consistencia, de la tenacidad de la masa y del potencial de hidratación de la harina. Es indicada por la altura máxima de la curva y se expresa en milímetros.

- ✓ **Extensibilidad (L):** Extensibilidad que alcanza la masa antes de su ruptura. Está dada por el largo de la curva y se expresa en milímetros.
- ✓ **Trabajo de deformación (W):** Expresa la fuerza de una harina o su valor panadero. Es el área bajo la curva y se expresa en Joules.
- ✓ **P/L:** Es el balance entre la tenacidad de la masa y su extensibilidad.

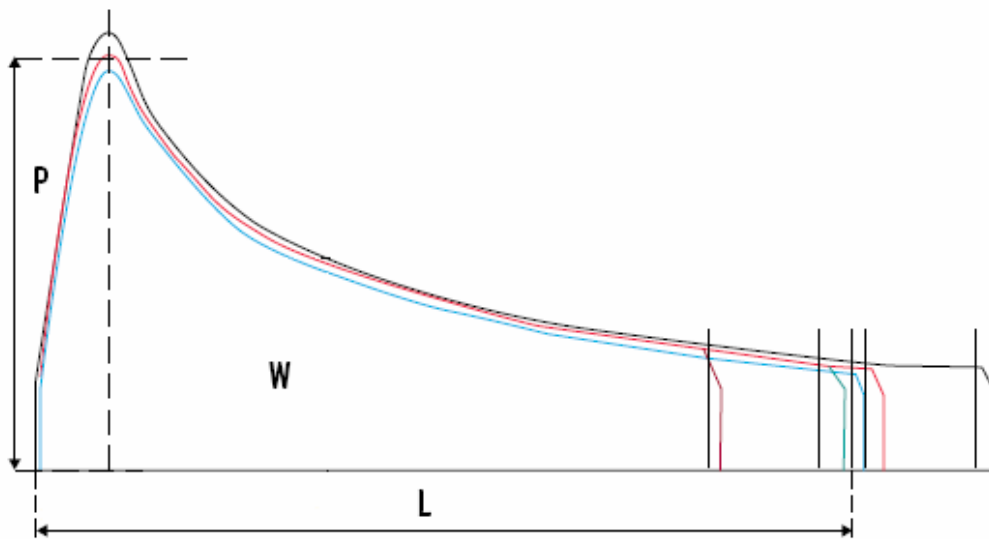


Figura 1.1. Alveograma representativo de una harina de trigo.

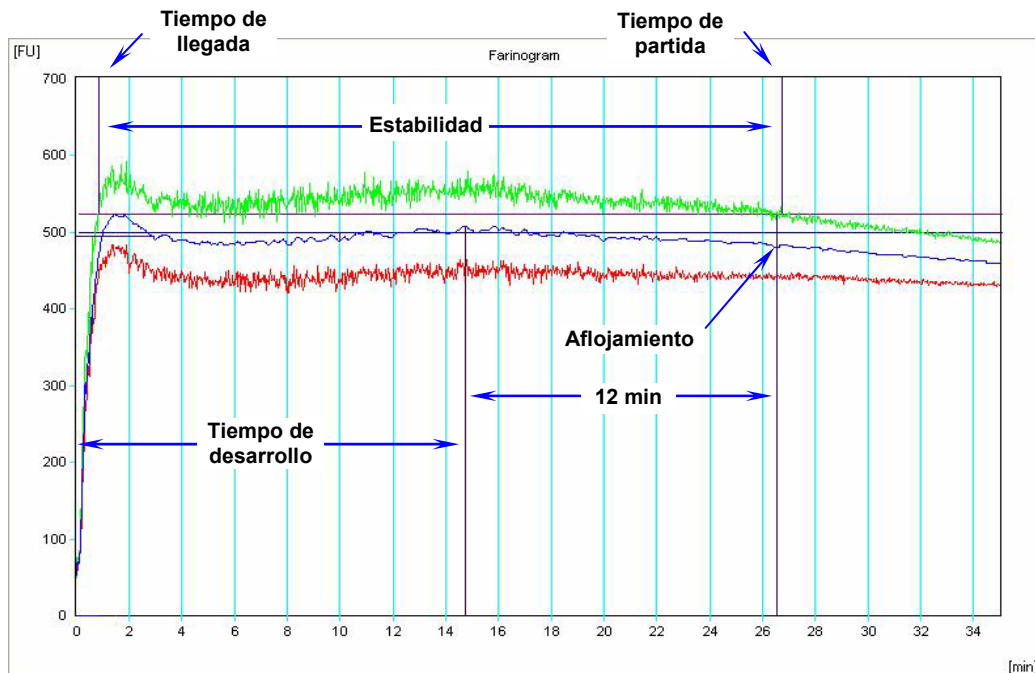
### 1.1.6 Ensayo Farinográfico

El ensayo farinográfico es una de las pruebas de calidad de harina más comúnmente usadas en el mundo. Los resultados obtenidos son utilizados como parámetros en formulación para estimar la cantidad de agua requerida para elaborar una masa y el tiempo óptimo de amasado. Dichos resultados también son utilizados para predecir los efectos del procesamiento, incluyendo los requerimientos del amasado para el desarrollo de la masa, la tolerancia al sobre amasado y la consistencia de la masa durante la elaboración de los productos panificados. Los resultados obtenidos también son útiles para predecir las características texturales de los productos terminados.

Se utilizó la metodología IRAM 15855:2000. Para ello se pesaron  $300 \pm 0,1$  g de harina (cuya humedad fue previamente determinada según lo descrito en el Inciso

1.1.1) y se colocaron en la cámara amasadora del farinógrafo. Se agregó el volumen de agua necesario para producir la consistencia máxima de 500 unidades farinográficas (UF). Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Los parámetros evaluados en el Farinograma fueron (Figura 1.2):



**Figura 1.2.** Farinograma representativo de una harina de trigo.

- ✓ **Absorción de agua:** Es la cantidad de agua requerida para centrar la curva del farinógrafo en la línea de 500 (UF). Esta cantidad de agua es la que necesita una harina para que posea la consistencia óptima en los productos finales. La absorción es expresada como porcentaje (g agua / 100 g harina).
- ✓ **Tiempo de desarrollo:** Es el tiempo que transcurre desde el comienzo del agregado de agua hasta el punto máximo de la curva, cuando se alcanza la consistencia máxima, en el segundo pico. Este parámetro da un indicio del tiempo óptimo de mezclado bajo condiciones estandarizadas. El tiempo de desarrollo es expresado en min.
- ✓ **Estabilidad:** Se define como la diferencia entre el tiempo en el que la curva alcanza por primera vez la línea de 500 UF y el tiempo en que la deja. Este valor, en general, da alguna indicación de la tolerancia de la harina al amasado. La

estabilidad se expresa en min.

- ✓ **Aflojamiento:** Es la diferencia en altura entre el centro de la curva al final del tiempo de desarrollo de la masa y el centro de la curva, 12 min después de este punto. Indica el grado de ablandamiento durante el mezclado. El aflojamiento se expresa en UF.

## 1.2 Emulsificantes utilizados

Los emulsificantes empleados fueron el estearoil lactilato de sodio (SSL) y los ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM) (DANISCO A/S, Copenhagen, Dinamarca). Se utilizaron los dos aditivos puros y una mezcla equiproporcional de ambos emulsificantes.

## 1.3 Preparación de las muestras de gluten

Las muestras fueron preparadas pesando 10 gramos de harina o 10 gramos de una mezcla formada por la harina y los emulsificantes: SSL, DATEM o SSL-DATEM (1:1); a niveles de 0,25; 0,5 y 1% (p/p, base harina). Se agregaron 4,9 mL de agua destilada, se amasó durante 1 minuto y se obtuvo el gluten en un equipo Glutomatic (IRAM 15864). Niveles superiores al 1% de aditivo no permitieron la formación de la red de gluten. Las muestras fueron codificadas como: G para el gluten nativo (control), GS para la muestra de gluten con SSL, GD para la muestra con DATEM y GSD para la muestra de gluten con la mezcla SSL-DATEM. El nivel de emulsificante se indicó luego de las letras codificadas.

Para todas las técnicas, excepto para microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se evaluó la estructura del gluten húmedo, las muestras de gluten fueron liofilizadas, pulverizadas y almacenadas a 4 °C hasta el momento de su análisis.



## 1.4 Preparación de las masas

Las muestras fueron elaboradas en base a la siguiente formulación: cada 100 g de harina se utilizaron 2 g de NaCl y los emulsificantes SSL, DATEM y mezcla de SSL:DATEM 1:1. Los diferentes niveles de emulsificantes utilizados estuvieron en el rango entre 0 y 5% (p/p, base harina). Los porcentajes de aditivo superiores a los utilizados comúnmente en panificación (> 1,0%) se emplearon sólo con fines experimentales. Se empleó como control una masa sin aditivo. Se agregó la cantidad de agua óptima para cada tipo de mezcla (agua farinográfica). Las muestras fueron amasadas durante su tiempo óptimo de desarrollo.

Las muestras fueron codificadas como: M para la masa control (sin aditivo), MS para la muestra masa-SSL, MD para masa-DATEM y MSD para la masa formada con SSL+DATEM. Los niveles de emulsificantes (% p/p) se indicaron con números luego de las letras codificadas.

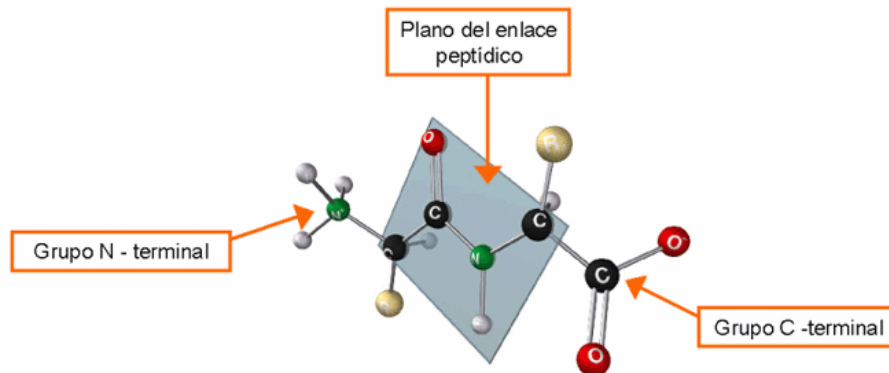
Para los ensayos de Electroforesis y RP-HPLC las masas fueron liofilizadas, pulverizadas y almacenadas a 4 °C hasta el momento de su análisis.

## 1.5 Estructura secundaria de las proteínas del gluten

La espectroscopia Raman con transformada de Fourier (FT-Raman) es una técnica que ha contribuido al avance significativo en la solución del problema de fluorescencia generada por los compuestos fenólicos que son extraídos de las plantas junto con otras sustancias (Schrader, 1991; Li-Chan y col., 1994; Ma y col., 2000). Otra de las ventajas que posee esta técnica, sobre la espectroscopia de fluorescencia, es que permite detectar cambios en la estructura secundaria de las proteínas.

Los espectros Raman de las proteínas y polipéptidos exhiben bandas características y han sido ampliamente utilizados para su estudio, en especial en estos últimos años en la investigación de proteínas constituyentes de alimentos. En el estudio conformacional se obtiene información de la estructura y disposición espacial del esqueleto peptídico (estructura  $\alpha$ -hélice, hoja plegada  $\beta$ , y estructuras desordenadas). El enlace peptídico –CONH– es planar debido a la resonancia de

estabilización (Figura 1.3) y da lugar a 9 modos vibracionales: Amida A, B y Amidas I a VII.



**Figura 1.3.** Enlace peptídico de las proteínas.

La banda Amida I aparece cercana a  $1650\text{ cm}^{-1}$  (80% estiramiento C=O), la Amida II en  $1540\text{ cm}^{-1}$  (60% balanceo N-H y 40% estiramiento C-N), y la banda Amida III en  $1250\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento 40% C-N y 30% N-H). Dichas bandas provienen de las vibraciones en el plano del enlace amida. Las bandas más intensas, Amida I y III, permiten diferenciar, por el corrimiento de las frecuencias, los cambios conformacionales en las proteínas sometidas a distintas perturbaciones (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Frecuencias de las bandas de Amida I y Amida III y de las distintas formas de la estructura secundaria de las proteínas.

Número de onda $\text{cm}^{-1}$	Asignación
<b>1650 - 1680</b>	<b>Amida I</b>
$1670 \pm 3$	Hoja $\beta$ antiparalela
$1665 \pm 3$	Estructura desordenada
$1655 \pm 3$	$\alpha$ -hélice
<b>1295 - 1230</b>	<b>Amida III</b>
$> 1275$	$\alpha$ -hélice
$1245 \pm 4$	Estructura desordenada
$1235 \pm 5$	Hoja $\beta$ paralela

La espectroscopia Raman brinda también información sobre la distribución espacial de los residuos de cadenas laterales: tirosina, triptófano, grupos sulfhidrilos (SH) y geometría del enlace S-S (Tu, 1982). Los dobletes de tirosina permiten diferenciar los entornos de los residuos de tirosina. Cuando los mismos se encuentran ocultos en la estructura proteica, aparece la banda intensa en  $830\text{ cm}^{-1}$ , y cuando se encuentran expuestos en la superficie, se incrementa la intensidad de la banda en  $850\text{ cm}^{-1}$ . El grado de desplegamiento de una proteína durante un calentamiento, así como la formación de agregados, que modifican la exposición de los residuos de tirosina, puede ser evaluado por medio de la relación entre las intensidades de ambas bandas:  $I = 850/830$ . La disminución de la intensidad relativa ( $I$ ) sugiere un incremento del ocultamiento o la participación de los residuos de tirosina en la formación de los puentes hidrógeno intermoleculares (Tu, 1986; Yu y col., 1973; Tu, 1982).

El triptófano oculto en la estructura proteica presenta bandas características a  $1582$ ,  $1553$  y  $760\text{ cm}^{-1}$ . La exposición de residuos de triptófano ocultos como consecuencia de la desnaturalización, es evaluada por la disminución de la intensidad de dichos picos (Kitagawa y col., 1979; Yu y col., 1974; Tu, 1982). El enlace disulfuro colabora en la estabilidad de las proteínas, pudiéndose evaluar la formación o ruptura de dichos enlaces a través de la intensidad de las bandas vibracionales de estiramiento S-S en la región  $500\text{-}540\text{ cm}^{-1}$  (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Frecuencias de las bandas vibracionales para el estiramiento S-S en la región  $500\text{-}540\text{ cm}^{-1}$ .

Número de onda $\text{cm}^{-1}$	Asignación
500 – 540	S-S <sub>estiramiento</sub>
507 – 512	S-S <sub>estiramiento</sub> gauche-gauche-gauche
525	S-S <sub>estiramiento</sub> gauche-gauche-trans
540	S-S <sub>estiramiento</sub> trans-gauche-trans

Para este ensayo se trabajó con muestras liofilizadas de gluten control y gluten con el agregado de SSL, DATEM y la mezcla SSL-DATEM 1:1 de ambos aditivos. Las concentraciones de emulsificantes utilizadas en la preparación de gluten fueron 0,25%; 0,5% y 1%.

Los espectros FT-Raman fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker IFS 113 FT-IR (Ettlingen, Alemania) equipado con un láser Nd: YAG de 1064 nm con una potencia de 500 mW (76 mW en la muestra). Los espectros fueron registrados a temperatura ambiente, con una resolución de  $6 \text{ cm}^{-1}$  y resultaron del promedio de 1000 escaneos. Se llevó a cabo una normalización vectorial en la zona  $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$  (zona vibracional mixta). Las normalizaciones, los cálculos de alturas y posición de picos fueron realizados empleando el software Opus 4.0 (Bruker Optics, Alemania). Los resultados informados corresponden al promedio de tres muestras preparadas de manera independiente.

## 1.6 Sulfhidrilos libres de las proteínas del gluten

Se realizó por el método descrito por Beveridge y col. (1974) ligeramente modificado. Las muestras liofilizadas fueron suspendidas en buffer de extracción (Tris-HCl 0.086M – Glicina 0.09M – EDTA 0.004M – Urea 8M – pH 8) en una concentración de 1mg/mL. Se agitaron en agitador magnético Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y 500 rpm durante 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a 13600 xg en microcentrifuga Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 10 min a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue tratado con el reactivo de Ellman (4mg DTNB/mL en metanol). Se determinó la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro Heλios β Thermo Spectronic (Cambridge, Inglaterra). Para transformar el valor de densidad óptica en concentración de sulfhidrilos se utilizó como coeficiente de extinción molar para el NTB  $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Las determinaciones se realizaron por duplicado. Se determinó la concentración proteica de los extractos por el método de Bradford.

La cantidad de sulfhidrilos libres se calculó según la ecuación 1.5 (Ec. 1.5):

$$\text{SH}_L = 73,53 \times (\text{DO}_1 - \text{DO}_2 - \text{DO}_3) / \text{C}$$

**Ec. 1.5**

donde:

$SH_L$  = concentración de sulfhidrilos libres en la muestra ( $\mu\text{mol SH/g}$  proteína).

$DO_1$  = absorbancia a 412 nm de la muestra con el reactivo de Ellman.

$DO_2$  = absorbancia a 412 nm de la muestra sin el reactivo de Ellman.

$DO_3$  = absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos.

C = concentración de proteína en la muestra ( $\text{mg/mL}$ ), determinada por el método de Bradford. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

## 1.7 Identificación de proteínas totales mediante electroforesis

### 1.7.1 Reactivos generales

**Buffer de electrodo:** Hidroximetil aminometano-base (Tris-base) 0,125 M, glicina 0,96 M (pH 8,3), con o sin el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,5% p/v, para electroforesis desnaturizante o no desnaturizante respectivamente.

**Buffer de gel separador:** Tris-base 1,5 M (pH 8,8) con o sin el agregado de SDS 0,4% p/v. N', N', N', N', tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,4% v/v.

**Buffer de gel stacking:** Tris-base 0,5 M (pH 6,8) con o sin el agregado de SDS 0,4% p/v.

**Buffer de extracción:**

- **NATIVE-PAGE (no desnaturizante) y SDS-PAGE (mono y bidimensional):** Trisma base 0,0625 M (pH 10).

- **Multistacking (MS-SDS-PAGE):** Trisma HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 2% p/v, Glicerol 10% v/v, Azul de bromofenol 0,01% p/v, con o sin el agregado de 2-mercaptoetanol 5% v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.

**Buffer de muestra:** Trisma base 0,0625 M (pH 10), glicerol 12,5% v/v, y azul de bromofenol 0,05% p/v, con o sin el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS) 2,0% p/v, para electroforesis desnaturizante o no desnaturizante respectivamente.

**Buffer de tratamiento para electroforesis bidimensional:** Tris-HCl 62,5 mM (pH=6,8), SDS 1% p/v, sacarosa 20% p/v, 2-mercaptoetanol 0,2 M.

**Patrones de proteínas de baja masa molecular (LMW):** Los patrones LMW utilizados en las corridas de electroforesis y para el cálculo de las masas de los polipéptidos fueron: fosforilasa b (97 kD); albúmina (66 kD); ovoalbúmina (45 kD); anhidrasa carbónica (30 kD); inhibidor de tripsina (20,1 kD) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kD) (GE Healthcare, Inglaterra). Las proteínas patrón fueron solubilizadas en 200  $\mu$ l de buffer de muestra desnaturizante con  $\beta$ -mercaptoetanol. Se construyeron curvas de calibración relacionando el factor distancia recorrida por las distintas proteínas, con el logaritmo de su peso molecular.

### 1.7.2 Extracción de las proteínas

La extracción de proteínas de las muestras de gluten y masa liofilizadas fue realizada por duplicado con buffer Trisma base 0,0625 M (pH 10) para las electroforesis NATIVE-PAGE (sólo se realizó para las muestras de masa), SDS-PAGE y 2D-SDS-PAGE (sólo se realizó para las muestras de gluten). Para estas dos últimas técnicas no se agregó SDS al buffer para evitar que este agente desnaturizante interfiera en la interacción que se genera entre los emulsificantes y las proteínas del gluten. En la electroforesis MS-SDS-PAGE se utilizó el buffer Trisma HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 2% p/v, Glicerol 10% v/v, Azul de bromofenol 0,01% p/v.

La cantidad de muestra utilizada en cada electroforesis fue la siguiente:

- NATIVE-PAGE: 80 mg masa/mL buffer
- SDS-PAGE: 30 mg gluten/mL buffer y 80 mg masa/mL buffer
- 2D-SDS-PAGE: 50 mg gluten/mL buffer
- MS-SDS-PAGE: 30 mg gluten/mL buffer y 60 mg masa/mL buffer

Todas las muestras, antes de ser sembradas en el gel correspondiente, se centrifugaron a 9.350 x g durante 15 min a 4 °C en microcentrífuga IEC-Centra MP4R (EUA). El sobrenadante fue mezclado en partes iguales con el buffer de muestra 4x correspondiente (a excepción de las muestras para MS-SDS-PAGE que ya quedaron listas para ser sembradas). Los sobrenadantes se sembraron a razón de 40  $\mu$ g de proteína/calle.

### **1.7.3 Desarrollo**

Todas las electroforesis se realizaron en miniplacas con un equipo BIO-RAD, modelo Mini-Protean III (Inglaterra). Se utilizó el sistema de buffers descrito anteriormente. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 200 V durante aproximadamente 1,5 h.

### **1.7.4 SDS-PAGE**

Se preparó un gel de poliacrilamida de 1,0 mm de espesor, formado por un gel separador de concentración constante de acrilamida/bisacrilamida (30,8%) 12% p/v y un gel apilador (stacking) en su parte superior (acrilamida 4% p/v). Se utilizó un peine de 10 calles en las cuales se sembraron 20  $\mu$ l de cada muestra en cada calle y 4  $\mu$ l del patrón de LMW de proteínas.

### **1.7.5 NATIVE-PAGE**

Para el caso de la electroforesis nativa se preparó un gel de poliacrilamida de 6% p/v, sin el agregado de SDS. Se siguió la misma metodología utilizada para SDS-PAGE.

### **1.7.6 2D-SDS-PAGE**

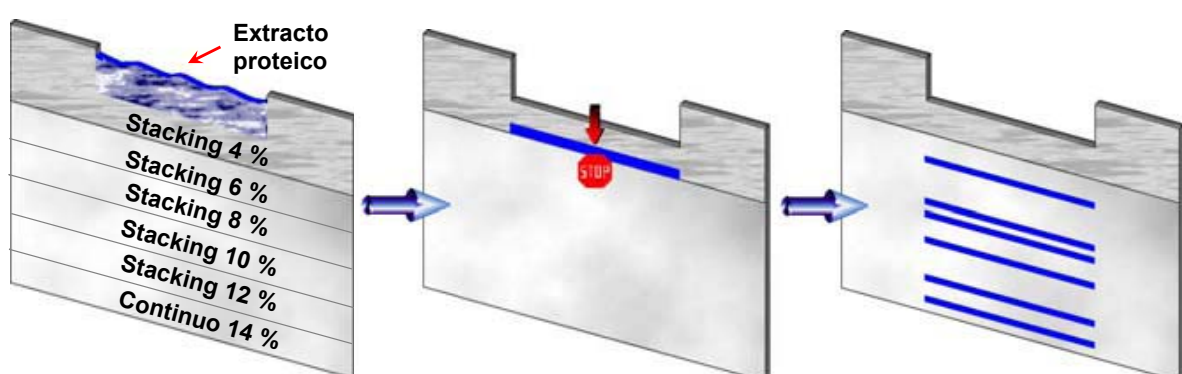
Para la primera dimensión de esta técnica se preparó un gel de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor, con un gel continuo de acrilamida al 12% (p/v) y con un gel apilador de 4% (p/v) de acrilamida. Se utilizó un peine de 10 calles en las cuales se sembraron 15  $\mu$ l de muestra en cada calle y 4  $\mu$ l del patrón de LMW de proteínas. Una vez corrido el gel se cortaron las calles y se colocaron en vasos de precipitado de 25 mL que contenían 5 mL de buffer de tratamiento (descrito en el Inciso 1.7.1). Se calentó en baño de agua a 55 °C durante 30 minutos, agitando y realizando

cambio de buffer cada 10 minutos. La porción de gel tratado se reservó para montarlo en el tope de gel de la segunda dimensión. Para la segunda dimensión se preparó un gel continuo de 1 mm de espesor con iguales proporciones de acrilamida que en la primera dimensión. Se utilizó un peine de una sola calle en la cual se colocó en posición horizontal la porción de gel corrida en la primera dimensión y previamente tratada con el reductor (2-mercaptoetanol); luego se corrió como una electroforesis monodimensional.

### 1.7.7 MS-SDS-PAGE

Las proteínas se extrajeron con el buffer de muestra sin el agregado de 2-mercaptoetanol durante 2,5 hs a temperatura ambiente. Las muestras fueron calentadas a ebullición durante 3 min (Ribotta y col., 2001). Se centrifugó en microcentrífuga IEC-Centra MP4R (EUA) a 9.350 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante quedó listo para ser sembrado.

Las proteínas extraídas fueron separadas en un gel preparativo (1 mm de espesor) compuesto por un multistacking de 4, 6, 8, 10 y 12% (p/v de poliacrilamida) y un continuo de 14% (p/v) (Figura 1.4). Se utilizó un peine de una calle en la cual se sembraron 250  $\mu$ l de muestra.



**Figura 1.4.** Esquema representativo de una electroforesis multistacking.

Cada stacking y la porción continua fueron cortados y las proteínas fueron extraídas de cada fracción con el mismo buffer al que se le incorporó 5% de 2-mercaptoetanol durante 48 hs a temperatura ambiente. Las muestras fueron



calentadas en baño de agua hirviendo durante 10 min (1ª dimensión). Las proteínas reducidas fueron eluidas de las tiras de gel y analizadas en un gel electroforético de iguales características que el utilizado en SDS-PAGE (2ª dimensión) (Puppo y col., 2005).

### **1.7.8 Coloración**

Los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,192% p/v en agua/metanol/ácido acético (10:10:4) durante 12 h y desteñidos con etanol 25% p/v y ácido acético 10% p/v a temperatura ambiente.

### **1.7.9 Obtención de las imágenes y análisis de los geles**

Las imágenes de las electroforesis fueron digitalizadas con un scanner HP Scanjet 4070 Photosmart (Hewlett Packard, EUA), mientras que el análisis de las masas moleculares se realizó con el programa Sigma-Gel versión 1.0 (Jandel Scientific, EUA).

## **1.8 Análisis de Gliadinas y Gluteninas**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es otra de las técnicas de separación de proteínas utilizada frecuentemente. Es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) es la cromatografía más frecuentemente utilizada para analizar las proteínas del gluten (gliadinas y gluteninas) debido a su alto poder de resolución. Además, posee la ventaja de ser una metodología rápida, reproducible y sensible. En RP-HPLC las proteínas se separan principalmente de acuerdo a su hidrofobicidad superficial (Lookhart y col., 2003). Esta técnica se complementa con la electroforesis en gel, la cual está basada en la separación de

proteínas según su tamaño o carga (Bietz, 1983; Lookhart y Albers 1988). La RP-HPLC ha sido utilizada para estudiar la acumulación de proteínas durante el desarrollo del grano de trigo (Gupta y col., 1996; Huebner y col., 1990), para realizar la identificación de variedades de trigo (Huebner y Gaines, 1992; Huebner y col., 1995), para predecir la calidad de las harinas (Hay, 1993; Lafiandra y col., 1993) y para estudiar las interacciones entre los distintos componentes de masas elaboradas con harina de trigo (Koehler, 2003; Hanft y Koehler, 2006). De esta manera se puede estudiar indirectamente si los aditivos provocan un cambio estructural en el gluten en base al estudio del porcentaje de extracción de las distintas fracciones de gliadinas y gluteninas.

### **1.8.1 Extracción de Fracciones proteicas**

El procedimiento de extracción fue el siguiente:

✓ **Fracción de Gliadinas:**

Se pesaron 100 mg de muestra liofilizada (masa o gluten) en un eppendorff de 2 mL y se agregó 1 mL de solución 1-propanol 50% v/v en agua destilada. Se agitó en vórtex durante 5 min y se centrifugó a 15.700 x g durante 5 min a temperatura ambiente en microcentrífuga Eppendorf 5415 D (Alemania). El sobrenadante que contenía la fracción enriquecida en gliadinas se reservó refrigerado a 4 °C para su posterior análisis por RP-HPLC.

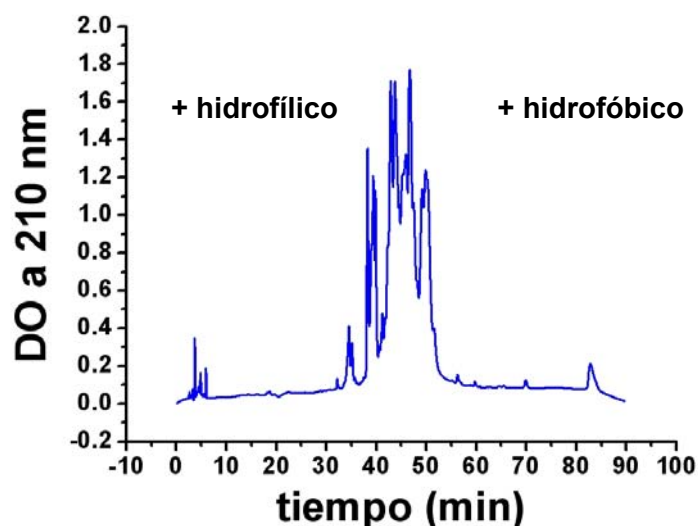
✓ **Fracción de Gluteninas:**

Las gluteninas fueron extraídas del precipitado obtenido anteriormente con 1 mL de la solución utilizada inicialmente a la cual se le agregó 1% (p/v) de ditionitrotol (DTT). Se agitó en vórtex y se centrifugó en las mismas condiciones utilizadas para gliadinas a 15.700 x g durante 8 min a temperatura ambiente en microcentrífuga Eppendorf 5415 D (Alemania). El sobrenadante, que contenía la fracción enriquecida de gluteninas, se analizó por RP-HPLC (Lookhart y col., 2003).

Ambos ensayos fueron realizados por duplicado.

### 1.8.2 Separación de Fracciones

Para separar y caracterizar las gliadinas y gluteninas se utilizó un equipo Waters 996 (Millipore Corp., Massachusetts, EUA) con una columna Sephasil Peptide ( $C_8$  12  $\mu$ , 250 x i.d. 4,6 mm) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las proteínas fueron eluidas a 70 °C y 1 mL/min con un gradiente agua-acetonitrilo (75%-25%) durante 90 min. Las proteínas fueron detectadas a 210 nm con un detector de arreglo de diodos UV (WATERS, modelo 996, Millipore Corp., Milford, MA, EUA). Todas las muestras fueron analizadas al menos por duplicado. A partir de los cromatogramas obtenidos (Figura 1.5) se calcularon las áreas de los diferentes picos de cada muestra mediante el software Empower 2002 (WATERS, Millipore Corp., Milford, MA, EUA).



**Figura 1.5.** Cromatograma representativo de proteínas de gluten (Gluteninas).

### 1.9 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido conocida como SEM (Scanning Electron Microscopy) nos proporciona información complementaria sobre el material que estamos investigando. En un microscopio SEM, un haz de electrones incide sobre la superficie de una muestra determinada, produciéndose así varios fenómenos (reemisión de una parte de la radiación incidente, emisión de luz, electrones secundarios, rayos X, etc.). Todas estas señales se pueden emplear para obtener

información sobre la naturaleza de la muestra como puede ser morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica. En el caso de masas, permite visualizar el tipo de estructura del gluten y la disposición de los gránulos de almidón en la matriz.

Las características microestructurales de las muestras de gluten con emulsificante (0 y 1% p/p) y masa (0 y 5% p/p) fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un microscopio JEOL 35 CF (Japón). Pequeñas piezas de muestra se fijaron en glutaraldehído al 2,5% y seguidamente se sumergieron en una serie de disoluciones de acetona y finalmente en acetona al 100% para asegurar una deshidratación completa. Luego, las muestras fueron desecadas por punto crítico. Las muestras desecadas fueron cubiertas con partículas de oro formando una película y evaluadas en el microscopio.

## **1.10 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Todos los ensayos se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido TA Instrument Mod. Q100 (EUA). La calibración del equipo se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min usando como patrones indio, ácido láurico y esteárico. Los ensayos se llevaron a cabo en cápsulas de aluminio herméticamente selladas y se utilizó como referencia una cápsula vacía.

### **1.10.1 Determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ )**

Según reportes previos, las sustancias que interactúan con el gluten pueden afectar su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la cinética de las reacciones de entrecruzamiento afectando la formación de la red de gluten (Kalichevsky y col., 1992; Noel y col. 1995; Pommet y col. 2003). Los “shortenings” aumentan la temperatura de transición vítrea del gluten (Levine y Slade, 1987), mientras que los ácidos grasos de bajo peso molecular tienen un efecto plastificante causando una disminución en la  $T_g$  del gluten (Kalichevsky y col., 1992). Teniendo en cuenta los antecedentes citados anteriormente se decidió evaluar el efecto de los

emulsificantes SSL y DATEM en la temperatura de transición vítrea del gluten. Todos los ensayos fueron efectuados por triplicado.

Los ensayos fueron realizados sobre:

- a)** Muestras de gluten liofilizadas.
- b)** Muestras de gluten liofilizado (sin y con emulsificante) reconstituido con agua según la humedad del gluten control recién elaborado (67,2%).
- c)** Mezcla de gluten liofilizado-emulsificante reconstituida con agua in situ según la humedad mencionada en el Inciso b.

Las muestras de gluten liofilizado (a) fueron preparadas según lo descrito en el Inciso 1.3. Los niveles de emulsificantes utilizados en los ensayos a y b fueron de 0,25; 0,5 y 1%, mientras que para las mezclas preparadas in situ (c) se decidió utilizar el nivel de 1% p/p y el mayor nivel de emulsificante utilizado en masas (5% p/p) con la finalidad de tener cantidad suficiente de aditivo para producir cambios estructurales en el gluten. En los ensayos b y c las muestras fueron preparadas de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación:

Se pesó el gluten control liofilizado en eppendorff de 1,5 mL y se agregó la cantidad de emulsificante correspondiente. Se agitó en vórtex para homogeneizar la mezcla. Luego se adicionó la cantidad de agua de acuerdo a la humedad del gluten control (67,2%) y se mezcló hasta formar el gluten. Se dejó reposar la muestra 48 horas a 4 °C hasta el momento del ensayo.

Las condiciones de ensayo fueron las siguientes:

Para las muestras de gluten liofilizado se realizó un barrido de temperaturas de -50 a 180 °C a una velocidad de 5 °C/min. Mientras que para las muestras de gluten liofilizado reconstituido con agua (Incisos b y c) el barrido fue realizado entre -30 a 40 °C a una velocidad de 2 °C/min.

Las cantidades de muestra utilizada para los ensayos realizados con gluten liofilizado y gluten liofilizado reconstituido (Incisos b y c) fueron de aproximadamente 5 y 15 mg, respectivamente. La temperatura de transición vítrea (Tg) fue determinada como el punto medio del cambio en la capacidad calorífica de cada muestra.

### **1.10.2 Gelatinización y retrogradación del almidón**

La evaluación del comportamiento térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es uno de los ensayos más utilizado para el estudio de retrogradación del almidón y envejecimiento del pan (Russell, 1983; LeMeste y col., 1992; Champenois y col., 1995; Vodovotz y col., 1996; Baik y Chinachoti, 2000). Esta técnica aporta medidas cuantitativas de los cambios estructurales que experimenta el pan a lo largo del proceso de envejecimiento (Karim y col., 2000; Hassan y col., 2006).

Para evaluar la interacción de los emulsificantes con el almidón, se ensayaron dos procesos:

#### **✓ Gelatinización de almidón**

Se analizó el proceso de gelatinización de almidón así como el de disociación del complejo amilosa-lípido a partir de masa fresca preparada según Inciso 1.4. Se colocó una pequeña porción de masa en una cápsula para DSC. Se calentó en el calorímetro a temperaturas similares a las medidas en el centro de la miga durante el proceso de horneado, con el objetivo de simular dicho proceso en el calorímetro (León y col., 1997). Se determinó las temperaturas y entalpías de gelatinización y las correspondientes a la disociación del complejo amilosa-lípido. Los ensayos se efectuaron por duplicado.

#### **✓ Retrogradación de almidón**

Para evaluar la retrogradación de la amilopectina, las masas gelatinizadas en las cápsulas de DSC se dejaron enfriar, y se almacenaron por diferentes períodos de tiempo (1, 3 y 7 días) a  $20 \pm 2$  °C. Las muestras se calentaron nuevamente en el calorímetro y se determinó la temperatura y entalpía del proceso.

Tanto las temperaturas de transición vítrea como las temperaturas y entalpías de gelatinización y retrogradación fueron calculadas con el software TA Instruments

Universal Analysis 2000 (Versión 4.2E, EUA). Los ensayos se realizaron por duplicado.

## **1.11 Caracterización Reológica de Masas**

### **1.11.1 Ensayos Alveográficos y Farinográficos**

Se estudió la aptitud panadera de las mezclas harina-emulsificantes, mediante ensayos empíricos alveográficos y farinográficos. Los ensayos se realizaron por duplicado y en forma análoga a los descritos en las secciones 1.1.5 y 1.1.6. En los ensayos farinográficos las muestras fueron preparadas con 2% p/p de sal (b.h.).

### **1.11.2 Propiedades Texturales de las Masas**

#### ***Elaboración de masas***

Las muestras fueron elaboradas en base a la siguiente formulación: cada 100 g de harina se utilizaron 2 g de NaCl, 0,5%, 1% y 5% p/p (b.h.) de los emulsificantes SSL, DATEM y mezcla de SSL:DATEM 1:1. La cantidad de aditivo de 5% se utilizó sólo con fines experimentales. Se empleó como control una masa sin aditivo. Se agregó la cantidad de agua óptima para cada tipo de mezcla (agua farinográfica). Las muestras fueron amasadas durante su tiempo óptimo de desarrollo. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Los ensayos de perfil de textura y relajación se realizaron en el equipo TA-XT2i - Stable Micro Systems (Haslemere, Surrey, Inglaterra). Para ello, una vez obtenida la masa se laminó hasta 1,0 cm de espesor y se cortaron discos de 3,0 cm de diámetro. Los parámetros texturales fueron medidos utilizando una sonda cilíndrica SMS P/75 de acero inoxidable de 75 mm de diámetro, un plato inferior con círculos concéntricos para reducir deslizamiento y una celda de carga de 25 kg.

## **Análisis de Perfil de Textura**

La textura involucra todos los atributos reológicos y estructurales de un alimento, que son perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles y, cuando corresponde, visuales y auditivos. La evaluación objetiva de la textura es compleja pues ella debe reflejar la acción de la boca, la lengua y mandíbulas al mover el alimento y la acción de los dientes al cortar, romper, extender, moler y succionar los alimentos. Existen numerosas formas de evaluar la textura de los alimentos. Los ensayos de gran deformación y las propiedades de fractura de los alimentos sólidos y semisólidos son muy importantes para la evaluación de su respuesta al procesamiento, manipuleo, almacenamiento, uso y respuesta durante el consumo. Muchos de los ensayos usados involucran el someter al material a esfuerzos, lo cual determina una deformación que se mide; o bien deformar controladamente el material y evaluar el esfuerzo requerido. La masticación se puede estudiar mediante ensayos de Análisis de Perfil de Textura (TPA, Texture Profile Analysis) del alimento en cuestión. Este ensayo se realiza en un texturómetro en el que se simula el proceso de masticación y consiste en comprimir la muestra dos veces en movimientos consecutivos. A partir de la curva fuerza vs. tiempo obtenida pueden calcularse diferentes parámetros tales como: la Dureza que representa la resistencia que presenta el alimento a la primer mordida, la Consistencia que se relaciona con la resistencia total que presenta un alimento durante la masticación, la Adhesividad que sería el trabajo necesario que se debe realizar con la lengua para retirar el alimento que se adhiere al paladar y los dientes, la Cohesividad que se corresponde con la fuerza de interacción que mantiene unidas las partículas que forman el cuerpo del producto y por último la Elasticidad que se asocia al grado de recuperación de las dimensiones iniciales que experimenta el alimento después de retirar la fuerza de compresión (Steffe, 1996 a; Bourne, 2002).

El comportamiento macroestructural de la masa depende de las condiciones de proceso durante su formación, sus componentes y la interacción que exista entre ellos. Es por ello que el análisis de perfil de textura de las masas es de suma importancia, ya que aporta información sobre la influencia que ejercen los diferentes componentes en la masa, permite el control de calidad del producto final y orienta el



diseño y la adaptación de nuevas tecnologías de proceso (Rodríguez-Sandoval y col., 2005).

Se realizó un ensayo de perfil de textura - TPA (Texture Profile Analysis) sobre los discos de masa mediante un método modificado de TPA (40% deformación). La velocidad de la sonda utilizada fue de 0,5 mm/seg. Las muestras fueron analizadas por duplicado y se midieron al menos 10 discos de masa para cada muestra. Los parámetros analizados fueron Dureza, Consistencia, Adhesividad, Cohesividad y Elasticidad. La Dureza se calculó como la fuerza máxima registrada durante el primer ciclo de compresión ( $F_1$ ) y la Consistencia como la suma de las áreas del primer y segundo pico ( $A_1+A_2$ ). La Adhesividad es el área negativa obtenida durante el primer ciclo ( $A_3$ ), mientras que la Cohesividad es el cociente entre el área del segundo pico y el área del primero ( $A_2/A_1$ ). La Elasticidad se calculó como la relación  $d_2/d_1$ , donde  $d_2$  es la distancia recorrida por la sonda durante la compresión en el segundo ciclo, mientras  $d_1$  es dicha distancia recorrida en el primer ciclo (Figura 1.6).

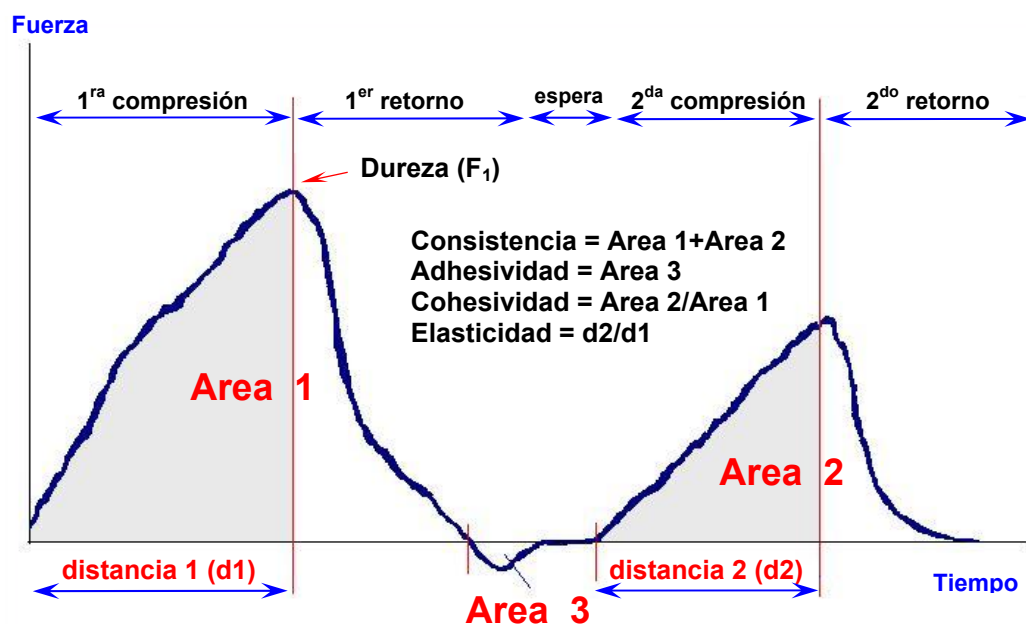


Figura 1.6. Curva típica obtenida en el ensayo de TPA y sus respectivos parámetros.

### Ensayos de Relajación

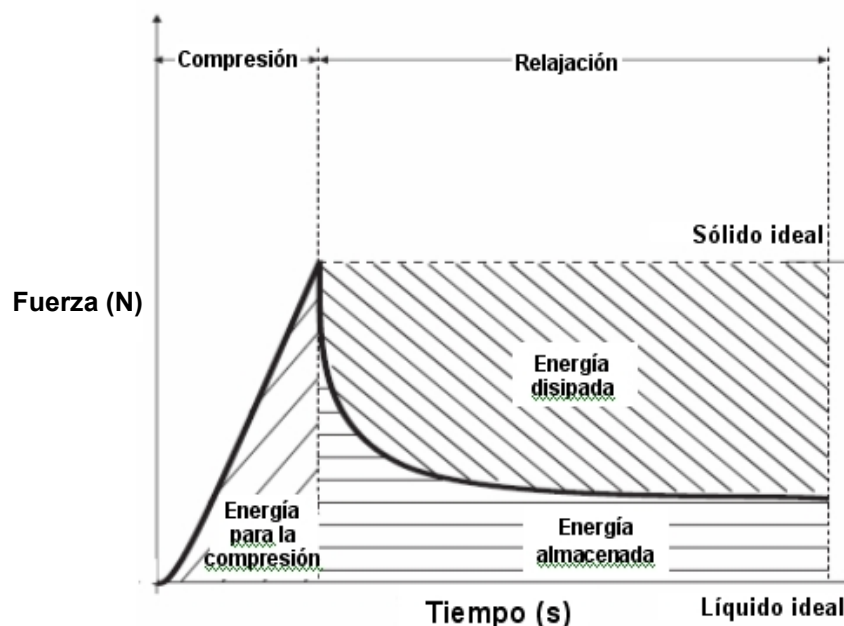
En los experimentos de relajación, la muestra es comprimida hasta un nivel

predeterminado de deformación. Luego la deformación es mantenida constante durante un cierto tiempo, y durante dicho período el material viscoelástico experimenta un decaimiento de la fuerza/esfuerzo en función del tiempo (Figura 1.7). Un cuerpo viscoso ideal no puede mantener la fuerza/esfuerzo en ausencia de movimiento y, por lo tanto, alcanza el nivel más bajo de la curva, mientras que un sólido elástico ideal es capaz de mantener el esfuerzo inicial aplicado. Por lo tanto, un material viscoelástico tal como puede ser una masa de harina de trigo, mostrará un comportamiento intermedio entre estos dos casos extremos (Yadav y col., 2006) (Figura 1.7).

El fenómeno de relajación es el resultado de una reorientación estructural y molecular del sistema. La curva de relajación no lineal, es una función del tiempo ( $t$ ) y de la deformación aplicada ( $\varepsilon$ ) (Ec. 1.6). A una deformación constante, la fuerza depende sólo del tiempo.

$$F = f(\varepsilon, t)$$

**Ec. 1.6**

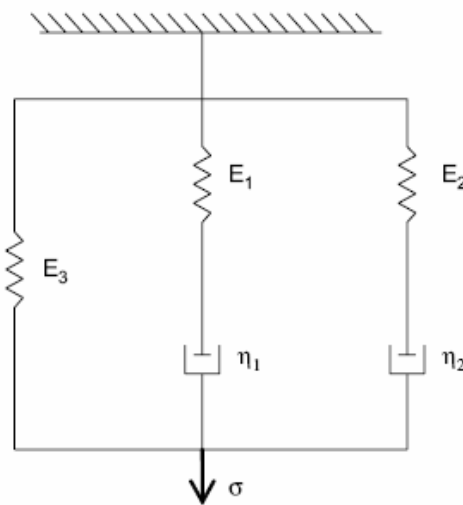


**Figura 1.7.** Diagrama de compresión-relajación no lineal de un cuerpo viscoelástico.

Varios autores han demostrado que tiempos de relajación lentos están asociados a una buena calidad panadera (Bloksma, 1990; Launay, 1990; Wang y Sun, 2002). El estudio del comportamiento de la masa durante el ensayo de relajación provee información que puede ser relacionada con el desempeño de la misma durante el

proceso de panificación (Safari-Ardi y Phan-Thien, 1998; Wikström y Eliasson, 1998).

Los ensayos de relajación, al igual que el TPA, fueron realizados al 40% de deformación. La velocidad de la sonda utilizada fue de 0,5 mm/seg. Cuando se alcanzó el nivel de compresión deseado, se detuvo la sonda y se dejó relajar la masa durante 1200 s. Se colocó grasa siliconada en los laterales de la muestra para evitar la deshidratación durante el ensayo. Se midió la fuerza en función del tiempo de relajación. Las muestras fueron ensayadas por duplicado y se midieron al menos 3 discos de masa para cada muestra. Para interpretar el esfuerzo de relajación de materiales viscoelásticos, frecuentemente se utiliza un modelo generalizado de Maxwell (Hassan y col., 2005; Lima y Singh, 2001). El modelo seleccionado como análogo mecánico para el esfuerzo de relajación de masas incluye dos elementos de Maxwell, cada uno conteniendo un resorte y un amortiguador en serie, y un resorte aislado combinado en paralelo (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Modelo de Maxwell aplicado a masa de harina de trigo.

Según este modelo, el esfuerzo total ( $\sigma$ ) es la suma de los esfuerzos individuales correspondientes a cada elemento (Ec. 1.7).

$$\sigma = f(t) = A_1 \cdot \exp(-tE_1 / \eta_1) + A_2 \cdot \exp(-tE_2 / \eta_2) + \gamma_0 E_0 \quad \text{Ec. 1.7}$$

La ecuación 1.7 también puede escribirse de la siguiente manera (Ec. 1.8).

$$\sigma = f(t) = A_1 \cdot \exp(-t / \lambda_{rel1}) + A_2 \cdot \exp(-t / \lambda_{rel2}) + \sigma_e \quad (\text{con } \lambda_{rel} = \eta/E) \quad \text{Ec. 1.8}$$

donde:

$\sigma$  = esfuerzo (Pa)

A = factores pre-exponenciales ( $A = \gamma_0 \cdot E$ )

t = tiempo (s)

E = módulo de esfuerzo de relajación (Pa)

$\eta$  = viscosidad (Pa.s)

$\gamma_0$  = deformación aplicada (-)

$\lambda_{rel}$  = tiempo de relajación (s)

$\sigma_e$  = esfuerzo en el equilibrio (Pa)

Según lo expresado anteriormente, cada elemento estará caracterizado por coeficientes diferentes.

Las ecuaciones anteriores pueden ser expresadas en términos de módulo de relajación (E) dividiendo cada una por la deformación aplicada ( $\gamma_0$ ) (Ec. 1.9):

$$E(t) = E_1 \cdot \exp(-t / \lambda_{rel1}) + E_2 \cdot \exp(-t / \lambda_{rel2}) + E_3 \quad \text{Ec. 1.9}$$

Para  $t = 0$ , E(t) se convierte en (Ec. 1.10):

$$E(0) = \sigma_0 / \gamma_0 = E_1 + E_2 + E_3 \quad \text{Ec. 1.10}$$

Esto significa que el módulo E a tiempo 0 es igual a la suma de los módulos elásticos de los tres resortes de Maxwell. Para tiempo largos ( $t = 1200$  s), E(t) se convierte en el esfuerzo residual  $E_3$  (Ec. 1.11):

$$E(\infty) = E_3 \quad \text{Ec. 1.11}$$

Aplicando el modelo se obtuvieron los parámetros módulos de relajación  $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$  y los tiempos de relajación  $\lambda_{rel1}$  y  $\lambda_{rel2}$ , donde E está relacionado con la elasticidad y  $\lambda_{rel}$  con el grado de relajación de la masa.

## Ensayos de Viscoelasticidad

Las medidas de viscoelasticidad de la masa, en condiciones de linealidad, es decir, a bajas deformaciones, permite analizar la elasticidad que posee la misma. Esa elasticidad está directamente relacionada con la estructura del gluten formado en la masa. La reometría dinámica es una técnica utilizada para medir las propiedades elásticas y viscoelásticas de diferentes alimentos, entre ellos las masas, en escala de pequeñas y de grandes deformaciones (rango lineal y no lineal, respectivamente). Las masas son materiales viscoelásticos y las medidas oscilatorias proveen un método no destructivo para determinar la contribución viscosa y elástica de la viscoelasticidad. El equipo utilizado para estudiar la viscoelasticidad es el reómetro. En este tipo de ensayos la muestra se somete a una deformación de corte oscilatoria, cuya expresión matemática es una función sinusoidal (Ec. 1.12), en la cual la amplitud del esfuerzo se determina midiendo el torque que se transmite a la muestra por la deformación impuesta. Este esfuerzo es también una función sinusoidal que puede estar desfasada respecto a la deformación aplicada en un ángulo que va de 0 a 90 °C (Ec. 1.13). El esfuerzo de un material puramente viscoso (fluido newtoniano) sufre un desfase de 90° ( $\delta = 90^\circ$ ) con respecto a la deformación impuesta, mientras que el esfuerzo de un material puramente elástico no se desfasa con respecto a la deformación aplicada ( $\delta = 0^\circ$ ). El material viscoelástico por ende tiene un ángulo de desfase ( $\delta$ ) que estará comprendido entre 0 y 90° (Steffe, 1996 b).

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad \text{Ec. 1.12}$$

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad \text{Ec. 1.13}$$

donde:

$\gamma$  = deformación (-)

$\gamma_0$  = amplitud de la deformación (-)

$\omega$  = frecuencia (Hz o rad/seg)

t = tiempo (seg)

$\sigma$  = esfuerzo (Pa)

$\sigma_0$  = amplitud del esfuerzo (Pa)

$\delta$  = ángulo de desfase (°)

Los parámetros fundamentales de importancia son el módulo de almacenamiento o elástico ( $G'$ ) que es la medida de la energía que es elásticamente almacenada por el material (Ec. 1.14), el módulo de pérdida o viscoso ( $G''$ ) que es la medida de la energía disipada por el flujo (Ec. 1.15) y la tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta = G''/G'$ ) entre el estímulo sinusoidal aplicado y la respuesta sinusoidal obtenida del material (Ec. 1.16). Si estos parámetros se determinan en condiciones de viscoelasticidad lineal para el material en cuestión, sus valores serán propios del material y no dependerán de la historia de deformación del mismo.

$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cos(\delta) \quad \text{Ec. 1.14}$$

$$G'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \sin(\delta) \quad \text{Ec. 1.15}$$

$$\tan(\delta) = G'' / G' \quad \text{Ec. 1.16}$$

Los ensayos de reología proveen información esencial sobre cómo la composición de la harina y los demás ingredientes que constituyen la masa influyen en la viscoelasticidad de la misma y consecuentemente en las condiciones de elaboración de pan y las características de los productos terminados.

Para los ensayos de viscoelasticidad se efectuaron medidas oscilatorias dinámicas en un reómetro de esfuerzo controlado RS600 (Haake, Alemania) usando un sensor de platos paralelos con un gap de 1,5 mm. Una vez que la muestra fue colocada en el reómetro y comprimida a 1,5 mm, se retiró el exceso de masa con un elemento cortante. Se colocó grasa siliconada para evitar deshidratación durante el ensayo. Se utilizó un rotor cilíndrico dentado PP 35/S de 35 mm de diámetro y un plato inferior dentado D 35/S. Todos los ensayos se realizaron a temperatura constante de 25°C.

La muestra fue sometida a los siguientes ensayos:

- ✓ **Barrido de esfuerzo.** Se realizó un barrido de esfuerzo (0,5 a 200 Pa) para determinar la zona de viscoelasticidad lineal de las masas ensayadas, esto es, donde se verifica que la pendiente de la línea esfuerzo ( $\sigma$ ) vs deformación ( $\gamma$ ) es

constante. Se trabajó a frecuencia constante de 1 Hz. Se registró el módulo complejo  $G^*$  (Ec. 1.17) en función del esfuerzo (Figura 1.9).

$$G^* = \sigma_0 / \gamma_0 = [(G')^2 + (G'')^2]^{1/2} \quad \text{Ec. 1.17}$$

Tanto  $G^*$  como  $G'$  y  $G''$  permanecen constantes dentro del rango de viscoelasticidad lineal, pero existe un valor crítico de esfuerzo ( $\sigma_{\text{límite}}$ ) a partir del cual ambos módulos disminuyen, evidenciando que existe ruptura de la estructura (Figura 1.9).

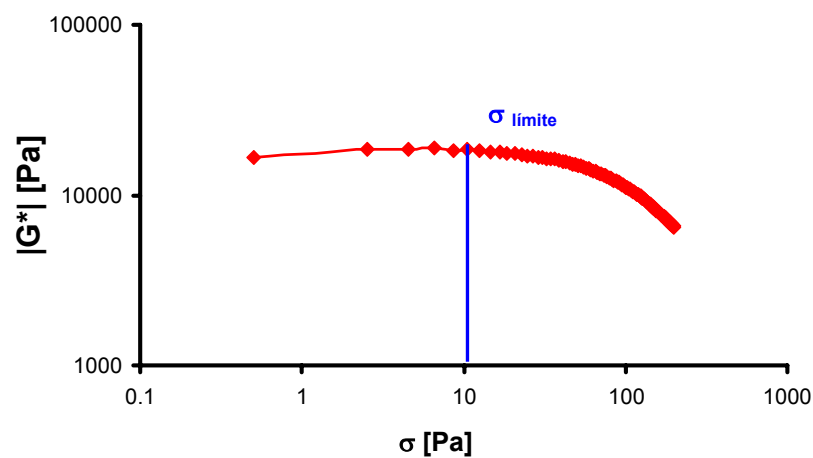


Figura 1.9. Barrido de esfuerzo representativo de una masa.

- ✓ **Barrido de frecuencia.** Permite caracterizar la variación de las componentes viscosa y elástica de la muestra en función de la frecuencia de deformación aplicada, que varía con el tiempo. Para ello se trabajó en un rango de frecuencia de 0,005 a 100 Hz en el rango lineal de deformación, que se logró aplicando un esfuerzo de 5 Pa (Figura 1.10). Los parámetros determinados fueron el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) y la tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta$ ).

En ambos ensayos, las muestras fueron realizadas por duplicado y se midieron al menos 3 discos de masa para cada ensayo.

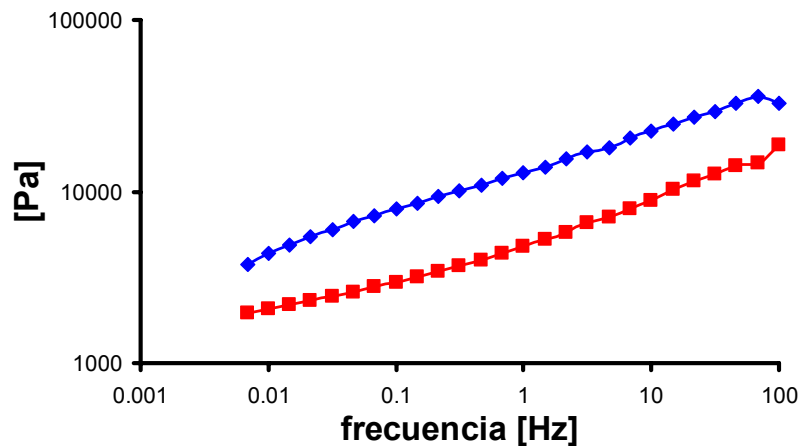


Figura 1.10. Barrido de frecuencia representativo de una masa. ◆ G', ■ G''.

## 1.12 Evaluación de calidad de los panes

### 1.12.1 Curvas de fermentación

La capacidad de expansión de las masas se determinó mediante la realización de curvas de fermentación. De esta manera se estableció el tiempo óptimo de fermentación de los panes. Para realizar el ensayo se utilizaron probetas graduadas de 500 mL de 5 cm de diámetro. En dichas probetas se colocaron piezas esféricas de masa de 50 g preparadas en base a la siguiente formulación: cada 100 g de harina se utilizaron 2 g de NaCl, 3 g de levadura prensada, 0,5% y 1% (base harina) de los emulsificantes SSL, DATEM y mezcla de SSL:DATEM 1:1. Se agregó la cantidad de agua óptima para cada tipo de mezcla (agua farinográfica). Se utilizaron 2 probetas por cada muestra y los ensayos fueron realizados por duplicado. Las mismas se colocaron dentro de una cámara de fermentación Rotar (Britos Hnos., Argentina) programada a 30 °C y se registró el aumento de volumen cada 10 min hasta obtener volumen constante. Se graficaron curvas de volumen de crecimiento de la masa (mL) en función del tiempo de fermentación (min), para ello se utilizó el programa SigmaPlot 9.0. Las curvas fueron ajustadas mediante la ecuación de Chapman para 3 parámetros (Ec. 1.18). Se analizaron el volumen máximo desarrollado y el tiempo necesario para obtener dicho volumen. Las curvas se realizaron por duplicado.



$$Y = a*[1 - \exp(-bx)]^c$$

**Ec. 1.18**

donde:

Y= variación de volumen de masa (mL)

x = tiempo de fermentación (min)

a = volumen máximo ocupado por la masa (mL)

b = constante de velocidad de aumento de volumen de masa

$V_{opt} = \frac{3}{4} a$  = volumen óptimo (mL)

$t_{opt}$  = tiempo utilizado en alcanzar el volumen óptimo ( $V_{opt}$ ) (min)

c = parámetro relacionado con el punto de inflexión y la forma de la curva

### 1.12.2 Elaboración de los panes

La harina de trigo utilizada fue una harina tipo 000 (Molino Campodónico Ltd.). Esta harina es una harina de trigo pan (*Triticum aestivum L.*) que se utiliza para panificación.

Las piezas de panes fueron elaboradas de acuerdo a la formulación mencionada anteriormente (Inciso 1.12.1). El protocolo de amasado y horneado de las piezas fue el utilizado por Ribotta y col. (2004) adaptado a nuestras condiciones de laboratorio:

- ✓ Amasado de las masas durante su tiempo óptimo de desarrollo en amasadora Keenwood Major (Italia) a una velocidad de 90 rpm.
- ✓ Reposo de 10 min.
- ✓ Laminado de las masas en una laminadora Pastafácil (Argentina) con 0,5 cm de luz.
- ✓ Reposo de 10 min.
- ✓ División en piezas de 90 g y bollado de las mismas.
- ✓ Reposo de 10 min.
- ✓ Armado de las piezas de panes en armadora MPZ (Bs. As., Argentina).
- ✓ Fermentación de los panes en fermentadora durante los tiempos obtenidos en las curvas de fermentación.
- ✓ Horneado durante 26 minutos a  $200 \pm 10$  °C en horno Ariston XF 995.3 (Fabiano,

Italia).

Una vez retirados del horno los panes se dejaron enfriar durante 1 hora a temperatura ambiente antes de comenzar los ensayos.

Se elaboraron 12 piezas de panes por cada panificación y las muestras fueron realizadas por duplicado.

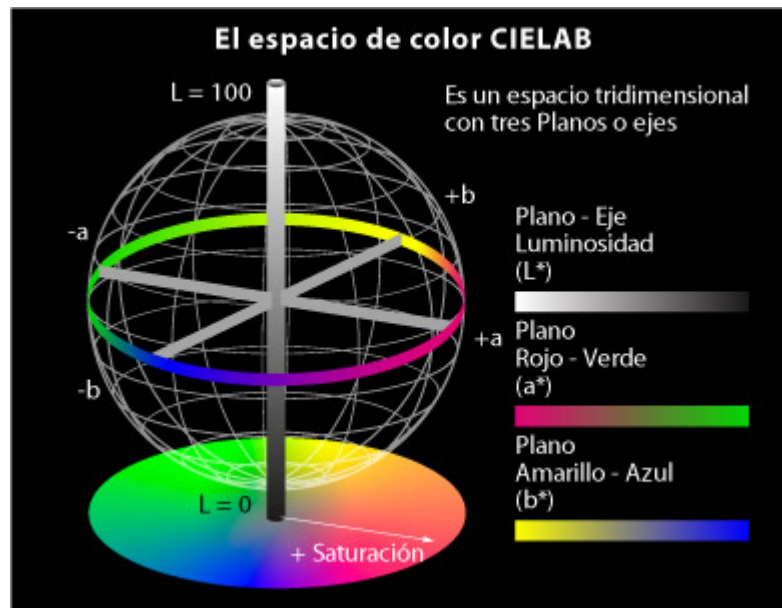
### **1.12.3 Volumen de pan**

El volumen de las piezas de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza en un medidor de volumen (Panvolumenómetro). Los resultados se expresaron en términos de volumen específico, el cual se obtuvo dividiendo el volumen de la pieza de pan por su peso.

### **1.12.4 Color de la corteza**

La determinación del color de la corteza del pan fue llevada a cabo a través de la utilización de un colorímetro de superficie Minolta CR 400 Series (Japón) calibrado con patrones estándares ( $Y = 93,2$ ,  $x = 0,3133$ ,  $y = 0,3192$ ). Como medida objetiva del color se utilizó el sistema CIELab (C.I.E., 1986), que define cada color a partir de tres coordenadas: luminosidad ( $L^*$ ) y de cromaticidad colorimétricas ( $a^*$  y  $b^*$ ). Las magnitudes  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  son adimensionales y se definen en función del tipo de estímulo y del blanco de referencia para tratar de simular a los observadores reales (Joshi y Brimelow, 2002). El corte del eje  $L^*$  con el plano que forman  $a^*$  y  $b^*$  es el punto acromático. El valor de  $a^*$  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 hacia los 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 hacia los valores negativos los azules (Figura 1.11).

Las mediciones se realizaron según el método 14-22 (AACC, 2000). A cada muestra de pan se le efectuaron 20 mediciones de color en la corteza, informándose el valor promedio.



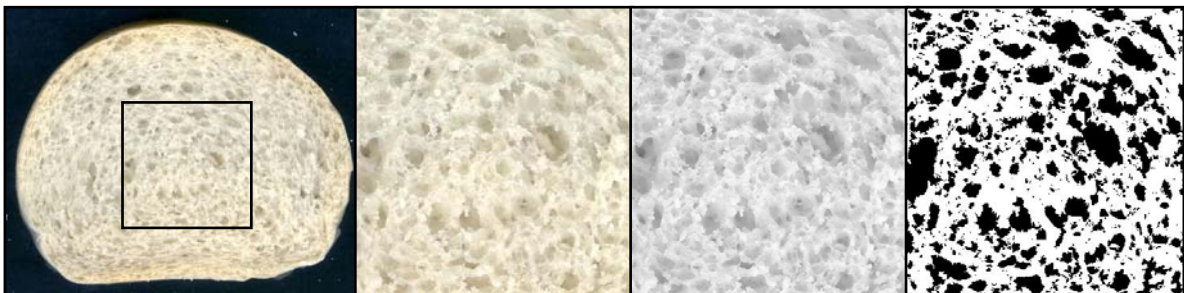
**Figura 1.11.** Representación gráfica del espacio CIELAB.

### 1.12.5 Alveolado de la miga

La estructura de la miga se puede evaluar a través de medidas de tamaño de alveolado, mediante el análisis de imágenes de la miga de pan. La imagen entera es fragmentada por un valor 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 binarizada). 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 de 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 gris, variando el nivel de gris hasta que la imagen conserve los rasgos fundamentales de la contraparte monocromática (Sapirstein y col., 1994; Tan y col., 1997).

La estructura de la miga se analizó sobre la región central de 2 rodajas (2 cm de espesor c/u) de pan y cada rodaja fue escaneada en un scanner HP Scanjet 4070 Photosmart (EUA). La imagen en formato JPEG se analizó con el analizador de

imágenes ImageJ 1.37v (EUA). Se seleccionó manualmente de la parte central de la rodaja un área de igual tamaño en todos los panes, que fue representativa de la miga total de cada rodaja. 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 realizó 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 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, alvéolos de aire) y 255 para las paredes de los alvéolos (blanco, miga de pan). Se asignó la categoría de objeto (celdas de aire) a aquellas zonas de la imagen que tenían una intensidad de gris entre 0 y el valor umbral que correspondiera a cada imagen. En la Figura 1.12 se muestra (de izquierda a derecha) el escaneo de la rodaja de pan, la selección de la parte central de la miga de pan, la transformación a escala de grises y por último la imagen binarizada.



**Figura 1.12.** Secuencia del procesamiento de imágenes para el análisis de alveolado de la miga.

Del análisis de las imágenes se obtuvieron los siguientes parámetros:

- ✓ **Área media de alveolo, AM:** área promedio de los alvéolos. Área de un alveolo = número de pixeles que hacen al alveolo multiplicado por el área de un píxel.
- ✓ **Número total de alvéolos, N:** cantidad de alvéolos por unidad de superficie de miga de pan.
- ✓ **Fracción de Área, FA:** porcentaje del área total que corresponde al área ocupada por los alvéolos. Relación entre el área total ocupada por los alvéolos y el área total seleccionada.

### **1.12.6 Textura de la miga**

La firmeza inicial de la miga se expresó como la fuerza necesaria para comprimir una rodaja de pan. Se realizó un ensayo de perfil de textura - TPA en un texturómetro TA.XT2i – *Stable Micro Systems* (Haslemere, Surrey, Inglaterra) sobre la miga de las rodajas de pan (2 cm de espesor) mediante un método modificado de TPA (40% deformación). Las muestras fueron realizadas por duplicado y se midieron al menos 10 rodajas de pan para cada muestra. Los parámetros analizados fueron Dureza, Consistencia, Cohesividad y Elasticidad. Estos parámetros fueron calculados según lo indicado en el Inciso 1.11.2. La textura de la miga fue medida bajo las siguientes condiciones de trabajo:

- sonda cilíndrica SMS P/25 de acrílico de 25 mm de diámetro para los ensayos.  
La velocidad de la sonda utilizada fue de 0,5 mm/seg.
- plato inferior con círculos concéntricos para reducir deslizamiento.
- celda de carga de 25 kg.

### **1.12.7 Humedad de la miga**

Se determinó la humedad de la miga por medida del contenido de agua luego de calentar la muestra en estufa a 135°C durante 2 hs. según el método AACC 44-19 (2000).

### **1.12.8 Estabilidad de los panes frente al almacenamiento**

Los panes elaborados se almacenaron a  $20 \pm 2$  °C para evaluar la estabilidad de los mismos. Se midieron los siguientes parámetros a diferentes períodos de almacenamiento (0, 1 y 3 días):

### **1.12.8.1 Textura de la miga**

Los perfiles de textura se realizaron de acuerdo a lo descrito en el Inciso 1.12.6 a las 24 y 72 horas de almacenamiento.

### **1.12.8.2 Retención de agua**

La capacidad de retención de agua de los panes almacenados se determinó por pérdida de humedad en estufa según lo descrito en el Inciso 1.12.7.

### **1.12.8.3 Retrogradación del almidón**

Se evaluó la retrogradación de la amilopectina según lo mencionado en el Inciso 1.10.2.

### **1.12.8.4 Recristalización de amilosa y amilopectina**

Los rayos X son una radiación electromagnética con una longitud de onda típica entre 0,1 y 1 nm, longitud comparable a los espaciamentos moleculares en un cristal. Cuando un haz de rayos X incide en un cristal, el cual es mantenido en un montaje especial que permite la rotación de un cristal con respecto al haz incidente, ocurre una difracción. Este es un fenómeno que ocurre cuando una onda interacciona con un obstáculo. Los rayos difractados se registran a fin de obtener información de la estructura del cristal (Jovanovich, 1997).

La recristalización de la amilosa y la amilopectina se determinó mediante difracción de Rayos X. Para ello se elaboraron panes con emulsificantes según la técnica y se almacenaron a  $20 \pm 2$  °C para analizar la retrogradación de almidón. A diferentes períodos de almacenamiento (0, 1 y 3 días) se colocaron porciones de miga en el recipiente de muestra del equipo y se comprimieron 5 min con un émbolo de 1000 g. Las muestras se cubrieron con un film de kapton para prevenir la deshidratación y se analizaron en un difractor X'Pert Pro (PANalytical, Holanda)

de polvo equipado con un programa de análisis de datos con monocromador de grafito cristalino. El equipo contaba con un generador de rayos X equipado con un tubo de cobre que operaba a una tensión de 40 kV y a una corriente de 40 mA. La muestra fue irradiada con una radiación monocromática Cu  $k_{\alpha}$  a una longitud de onda de 0,154 nm. Se realizó un barrido rutinario equivalente a un grado por minuto (un paso de  $0,025^{\circ} 2\theta$  y 1 segundo de conteo por paso) en un rango  $2\theta$  de 4-40 grados.

Las áreas cristalinas y la fracción amorfa se cuantificaron por ajuste de los patrones de difracción. El grado total de cristalinidad se determinó mediante la relación entre el área total de la fracción cristalina y el área total de la fracción cristalina más el área de la fracción amorfa.

### **1.13 Formulación de masas con el agregado de almidón resistente**

Las muestras fueron elaboradas en base a la siguiente formulación: cada 100 g de mezcla harina-almidón resistente (87,5% de harina + 12,5% de almidón resistente) se utilizaron 2 g de NaCl, 0,02 g de ácido ascórbico, 0,00125 g de  $\alpha$ -amilasa, 2,8 g de levadura prensada. Los emulsificantes que se utilizaron fueron el estearoil lactilato de sodio (SSL), los ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico (DATEM) y el monooleato de sorbitan polioxietilenado (polisorbato 80, PS80) (DANISCO A/S, Dinamarca) en concentraciones que se muestran en la Tabla 1.3. Se formuló una masa control sin el agregado de emulsificantes (Mezcla 0). Se agregó un 62,7% de agua en todos los casos, cantidad correspondiente a la absorción de agua registrada en el farinógrafo para la Mezcla 0. La levadura se utilizó sólo en los ensayos de reofermentación y panificación. Los ensayos fueron realizados de acuerdo al proyecto de mezcla de tres componentes mostrado en la Tabla 1.3 el cual posee tres puntos centrales, para estimar el error puro (Matuda, 2004).

Todos los ensayos, a excepción de los de viscoelasticidad y análisis térmico, correspondientes a las mezclas de harina de trigo con almidón resistente de maíz, fueron realizados en el laboratorio de la Universidad de San Pablo.

## 1.14 Análisis reológico de las masas con almidón resistente

### 1.14.1 Ensayos Farinográfico y Alveográfico

El ensayo farinográfico fue realizado sobre la masa control (sin el agregado de sal) según el procedimiento detallado en el Inciso 1.1.6. El Índice de Tolerancia al Mezclado (ITM), que consiste en el decrecimiento de la consistencia de la masa, se midió 5 minutos después de alcanzar el tiempo de desarrollo ( $t_d$ ).

El ensayo alveográfico se realizó sobre todas las muestras evaluadas de acuerdo al procedimiento descrito en el Inciso 1.1.5.

**Tabla 1.3.** Cantidades de emulsificantes utilizados en la formulación de las masas de acuerdo al planeamiento experimental triangular. X: valores codificados, C: % (p/p) de emulsificante.

Mezcla	SSL		PS80		DATEM	
	X <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> (%)	X <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> (%)	X <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> (%)
0	0	0	0	0	0	0
1	1	0,5	0	0	0	0
2	0	0	1	0,5	0	0
3	0	0	0	0	1	0,5
4	0,5	0,25	0,5	0,25	0	0
5	0,5	0,25	0	0	0,5	0,25
6	0	0	0,5	0,25	0,5	0,25
7a	0,333	0,167	0,333	0,167	0,333	0,167
7b	0,333	0,167	0,333	0,167	0,333	0,167
7c	0,333	0,167	0,333	0,167	0,333	0,167

### 1.14.2 Análisis de Perfil de Textura

Las masas fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito en la Figura 1.13 utilizando una amasadora espiral (Supremax, Brasil). Los ensayos fueron realizados sobre discos de masa de 4,0 cm de diámetro por 1,0 cm de espesor en



un equipo TA-XT2i - Stable Micro Systems (Haslemere, Surrey, Inglaterra).

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- ✓ sonda cilíndrica SMS P/45 de acero inoxidable de 45 mm de diámetro,
- ✓ plato inferior con círculos concéntricos para reducir deslizamiento.
- ✓ celda de carga de 25 kg.

Se midieron al menos 15 discos de masa para cada muestra según el procedimiento descrito en el Inciso 1.11.2.

### 1.14.3 Evaluación de la Extensión Uniaxial

Las muestras fueron preparadas de acuerdo al procedimiento descrito en la Figura 1.13.

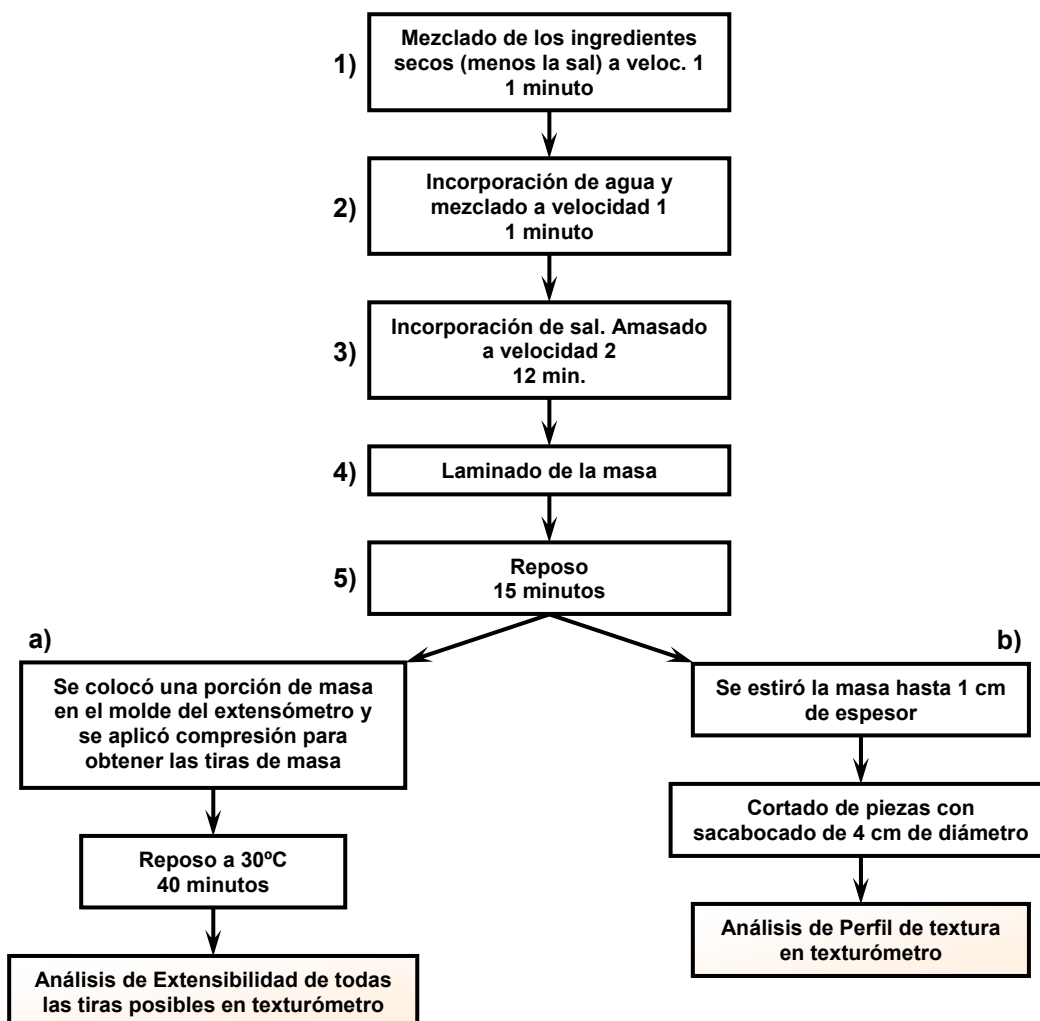
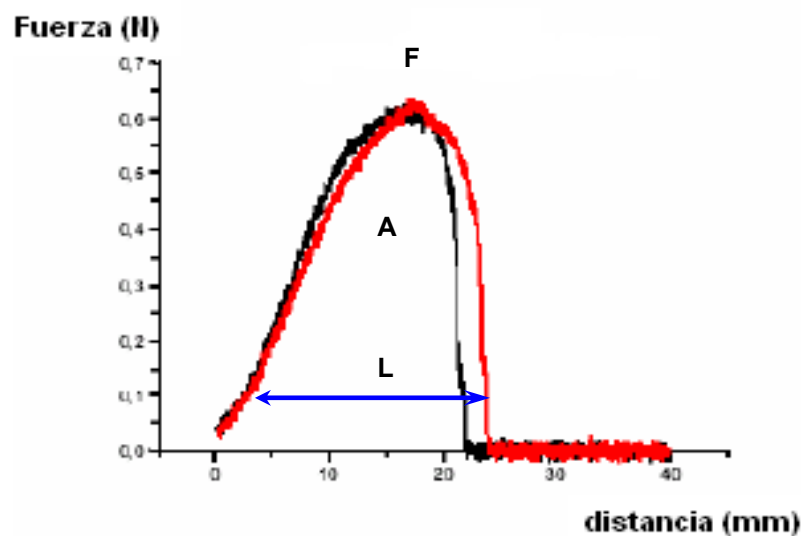


Figura 1.13. Esquema de preparación de las masas. a) Extensión uniaxial, b) TPA.

Una vez obtenida la masa se colocó una porción de la misma en el molde de bloques y fue comprimida para obtener las tiras de masa que luego serían evaluadas. Luego de 40 min de reposo a 30 °C las tiras de masa fueron sometidas al ensayo de extensión uniaxial en el texturómetro de acuerdo al método de Kieffer (SMS, 1995).

Los parámetros evaluados fueron la máxima resistencia a la extensibilidad (F, [N]), la distancia de extensión hasta la ruptura (L, [mm]) y la energía aplicada a la masa hasta la ruptura (A, [mm<sup>2</sup>]). Se midieron al menos 10 tiras de masa para cada muestra (Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Curva típica del ensayo uniaxial de masa de pan. F: resistencia de la masa a la extensión, L: extensibilidad a la ruptura, A: energía aplicada a la masa hasta la ruptura (Área bajo la curva).

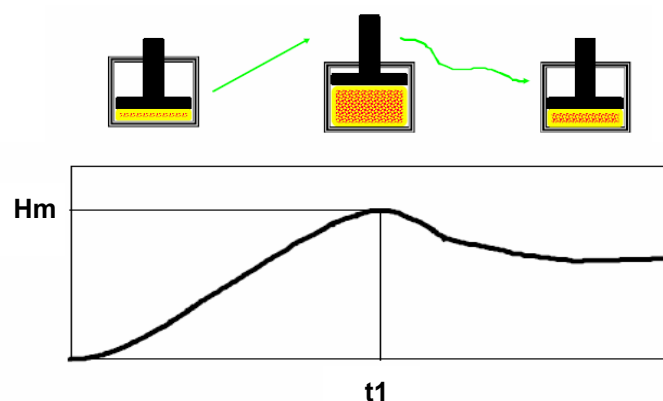
#### 1.14.4 Ensayos de Viscoelasticidad

Este ensayo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Las masas fueron preparadas en un microfarinógrafo Brabender (10 g). Las muestras fueron acondicionadas en el equipo y sometidas a los ensayos descritos en el Inciso 1.11.2.

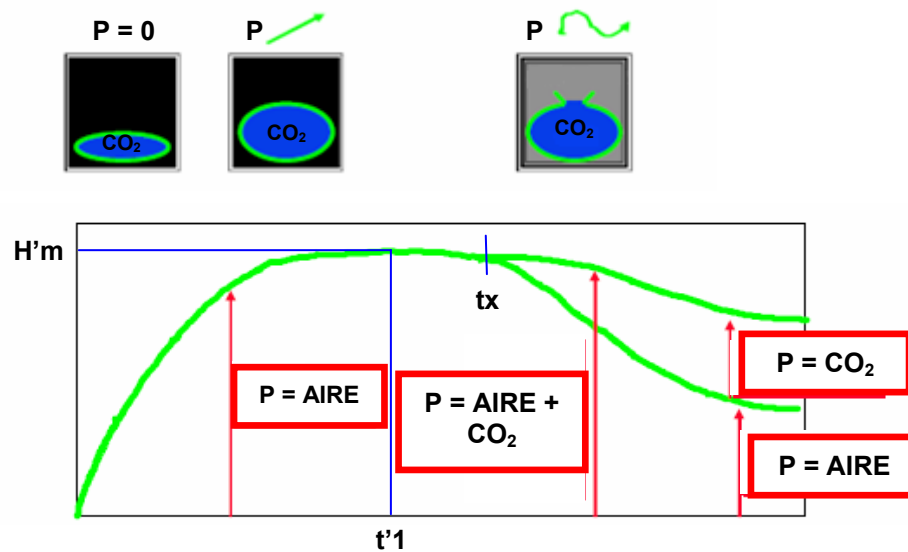
### 1.14.5 Ensayo de Reofermentación

Las muestras fueron preparadas de acuerdo a lo descrito en los Incisos 1 a 5 de la Figura 1.13. Una vez obtenida la masa, se tomó una porción de 250 g, se armó un bollo y se colocó en el equipo. El ensayo fue realizado en un Reofermentógrafo CHOPIN F3 (Francia), de acuerdo al protocolo CHOPIN (pesa: 2 kg, peso de masa: 250 g, levadura prensada: 2,8%, duración del ensayo: 3 horas, temperatura de la cámara: 28,5°C). Para cada ensayo fueron obtenidas dos curvas:

- ✓ **Curva de desarrollo de la masa:** Indica la altura alcanzada por la masa durante el ensayo. Dicha altura es medida a través de un sensor óptico (Figura 1.15).
- ✓ **Curva de retención de gas:** Registra la presión de gas producido durante el ensayo (Aire + CO<sub>2</sub>). Esto se logra a través de la conversión de ciclos de medida de presión realizada por un circuito neumático. De esta manera es posible determinar la cantidad de gas total producido y la cantidad retenida por la masa (Figura 1.16).



**Figura 1.15.** Curva típica de desarrollo de masa. Hm: Altura de desarrollo de la masa (mm), t1: tiempo correspondiente a Hm (min).



**Figura 1.16.** Curva típica de retención de gas.  $H'm$ : Altura máxima de la curva de generación de  $CO_2$  (mm),  $t'1$ : tiempo correspondiente a  $H'm$  (min),  $tx$ : tiempo en que la masa comienza a perder  $CO_2$  (min).

### 1.14.6 Comportamiento térmico de las masas

Los cambios de estructura y conformación durante el calentamiento y que influyen en la funcionalidad de las proteínas y el almidón, se pueden determinar por el estudio de las propiedades térmicas mediante técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Arntfield y col., 1990).

Se midieron las propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón de las masas de acuerdo a las técnicas mencionadas en el Inciso 1.10.

### 1.15 Determinación de la calidad panadera de panes enriquecidos con fibra

Las masas fueron preparadas según lo descrito en los Incisos 1 a 5 de la Figura 1.13. Una vez obtenida la masa se fraccionó en dos porciones de 600 g c/u, cada porción se pasó por la armadora y se obtuvo una pieza de masa que se colocó en un molde para pan (dimensiones: 30,0 x 10,5 x 10,0 cm) previamente untado con aceite. Se colocaron ambos moldes en la cámara fermentadora (Degânia, Brasil) y

se dejó fermentar durante 90 minutos a 32 °C. Se hornearon en horno (Degânia, modelo turbo 4, Brasil) a 180 °C durante 25 min con la trampa de humedad cerrada y 5 min con la trampa abierta. Los panes se dejaron enfriar 1 hora a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos.

### **1.15.1 Volumen específico de pan**

El volumen de los panes obtenidos se determinó por desplazamiento de semillas de colza utilizando el medidor de volumen CHOPIN (Francia). Los resultados se expresaron en términos de volumen específico (volumen pan/masa pan).

### **1.15.2 Determinación de humedad de la miga**

Se cortaron pequeñas porciones de miga, se pesaron 2 g y se colocaron en estufa a 130 °C durante 2 h. La humedad de la miga se determinó por medida del contenido de agua por diferencia de pesada.

### **1.15.3 Análisis de Firmeza de la miga**

Se siguió la metodología descrita en la Norma AACC 74-09 (AACC, 1995). Para ello se cortaron rodajas de pan de 25 mm de espesor y se midió la compresión de la miga en un texturómetro TA.XT2i - Stable Micro System (Inglaterra). Se trabajó a una compresión de 40%. Se utilizó la sonda cilíndrica SMS P/36 de 36 mm de diámetro y la velocidad de cabezal fue de 100 mm/min. La Firmeza de la miga se expresó como la fuerza máxima de compresión, en N, necesaria para comprimir una rodaja de pan.

## 1.16 Análisis estadístico

Se aplicó un análisis ANAVA a los ensayos realizados para comprobar si las varianzas eran homogéneas. Para la comparación de medias se empleó el test de menor diferencia significativa de Fisher (LSD) a un nivel de significación del 5%. Los análisis se realizaron empleando el programa informático Statgraphics Plus 5.1 (StatPoint Technologies, Inc., Virginia, EUA).

## 1.17 Modelado de Parámetros Reológicos. Modelo cúbico especial y superficie de respuesta

El sistema elegido para modelar los parámetros reológicos de las masas elaboradas con harina y almidón resistente fue el modelo cúbico especial. Este modelo permite reproducir satisfactoriamente los valores de la respuesta en los vértices y las aristas de un triángulo, que representan las concentraciones de los emulsificantes puros y sus mezclas respectivamente. Así como también permite reproducir un punto central que correspondiente a la mezcla ternaria en partes iguales (1/3,1/3,1/3). Esta última particularidad es la que lo diferencia del modelo cuadrático (De Barros Neto y col., 2007). El modelo se representa mediante la ecuación 1.19 (Ec. 1.19)

$$Y = aX_1 + bX_2 + cX_3 + dX_1X_2 + eX_1X_3 + fX_2X_3 + gX_1X_2X_3 \quad \text{Ec. 1.19}$$

donde:

Y = parámetro reológico a evaluar

X<sub>1</sub> = valor codificado de la concentración de SSL

X<sub>2</sub> = valor codificado de la concentración de PS80

X<sub>3</sub> = valor codificado de la concentración de DATEM

La metodología de superficies de respuesta (SRM, surface response methodology) es una técnica de optimización basada en planeamientos factoriales y

es utilizada en el modelado de diversos procesos industriales (De Barros Neto y col., 2007). En la práctica las superficies de respuesta nos ayudan a prever qué condiciones experimentales serán las más favorables. Es por ello que para visualizar el efecto de las variables independientes sobre las dependientes se utilizaron gráficos de superficie de respuesta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



# **CAPITULO 1**

---

**Efecto de los emulsificantes sobre la  
estructura del gluten**

---

Se preparó gluten de trigo, en ausencia y presencia de emulsificantes, a partir de una harina 000 cuyo contenido de proteína fue de 10,7% (base harina, b.h.), el de gluten húmedo  $29,8 \pm 0,5\%$  (b.h.) y la fuerza alveográfica  $301 \pm 18$  ( $10^{-4}$  J). Se estudió el efecto de los emulsificantes en los cambios estructurales de las proteínas durante la formación del gluten.

Según lo expuesto en los Materiales y Métodos (Inciso 1.3), las muestras fueron codificadas como: G para el gluten nativo (control), GS para la muestra de gluten con SSL, GD para la muestra con DATEM y GSD para la muestra de gluten con la mezcla SSL-DATEM. El nivel de emulsificante se indicó luego de las letras codificadas.

## 1.1 Microestructura del gluten

Se ha utilizado la espectroscopia FT-Raman para estudiar los cambios conformacionales producidos en el gluten debido a la interacción de las proteínas con los emulsificantes.

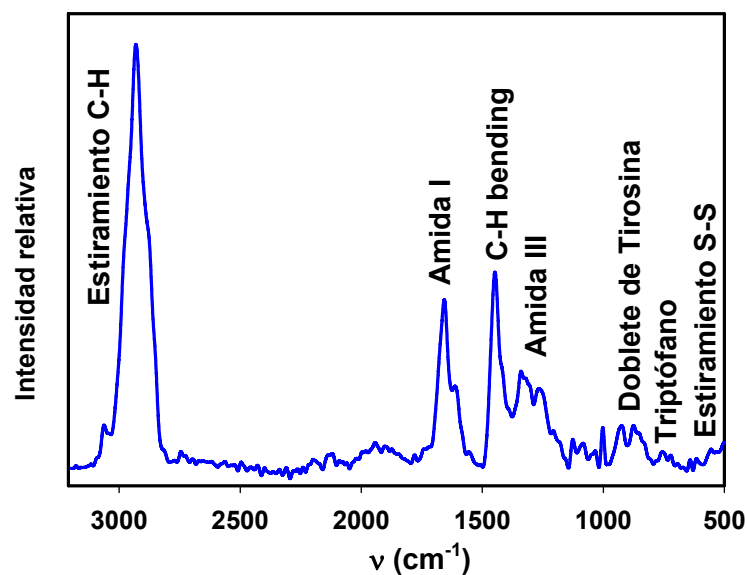
Los espectros Raman de las proteínas y polipéptidos exhiben bandas características y han sido ampliamente utilizados para su estudio, en especial en estos últimos años en la investigación de proteínas constituyentes de alimentos (Phillips y col., 1999; Ma y Phillips, 2002; Choi y Ma, 2007). En el estudio conformacional se obtiene información de la estructura y disposición espacial del esqueleto peptídico (estructura  $\alpha$ -hélice, hoja plegada  $\beta$  y estructuras al azar).

En la Figura 1.1 se observan las bandas características de un espectro Raman de una muestra de gluten nativo. La banda correspondiente al estiramiento C-H ( $2800-3100\text{ cm}^{-1}$ ) está relacionada con los grupos hidrofóbicos de la proteína (Howell y col., 1999). La región Amida I ( $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ ) es un modo vibracional que se origina principalmente a partir del estiramiento del enlace C-O y la banda Amida III ( $1250\text{ cm}^{-1}$ ) se debe a los estiramientos C-N (40%) y N-H (30%). Dichas bandas provienen de las vibraciones en el plano del enlace amida y permiten diferenciar, por el corrimiento de las frecuencias, los cambios conformacionales en las proteínas sometidas a distintas perturbaciones.

Los dobletes de tirosina permiten diferenciar los entornos de los residuos de tirosina. Cuando los mismos se encuentran ocultos en la estructura proteica, aparece una banda intensa en  $830\text{ cm}^{-1}$ , y cuando se encuentran expuestos en la superficie, se incrementa la intensidad de la banda en  $850\text{ cm}^{-1}$  (Yu y col., 1973; Tu, 1982; Tu, 1986).

El triptófano presenta una banda característica a  $760\text{ cm}^{-1}$  y dos bandas adicionales a  $1582$  y  $1553\text{ cm}^{-1}$ . La exposición de residuos de triptófano, previamente ocultos, como consecuencia de la desnaturalización de las proteínas, es evaluada por la disminución de la intensidad de dichos picos (Kitagawa y col., 1979; Yu y col., 1974; Tu, 1982).

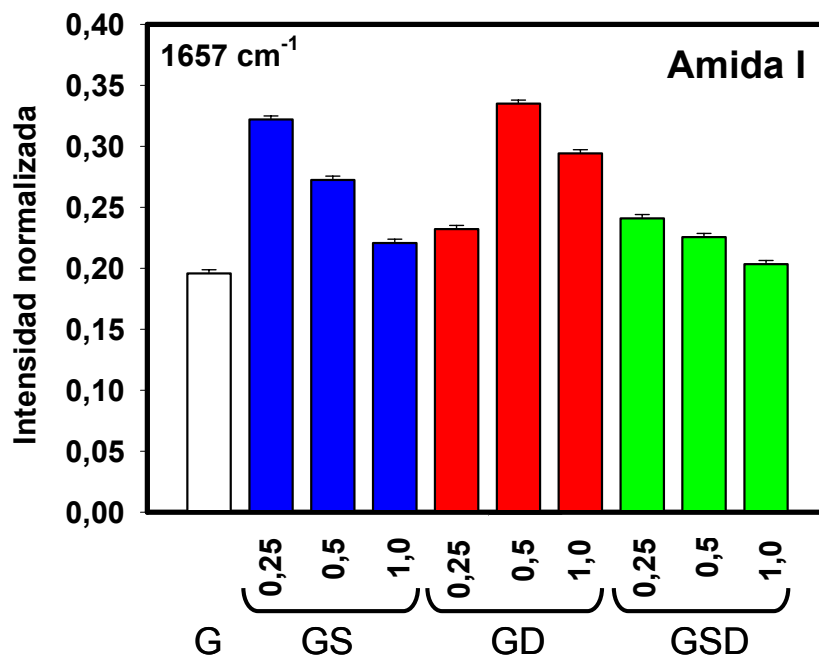
El enlace disulfuro colabora en la estabilidad de las proteínas, pudiéndose evaluar la formación o ruptura de dichos enlaces a través de la intensidad de las bandas vibracionales de estiramiento S-S en la región  $500\text{-}540\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 1.1.** Espectro Raman del gluten nativo.

Con el fin de estimar los cambios producidos por los emulsificantes, se calculó la intensidad normalizada de la banda Amida I ( $1657\text{ cm}^{-1}$ ) cuyos valores se muestran en la Figura 1.2. La frecuencia de  $1657\text{ cm}^{-1}$  se corresponde a la conformación  $\alpha$ -hélice. El aumento de la intensidad de esta banda indica la existencia de un mayor porcentaje de esta estructura. Bajas concentraciones de SSL (0,25 y 0,5% p/p)

favorecieron la formación de dicha estructura, con un valor máximo a 0,25%. A estos niveles, el SSL estaría estructurando la proteína en el gluten (Tu, 1982). A medida que aumentó la concentración de SSL la intensidad de la banda Amida I disminuyó. Estos resultados indicarían que la concentración 1% de SSL daría lugar a la formación de una menor proporción de estructura  $\alpha$ -hélice, porque la proteína estaría más desplegada y la formación de enlaces puente hidrógeno intramoleculares sería menos frecuente (Ferrer y col., 2011).



**Figura 1.2.** Efecto de los emulsificantes en la intensidad de la banda de Amida I a una frecuencia de  $1657\text{ cm}^{-1}$ . G: gluten control, GS: gluten + SSL, GD: gluten + DATEM, GSD: gluten + SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

En el sistema gluten-DATEM (GD) se observó un comportamiento diferente, se obtuvo una estructura más ordenada a concentraciones de DATEM mayores o igual a 0,5%. El incremento en la intensidad de banda Amida I de las muestras GSD no fue tan pronunciado como en el caso de los aditivos puros (Figura 1.2), siendo la tendencia mostrada por estas muestras similar a la observada en GS. Esto sugiere que en la mezcla probablemente exista alguna incompatibilidad entre los emulsificantes que conlleva a un menor plegamiento de las proteínas durante la formación de gluten. Esta incompatibilidad podría deberse a la diferente estructura química de los aditivos. El SSL es un emulsificante que presenta un alto balance

hidrofílico-lipofílico (HLB). Su estructura molecular posee una porción hidrofílica (extremo polar) y una larga cadena hidrofóbica (extremo no polar). Por el contrario, el DATEM es una molécula que interactúa principalmente con las partes hidrofóbicas del gluten (Armero y Collar, 1996; Köhler, 2001; Shiau, 2004).

A fin de obtener una visión más profunda de las modificaciones que ocurren en la red de gluten, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la estructura secundaria correspondiente a la región Amida I (Tu, 1982). En la Tabla 1.1 se muestran los porcentajes de las estructuras secundarias, obtenidos mediante el ajuste de la curva de la banda de Amida I. Los emulsificantes aumentaron el contenido de estructura  $\alpha$ -hélice de las proteínas del gluten. Como se mencionó anteriormente, la adición de 0,25% p/p de SSL (GS0,25) favoreció la formación de estructura  $\alpha$ -hélice en el gluten nativo (G), con una consecuente disminución del porcentaje de estructuras tales como giro  $\beta$  ( $\beta$ -turn) y lámina plegada  $\beta$  ( $\beta$ -sheet). Estos resultados sugieren que la presencia de SSL durante la formación de gluten favoreció un incremento del orden en la estructura secundaria de las proteínas, coincidente con la tendencia observada para la intensidad de la banda Amida I (Figura 1.2). El DATEM también favoreció la formación de estructura  $\alpha$ -hélice y la disminución en la proporción de giros  $\beta$  (Tabla 1.1), principalmente en niveles iguales o superiores a 0,5% p/p (GD0,5 y GD1).

**Tabla 1.1.** Determinación de porcentaje de estructuras secundarias mediante FT-Raman. G: gluten nativo (control), GS: gluten-SSL, GD: gluten-DATEM, GSD: gluten-SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

	$\beta$ - Antiparalela (1675–1695 $\text{cm}^{-1}$ )	Giro $\beta$ (1666–1673 $\text{cm}^{-1}$ )	$\alpha$ -Hélice (1650–1658 $\text{cm}^{-1}$ )	Estructura al azar (1637–1645 $\text{cm}^{-1}$ )	Hélice Solvatada (1625–1637 $\text{cm}^{-1}$ )	Lámina plegada $\beta$ (1613–1625 $\text{cm}^{-1}$ )
<b>G</b>	2,59	23,48	40,09	7,24	9,10	17,42
<b>GS0,25</b>	8,65	6,82	68,53	nd	9,42	6,56
<b>GS0,5</b>	16,72	9,34	55,97	nd	3,83	14,35
<b>GS1</b>	15,79	9,23	53,76	nd	5,43	15,69
<b>GD0,25</b>	21,19	18,10	42,99	nd	10,56	7,13
<b>GD0,5</b>	11,37	11,65	54,98	nd	11,99	10,0
<b>GD1</b>	10,37	11,64	53,13	nd	11,86	13,0

nd: no detectado

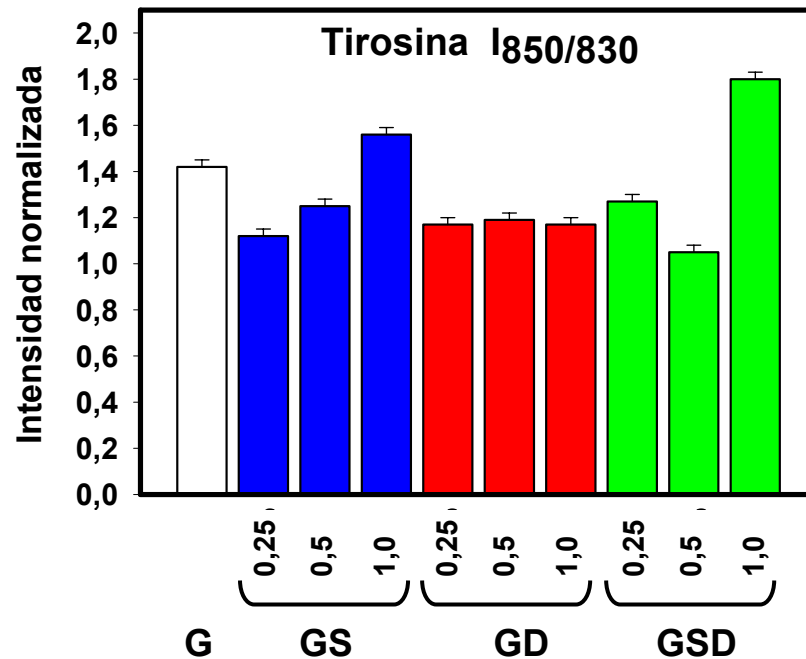
También se observó en GD una disminución en la proporción de estructura lámina plegada  $\beta$  y un aumento en  $\beta$ -antiparalela. El porcentaje de área de la banda de  $1630\text{ cm}^{-1}$ , que está asociado a cadenas de segmento corto interconectadas con segmentos de  $\alpha$ -hélice (hélice solvatada) (Murayama y Tomida, 2004), mostró un ligero aumento. Este incremento es coincidente con el aumento de proporción de la estructura  $\alpha$ -hélice y en consecuencia, con el plegamiento de las proteínas de gluten y la tendencia de las mismas a experimentar cambios conformacionales hacia una estructura más ordenada.

Para el sistema gluten-SSL-DATEM (GSD) no fue posible realizar un buen ajuste de los espectros Raman. Por otra parte, en todos los espectros GSD la banda de aproximadamente  $933\text{ cm}^{-1}$ , atribuible a las vibraciones del esqueleto C-C de esta conformación, aumentó su intensidad (datos no mostrados), confirmando así el incremento del contenido de  $\alpha$ -hélice.

Tu (1982) sugirió que la relación entre la intensidad de las vibraciones del anillo de tirosina situado a  $850$  y  $830\text{ cm}^{-1}$  ( $I_{850/830}$ ) revela el grado de exposición de estos residuos. Cuando los residuos de tirosina están expuestos, tal como se indicó previamente, la banda de  $850\text{ cm}^{-1}$  se hace más intensa con respecto a la de  $830\text{ cm}^{-1}$ . También se ha establecido que el doblete deriva de la resonancia de Fermi, y que el cociente de dicha intensidad es un buen indicador de la naturaleza del enlace hidrógeno o del estado de ionización del grupo hidroxilo del fenol. Para las muestras GS, concentraciones bajas de emulsificante (0,25% p/p) provocaron, respecto a G, una disminución en la relación  $I_{850/830}$  (Figura 1.3), indicando el ocultamiento de los grupos de tirosina y confirmando el plegamiento de las proteínas inferido de los resultados de porcentaje de estructura secundaria (Tabla 1.1). Por otro lado, el agregado de SSL al 1% (GS1) produjo un aumento en la relación  $I_{850/830}$ , en comparación con el gluten control (G) (Figura 1.3). El valor obtenido para esta muestra fue superior a 1,5; dicho valor se correlaciona con la forma disociada  $\text{-O}^-$  del grupo fenol de la tirosina (Carey, 1982). Una proporción inusual tan elevada en la intensidad podría deberse a la interacción SSL-proteína (iónica o hidrofóbica), afectando la interacción proteína-proteína durante la formación del gluten, favoreciendo el desorden molecular.

Todas las muestras GD mostraron una relación  $I_{850/830}$  inferior a la de la muestra control (G), no observándose diferencias entre los distintos niveles del emulsificante, lo cual sugiere un ordenamiento proteico con bajo grado de exposición de grupos

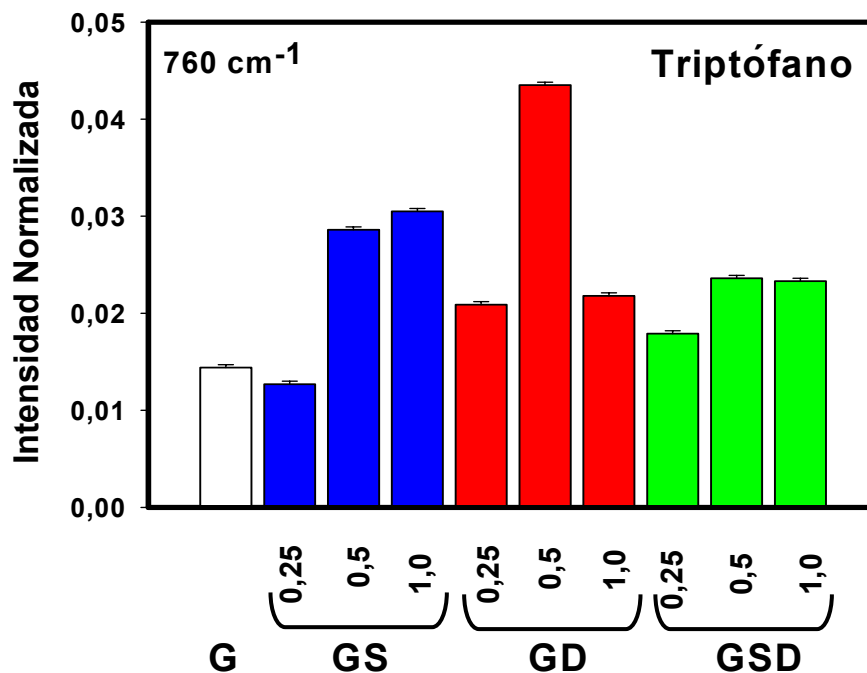
tirosina (Figura 1.3). Las muestras de gluten preparadas con la mezcla gluten-SSL-DATEM (GSD) presentaron un comportamiento similar al observado para las muestras GS. Además, GSD al 1% mostró el mayor valor de  $I_{850/830}$  (Figura 1.3), este valor podría atribuirse a que el DATEM potenció la exposición de tirosina producida por el SSL en las proteínas del gluten.



**Figura 1.3.** Efecto de los emulsificantes en la intensidad relativa del doblete de Tirosina. G: gluten control, GS: gluten + SSL, GD: gluten + DATEM, GSD: gluten + SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

Las modificaciones en la banda característica del triptófano ( $760\text{ cm}^{-1}$ ) también se relacionan, como se indicó anteriormente, con los cambios conformacionales de las proteínas. La intensidad de las bandas del triptófano está íntimamente relacionada con la hidrofobicidad del entorno del anillo del indol (Fleury y col., 1997). Altos valores de intensidad de este parámetro indican que el triptófano se encuentra oculto. En general, la adición de emulsificantes causó un aumento en la intensidad de esta banda. Los resultados obtenidos sugieren que en presencia de estos aditivos, los residuos de triptófano pasaron de estar medianamente expuestos (gluten control) a ocultarse (muestra gluten-emulsificante) en un entorno hidrofóbico, siendo la muestra GD al 0,5% la que mayor valor de la intensidad mostró (Figura 1.4).

Algunas de las bandas laterales de la cadena de proteínas proporcionan información acerca de las conformaciones de las cadenas vecinas o del entorno que las rodea. El análisis de las bandas asociadas al movimiento vibracional perteneciente al estiramiento S-S (región  $450-550\text{ cm}^{-1}$ ), proporciona información acerca de los puentes disulfuro (S-S). Se han asociado tres modos vibracionales relacionados con estos puentes: la conformación gauche-gauche-gauche (g-g-g), la gauche-gauche-trans (g-g-t) y la trans-gauche-trans (t-g-t) (Tu, 1982).



**Figura 1.4.** Efecto de los emulsificantes en la intensidad relativa de la banda del Triptófano. G: gluten control, GS: SSL-gluten, GD: DATEM-gluten, GSD: SSL-DATEM-gluten. Número: % de emulsificante.

La Tabla 1.2 muestra las frecuencias correspondientes a las vibraciones del estiramiento de los puentes disulfuro. En el gluten control (G) las bandas asociadas a estos modos de vibración se encuentran en  $534\text{ cm}^{-1}$  (t-g-t) y  $503\text{ cm}^{-1}$  (g-g-g). La banda g-g-g fue la más intensa (datos no mostrados) y mostró la conformación más estable. La adición de SSL a 0,25% p/p (Tabla 1.2, GS0,25), provocó la aparición de tres bandas a  $533$ ,  $514$  y  $497\text{ cm}^{-1}$ . La primera banda está asociada a la conformación t-g-t, mientras que las dos últimas corresponden a la g-g-g. Las bandas asociadas a la conformación g-g-g estarían relacionadas con dos tipos de configuración S-S: una intracatenaria (de menor frecuencia, con puentes S-S más



largos) y otra intercatenaria (de mayor frecuencia, con puentes S-S más cortos) (Yu y col., 1972) (Tabla 1.2). Con una mayor cantidad de SSL (GS0,5), también se observó el desdoblamiento de la banda asociada a la conformación g-g-g. De la misma manera, cuando el contenido de SSL fue superior a 0,25% p/p (GS0,5 y GS1) aparecieron nuevas bandas en la región g-g-t, esto sugiere cambios en la conformación de los puentes disulfuro (Tabla 1.2). La desaparición de estas bandas, junto con el desdoblamiento de la banda correspondiente a la conformación g-g-g sugiere un fenómeno de mayor plegamiento proteico. En todas las muestras con DATEM (GD), las tres conformaciones estuvieron presentes, incluyendo el desdoblamiento de las bandas en la región g-g-g. Para las mezclas SSL-DATEM (GSD) también se observaron las conformaciones g-g-g y t-g-t, y además para la muestra GSD1 (0,5% p/p de cada emulsificante) se observó una banda asociada a la conformación g-g-t (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Vibraciones del estiramiento S-S en la región 470-550  $\text{cm}^{-1}$ . G: gluten nativo (control), GS: gluten-SSL, GD: gluten-DATEM, GSD: gluten-SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

	<b>t-g-t</b> <b>(535-545 <math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>g-g-t</b> <b>(515-525 <math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>g-g-g</b> <b>(470-515 <math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>
<b>G</b>	534	-	503
<b>GS0,25</b>	533	-	514, 497
<b>GS0,5</b>	543	526	515, 501
<b>GS1</b>	540	527, 520	513
<b>GD0,25</b>	540	526	508, 498
<b>GD0,5</b>	534	525	514, 500
<b>GD1</b>	542	523	514, 500
<b>GSD0,25</b>	541	-	513, 500
<b>GSD0,5</b>	537	-	513, 500
<b>GSD1</b>	538	522	509, 501

En la Tabla 1.3 pueden observarse los porcentajes relevantes correspondientes a la región del estiramiento C-H para los distintos aminoácidos. Esta región (2800-3100  $\text{cm}^{-1}$ ) está generalmente relacionada con los grupos hidrófobos. Los principales cambios están asociados fundamentalmente a las bandas relacionadas

con el entorno del grupo tirosina entre otros aminoácidos (2934-2950  $\text{cm}^{-1}$ ), principalmente aquellos que contienen grupos OH. Bajos porcentajes de área de esta banda se corresponden con un mayor ordenamiento de la molécula de proteína. Los mayores cambios en el estiramiento C-H se observaron especialmente en las muestras GS. La banda correspondiente a 2935  $\text{cm}^{-1}$  se dividió en dos componentes situados a 2939 y 2950  $\text{cm}^{-1}$ . El porcentaje de área total (la suma de las áreas de ambas bandas) calculado para la muestra GS0,25 (20,3%) fue el menor valor obtenido de las tres concentraciones evaluadas. Este valor muestra que a dicha concentración la estructura de la proteína se encuentra más replegada. Estos resultados siguen la misma tendencia que los valores obtenidos para la relación  $I_{850/830}$  mostrada en la Figura 1.3 (Howel y col., 1999).

**Tabla 1.3.** Porcentajes relevantes de los corrimientos Raman de los aminoácidos relacionados a las bandas asociadas a las proteínas en la región del estiramiento C-H. G: gluten nativo (control), GS: gluten-SSL, GD: gluten-DATEM, GSD: gluten-SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

Aminoácidos asignados	G	GS 0,25	GS 0,5	GS 1	GD 0,25	GD 0,5	GD 1	GSD 0,25	GSD 0,5	GSD 1
2874-2879 $\text{cm}^{-1}$ His, Leu, Lys, Ile, Val	10,6	4,9	9,3	18,7	6,5	22,8	3,7	10,4	2,6	11,1
			7,4		5,9				7,8	
2889-2897 $\text{cm}^{-1}$ Thr, Pro	1,4	4,5	8,9	4,3	6,8	-	10,1	13,7	5,5	1,6
	12,8	7,3		3,8						
2934-2950 $\text{cm}^{-1}$ Met, Trp, Arg, Cystine, Leu, Lys, Ile, Phe, Tyr, Glu, Thr, Val, Pro, His Asp, Asn	37,0	2,8	15,3	8,7	18	25,8	9,8	20,4	29,7	14,2
		17,5	11,7	23,6			8,1			

En los sistemas gluten-DATEM sólo la muestra GD1 presentó una división de la banda con una contribución prácticamente igual de ambas bandas (9,8% y 8,1%) (Tabla 1.3). No se observó una división de banda en las muestras de gluten-SSL-DATEM (GSD), y el mayor porcentaje de contribución de área fue obtenido en la muestra de 0,25% p/p SSL-0.25% p/p DATEM (GSD0,5). La banda principal de

proteína cercana a  $2940\text{ cm}^{-1}$  (región  $2934\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ ) anteriormente mencionada, fue relacionada con los aminoácidos aromáticos y alifáticos, con los aminoácidos cargados y con la prolina, treonina e histidina (Howell y col., 1999). La presencia de dos contribuciones en esta región podría ser atribuida a las distintas interacciones que se establecen entre los diferentes aminoácidos y los emulsificantes y/o a la participación de los mismos en las nuevas estructuras formadas.

La disminución en la intensidad  $I_{850/830}$  asociada a la tirosina en las muestras GD fue independiente de la concentración de emulsificante (Figura 1.3). Este comportamiento, junto con la ausencia de división de bandas en la región  $2934\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$  para las muestras GD0,25 y GD0,5 (Tabla 1.3) podría estar relacionado con el hecho de que los aminoácidos que contribuyen a esta banda no participan en la interacción proteína-DATEM.

También se observaron diferencias apreciables en las bandas cercanas a  $2880$  y  $2900\text{ cm}^{-1}$  (Tabla 1.3). Para las muestras de gluten con SSL (GS) se observó la misma tendencia que el gluten control (G) (2 contribuciones), con la excepción de GS0,5. En todas las demás muestras (GD y GSD) sólo se observó una sola contribución, a excepción de GD0,5 (la muestra con DATEM con mayor contenido de  $\alpha$ -hélice) que no presentó contribución en esta región. Este comportamiento se correlacionaría con la manera en que los aminoácidos cargados (prolina y treonina) contribuyen a los cambios en la estructura de las proteínas del gluten.

Como se hizo mención en la Introducción de esta tesis, el SSL es una molécula iónica formada por la unión éster entre el ácido esteárico y el lactilato de sodio, mientras que el DATEM tiene un esqueleto de glicerol con ácido esteárico unido al  $C_1$  y un ácido diacetil tartárico al  $C_3$  (Introducción General, Figuras 2 y 3). No obstante, el SSL se considera un emulsificante menos hidrofóbico que el DATEM, deducido de su balance hidrofílico-lipofílico (HLB). Armero y Collar (1996) informaron valores de HLB, de 21 y 9,2 para SSL y DATEM, respectivamente. Shiau (2004) y Köhler (2001) propusieron para el DATEM valores de HLB entre 11 y 9,2, respectivamente. La cadena polar hidrofílica (lactilato de sodio) del SSL permite que este emulsificante interactúe con las proteínas del gluten a través de enlaces iónicos, produciendo la aglomeración del gluten y el reforzamiento de la estructura de la masa durante la cocción del pan (Boutte y Skogerson, 2004). El DATEM a pesar de poseer otro residuo polar (residuo del ácido diacetil tartárico), funciona de manera cooperativa con las proteínas del gluten y los lípidos de la harina en la

interfase aire/agua mejorando la capacidad de retención de gas de la masa. Estas interacciones podrían llevarse a cabo principalmente a través de interacciones hidrofóbicas mediante los sitios hidrofóbicos de la molécula de emulsificante (Gaupp y Adams, 2004).

Los resultados obtenidos por espectroscopía sugieren que para los sistemas con SSL, las interacciones que se producen involucran principalmente a los aminoácidos con grupos OH o con residuos cargados (Tabla 1.3). El desdoblamiento asociado a la conformación g-g-g permite asumir la formación de enlaces disulfuro (inter e intracatenarios) que participarían en la estabilización de la estructura del gluten. Para los sistemas con DATEM, a excepción de las muestra GD1, los residuos aminoacídicos pertenecientes a la región 2934-2950  $\text{cm}^{-1}$  actuarían de manera conjunta, sin experimentar diferenciación. Este comportamiento sugiere que no estarían directamente involucrados en la estabilización de la estructura proteica. Por otra parte, en estos sistemas los puentes disulfuro involucrados presentarían mayoritariamente las conformaciones g-g-g y g-g-t.

En virtud de que no existen resultados previos relacionados con cambios conformacionales en la estructura del gluten por la adición de emulsificantes a la harina, resulta dificultoso el análisis y la obtención de datos concluyentes. Por ello, podemos establecer que, como sugerimos anteriormente, las diferencias entre ambos emulsificantes podrían estar relacionadas con la capacidad del DATEM para interactuar principalmente a través de uniones hidrofóbicas y/o enlaces puente hidrógeno en contraste con las interacciones iónicas que el SSL es capaz de establecer con las moléculas de proteínas.

## 1.2 Agregados proteicos de gluten

Los cambios conformacionales detectados en la estructura secundaria de las proteínas de gluten, como consecuencia de la presencia de emulsificantes, es muy probable que produzcan cambios estructurales en la matriz, modificando su conformación. En consecuencia, resulta interesante analizar el tipo de agregados o moléculas proteicas presentes en la estructura del gluten. La electroforesis SDS-PAGE permite separar las proteínas por tamaño molecular (Shewry y Lookhart,

2003). De acuerdo a su movilidad en electroforesis A-PAGE (acid PAGE), las gliadinas pueden dividirse en cuatro grupos: las  $\alpha$ -gliadinas (mayor movilidad) y las  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadinas (menor movilidad). Las gluteninas se clasifican de acuerdo a su movilidad electroforética en SDS-PAGE, luego de la reducción de los puentes disulfuro, en cuatro grupos. El grupo A (A-type, 80-120 kD) correspondiente a las HMW-GT (Payne y Corfield, 1979). Los grupos B (B-type, 42-51 kD) y C (C-type, 30-40 kD) son LMW-GT que se asemejan en su secuenciación a las  $\gamma$  y  $\alpha$ -gliadinas (Introducción, Proteínas de trigo). Finalmente el grupo D (D-type) también pertenece a las LMW-GT, es altamente ácido y se ha encontrado que deriva de las  $\omega$ -gliadinas (Jackson y col., 1983; Masci y col., 1993; Gianibelli y col., 2001).

En una SDS-PAGE se observan las gluteninas de alta masa molecular (HMW-GT, 70-100 kD), luego las  $\omega$ -gliadinas ( $\omega$ -GD, 50-65 kD) y por último y en forma conjunta las gluteninas de baja masa molecular (LMW-GT, 30-40 kD) y las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -GD, 33-40 kD) (Brandlard y Dardevet, 1985a,b; Kruger y col., 1988; Kruger y Marchylo, 1990; Gianibelli y col., 2001).

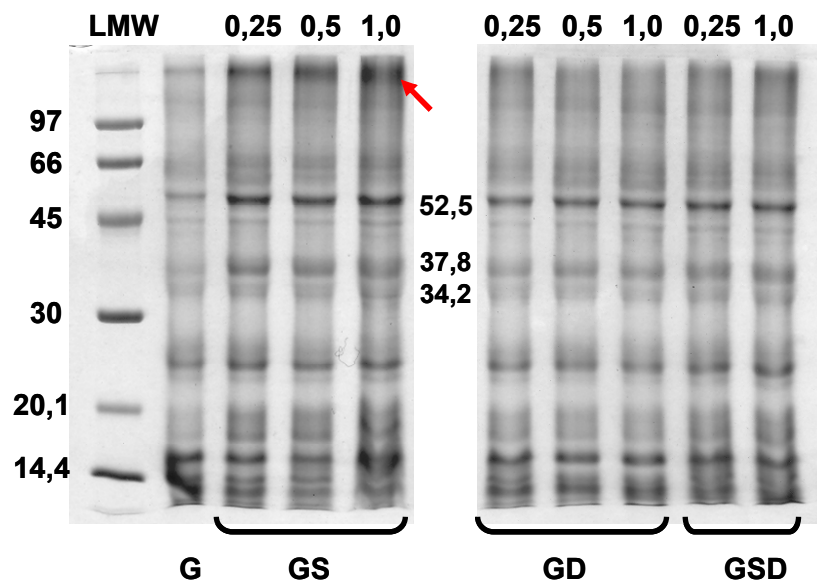
Se analizaron las proteínas presentes en un extracto total, para lo cual las mismas fueron extraídas de las muestras de gluten con buffer Tris-base 0,0625M (pH 10) en ausencia de agente desnaturizante (SDS), para evitar disociar la posible interacción proteína-emulsificante. Los extractos se analizaron por SDS-PAGE.

El SSL en todas sus concentraciones favoreció la extracción de las proteínas de gluten ya que, a iguales condiciones de extracción, se observó mayor intensidad en las bandas obtenidas (Figura 1.4). Asimismo se observó para las muestras con SSL (GS) la presencia de agregados solubles de alta masa molecular (>100 kD) (Figura 1.4, flecha). Los extractos de gluten con DATEM (GD) y con SSL-DATEM (GSD), a todas sus concentraciones, mostraron muy baja proporción de dichos agregados. Los agregados de alta masa molecular podrían estar formados por  $\omega$ -gliadinas (50-65 kD) y/o gluteninas de alta masa molecular (HMW-GT) (> 70 kD) (Figura 1.4) (Bietz y Wall, 1980; Masci y col., 1993; Thomson y col., 1999; Gianibelli y col., 2001).

Todos los perfiles mostraron la presencia combinada de las fracciones de gliadinas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -GD (33-40 kD) y de gluteninas de baja masa molecular LMW-GT (30-40 kD), así como también de la fracción de  $\omega$ -gliadinas ( $\omega$ -GD, 50-65 kD), observándose una baja proporción de las mismas en el gluten control (G). Una mayor proporción de estas proteínas fue obtenida en las muestras GS, en

comparación con G, GD y GSD. El gluten con SSL presentó también una mayor proporción de las bandas de masa molecular de  $52,5 \pm 0,3$  kD;  $37,8 \pm 0,5$  kD y  $34,2 \pm 0,2$  kD (Figura 1.4).

El contenido de proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos proteicos fue de  $150,3 \pm 0,8$ ;  $530,1 \pm 3,0$ ;  $514,2 \pm 0,7$  y  $503,2 \pm 2,6$  para G, GS1, GD1 y GSD1, respectivamente. Estos resultados sugieren que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la extracción de las proteínas, entre las muestras preparadas con los emulsificantes y G. En dichas muestras se extrajo mayor cantidad de proteína, siendo la muestra GS1 la que presentó el mayor valor. Estos resultados son coincidentes con la mayor cantidad de agregados solubilizados en las muestras SSL-gluten (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** SDS-PAGE. Gluten liofilizado control (G) y con diferentes contenidos de SSL (GS), DATEM (GD) y la mezcla de ambos aditivos SSL-DATEM (GSD). LMW: patrón de proteínas de baja masa molecular. Números en cada calle: % p/p emulsificante.

Los resultados obtenidos sugieren que los emulsificantes interactúan de manera diferente con las proteínas del gluten, con predominio de uniones de distinta naturaleza. Moléculas más hidrofóbicas como el DATEM interactuarían con las proteínas principalmente mediante uniones hidrofóbicas, estables en ausencia de agentes disociantes. Moléculas un poco más hidrofílicas como el SSL también se unirían a las proteínas del gluten con su extremo polar mediante uniones iónicas,

disociables en un medio Tris-base, favoreciendo la disociación de agregados de la matriz.

### 1.3 Composición polipeptídica de agregados proteicos de gluten

Con la finalidad de dilucidar qué tipo de proteínas estaban conformando los agregados, se realizó una electroforesis bidimensional de los extractos de gluten. En la primera dimensión las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular, luego cada una de las calles que componía el gel fue tratada con un buffer que contenía los agentes desnaturizantes (SDS) y reductores (2-mercaptoetanol). Las proteínas reducidas se corrieron nuevamente por SDS-PAGE (segunda dimensión). El agregado de SDS y 2-mercaptoetanol provocó la disociación de los agregados de alta masa molecular y las proteínas que formaban parte de dichos agregados fueron identificadas. En esta electroforesis, todos los puntos que aparecen sobre la diagonal indican la presencia de polipéptidos monoméricos. Los que se ubican debajo de la diagonal, como consecuencia del tratamiento reductor, serían subunidades que estaban unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 1.5).

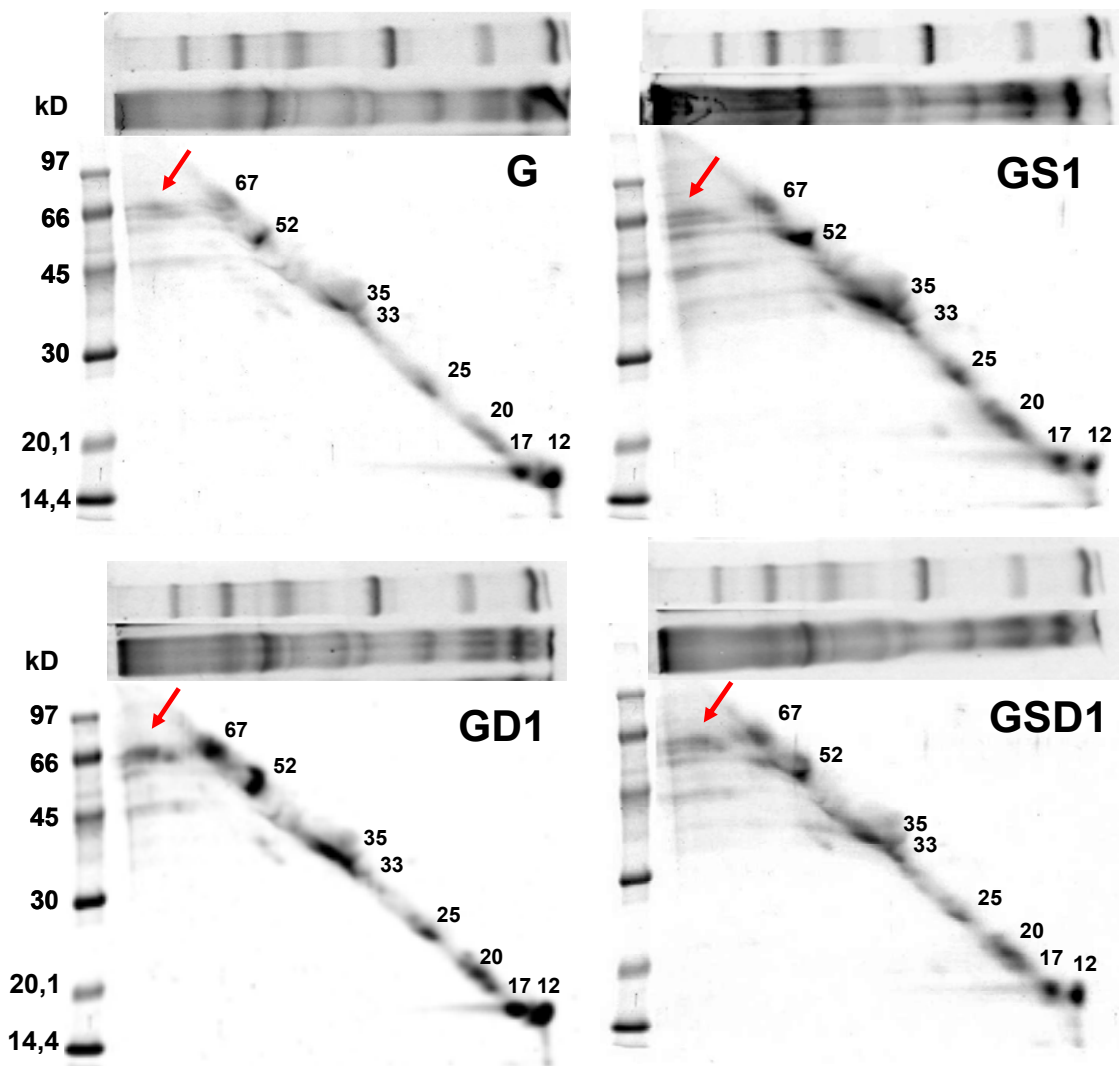
En la Figura 1.5 se puede observar que todas las muestras presentaron polipéptidos monoméricos de 67, 52, 35, 33, 25, 20, 17 y 12 kD.

Los agregados solubles de alta masa molecular (>97 kD) estarían formados por monómeros de peso molecular entre 36 y 70 kD (Figura 1.4, flecha). El gluten control (G) presentó agregados de alta masa molecular formados por monómeros de 67, 65, 61 y 47 kD. A diferencia de G, los agregados del gluten con SSL (GS) presentaron además polipéptidos monoméricos de 40 y 36 kD (Figura 1.5). Los extractos de GS1 presentaron alto contenido de agregados de alta masa molecular, estos resultados son coincidentes con los mostrados en la Figura 1.4.

Comparado con G, el emulsificante SSL indujo la extracción de mayor proporción de monómeros de 52, 35, 25 y 20 kD, y menor cantidad de polipéptidos de 17 y 12 kD. El SSL disociaría o no permitiría la formación de grandes agregados insolubles, por lo tanto, estos polímeros serían capaces de solubilizarse en el buffer de extracción. Al mismo tiempo, debido a la menor cantidad extraída, con respecto a G, de los polipéptidos de 12 y 17 kD, el SSL induciría la asociación de los mismos. La

interacción principalmente mediante uniones iónicas e hidrofóbicas entre el SSL y las HMW-GT interferiría en la unión entre estas proteínas durante la formación de gluten, dando como resultado la formación de una red de gluten más débil, con mayor contenido de polímeros solubles.

El perfil electroforético obtenido para las muestras de gluten preparado con 1% de DATEM (GD1) fue similar al observado para G y GS1, sin embargo se observa una mayor proporción de péptidos de 67, 52, 35, 20, 17 y 12 kD (Figura 1.5). Los agregados de alta masa molecular en este caso están formados principalmente por la proteína de 67 kD (Figura 1.5, flecha). El gluten preparado con la mezcla de ambos emulsificantes (GSD1) presentó un comportamiento intermedio entre GS1 y GD1 (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Electroforesis Bidimensional. G: gluten control, GS1: gluten + SSL, GD1: gluten + DATEM, GSD1: gluten + SSL-DATEM. Número: % p/p emulsificante.



En virtud de analizar mejor los agregados proteicos solubles presentes en las diferentes muestras de gluten, se realizó con los extractos una *electroforesis multistacking* (MS-SDS-PAGE). Esta técnica tiene como fin separar los agregados proteicos que quedan retenidos en los geles stacking (4, 6, 8, 10 y 12%) y en el gel continuo de 14% según su masa molecular (Huang y Khan, 1997). Luego de esta separación, los polímeros retenidos en los distintos stackings son tratados con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol con la finalidad de romper las uniones no covalentes y los puentes disulfuro (Huang y Khan, 1997), para luego analizar los monómeros que formaban la estructura de dichos polímeros.

Resulta importante aclarar que para esta técnica es necesario extraer en la primera etapa una gran cantidad de proteínas, para asegurar tener la cantidad de proteína adecuada en la última fase de siembra (40  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ); por lo que se decidió extraer los agregados proteicos en presencia de SDS. Por lo que los agregados extraídos para analizar por MS-SDS-PAGE son de naturaleza diferente a los agregados extraídos en ausencia de SDS. Este agente desnaturizante rompe uniones no covalentes (principalmente hidrofóbicas), por lo que las proteínas extraídas estarán unidas principalmente por uniones puente disulfuro. En una segunda etapa, las muestras son tratadas con el mismo buffer que contiene 2-mercaptoetanol, por lo que la mayor parte de los puentes disulfuro, de estos agregados previamente disociados por SDS, se reducirán.

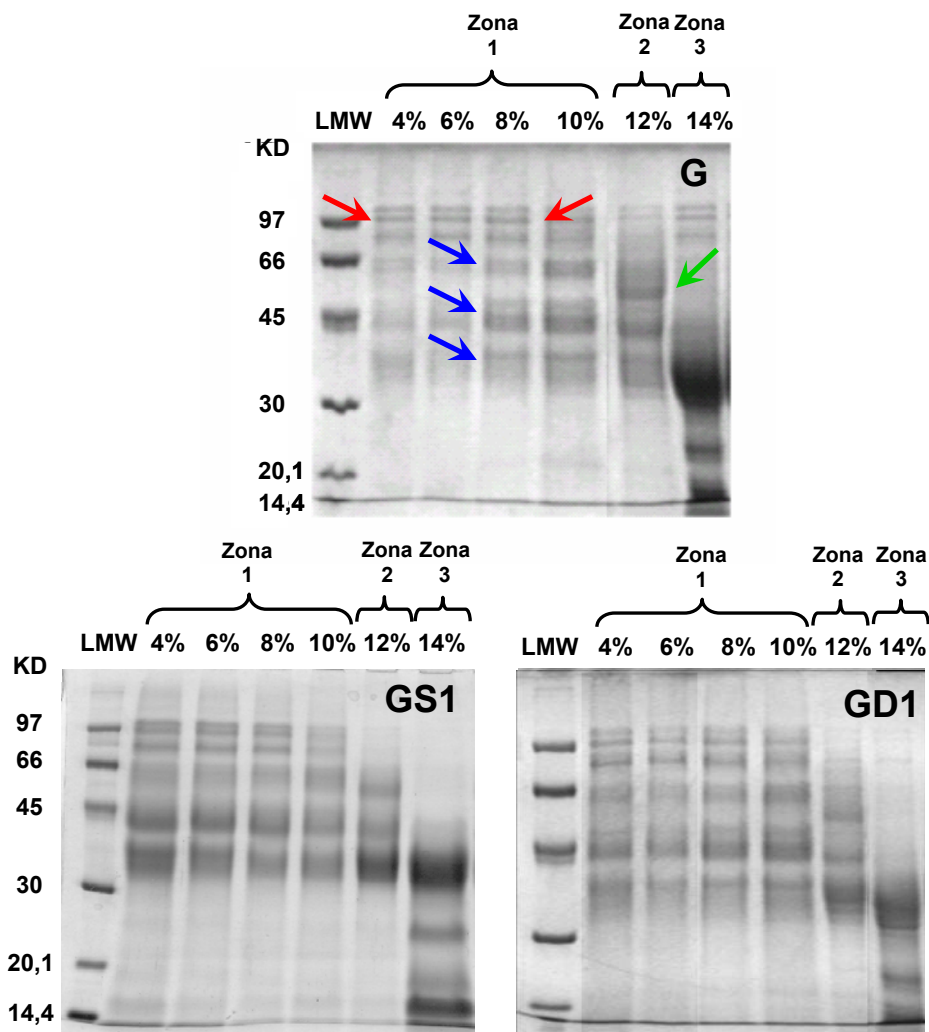
La Figura 1.6 muestra el perfil MS-SDS-PAGE para las muestras G, GS1 y GD1. Cada stacking contiene los monómeros que formaban parte de los polímeros proteicos extraídos inicialmente con SDS. Con el objetivo de facilitar su interpretación se dividieron los diferentes stackings en tres zonas: zona 1 (4, 6, 8 y 10%), zona 2 (12%) y zona 3 (14%). Cada zona presentó un perfil de separación polipeptídica similar entre sí.

Los agregados de alta masa molecular, retenidos en la zona 1 presentaron subunidades entre 35 y 105 kD (Figura 1.6). En tanto que aquellos retenidos en los stackings de 4, 6 y 8% contenían subunidades de 105, 98 y 85 kD (Figura 1.6, flechas rojas), y subunidades de menor masa molecular (64, 46, 44 y 35 kD) (Figura 1.6, flechas azules).

Del gluten control (G) se extrajo una baja proporción de proteínas de alta masa molecular (4 y 6%) y una mayor proporción de polipéptidos de tamaño intermedio (8%), especialmente de menor tamaño (10%). Este comportamiento indica que los

polímeros grandes quedaron insolubles estabilizando la matriz de gluten.

El agregado de SSL y DATEM al 1% p/p a la muestra formó un gluten de cuya matriz pudieron extraerse una gran cantidad (mayor que de G) de polipéptidos de alta masa molecular retenidos en los stackings de 4, 6 y 8%, siendo mayor la proporción para GS1. Este comportamiento puede atribuirse a que en presencia de SDS se romperían las uniones hidrofóbicas y puentes hidrógeno que unían los emulsificantes a las proteínas del gluten, o este emulsificante impediría la formación de polímeros de gran tamaño, dejando la matriz más lábil y provocando así una mayor extracción de proteínas. Estos agregados estaban compuestos principalmente por péptidos de 35 y 40 kD y en menor proporción por subunidades de 60, 80, 97 y 103 kD. Se extrajo en G y GD1, en comparación con GS1, una mayor proporción de agregados de tamaño medio (10%), con un predominio en el primer caso (G y GD1) de la subunidad de 40 kD y en GS1 de la de 35 kD.



**Figura 1.6.** Electroforesis Multistacking. G: gluten control. GS: gluten + SSL. GD: gluten + DATEM. Número: % p/p emulsificante. LMW: patrón de proteínas de baja masa molecular. Zona 1: stackings 4, 6, 8 y 10%. Zona 2: stacking 12%. Zona 3: continuo 14%.

El perfil de la zona 2 también resultó diferente para las distintas muestras. Para la muestra G, las proteínas retenidas en el stacking 12% estaban formadas por subunidades de 35 kD y en mayor proporción por polipéptidos de 42 y 52 kD (Figura 1.6, flecha verde); ésta última ausente en los polímeros grandes (< 12%). Este tipo de polipéptido de 52 kD, ausente en dichos polímeros, correspondería a subunidades de  $\omega$ -gliadinas ( $\omega$ -GD, 50-65 kD) o LMW-GT (D-Type) (Brandlard y Dardevet, 1985a,b; Gianibelli y col., 2001; Shewry y Lookhart, 2003).

La muestra GS1 presentó un perfil de zona 2 (12%) con predominio de la subunidad 35 kD, sugiriendo que los polímeros pequeños de gluten formados en presencia de SSL son de distinta naturaleza que los polímeros de G. El perfil monomérico de los polímeros de la zona 2 de la muestra GD1 resultó similar al de GS1, sugiriendo que los emulsificantes se unen en cierta forma de modo equivalente a algunas de las proteínas, quizá debido a la similitud estructural de una parte de la molécula (cola hidrofóbica) de ambos aditivos.

Los perfiles de la zona 3 (14%) resultaron similares para todas las muestras de gluten, sugiriendo que en este gel quedan retenidos los monómeros libres de baja masa molecular (<45 kD) que no estarían comprometidos en la formación de oligómeros y/o agregados (Figura 1.6). Estos monómeros corresponderían a fracciones LMW-GT (C-type, 30-40 kD) y a las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -gliadinas (35-45 kD) (Brandlard y Dardevet, 1985a y b; Gianibelli y col., 2001).

Las diferencias en el tipo de polipéptidos que pueden ser extraídos del gluten en presencia o ausencia de SSL o DATEM afectaría el contenido de sulfhidrilos libres ( $SH_L$ ) de las proteínas solubles. En la Tabla 1.4 se observa que el valor de  $SH_L$  de las proteínas del gluten control (G) fue superior a los valores observados para las muestras de gluten con el agregado de 1% de emulsificante (GS1, GD1, GSD1).

Para la muestra G se extrajo una menor cantidad de proteínas, pero esas proteínas presentaron una mayor proporción de  $SH_L$ . Por otra parte, las proteínas extraídas de las muestras de gluten con los emulsificantes presentaron menor contenido de  $SH_L$ , principalmente la muestra GD1; probablemente debido a que la proteína que se solubilizó contenía menor proporción de  $SH_L$ , o a que se produjo un mayor intercambio SH/S-S entre las moléculas de las proteínas de gluten mediado por el DATEM.

**Tabla 1.4.** Solubilidad de proteína (S) y sulfhidrilos libres (SH<sub>L</sub>) de las diferentes muestras de gluten. G: gluten control, GS: gluten + SSL, GD: gluten + DATEM, GSD: gluten + SSL-DATEM. Número: % p/p emulsificante.

	<b>G</b>	<b>GS1</b>	<b>GD1</b>	<b>GSD1</b>
<b>S (mg/mL)</b>	1,96a	2,16b	2,13b	2,35c
<b>SH<sub>L</sub> (μmol/g proteína soluble)</b>	4,06a	3,56b	2,86c	3,45b

Letras distintas en la misma fila indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

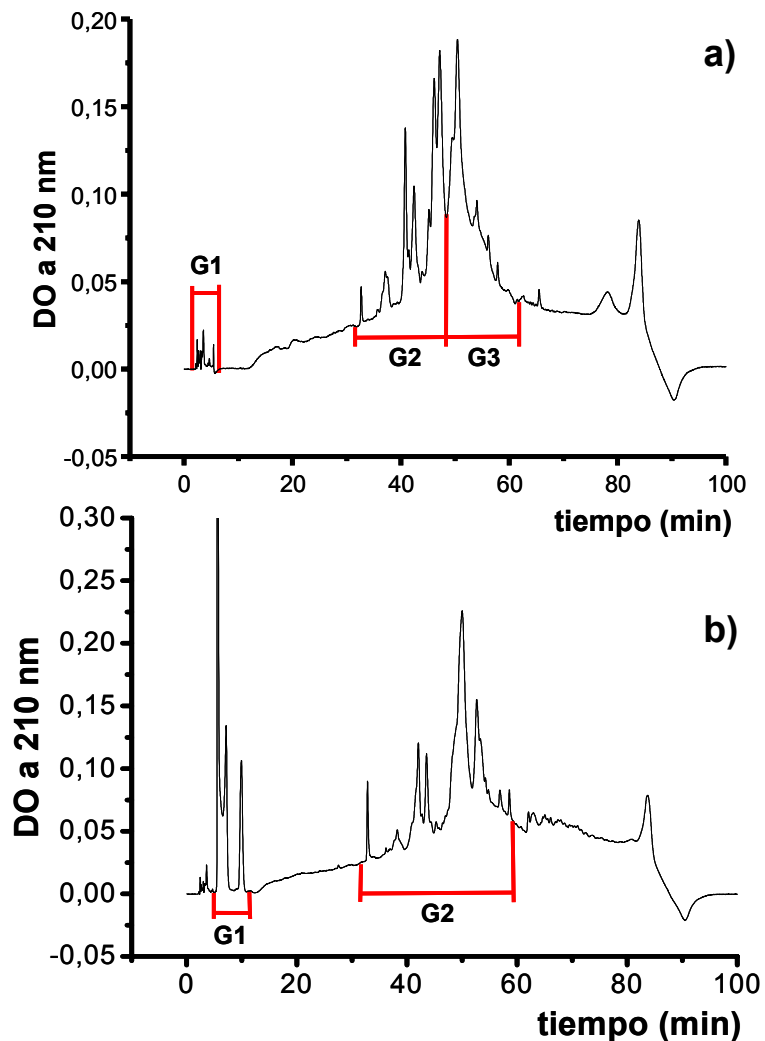
La mayor cantidad de proteína extraída en las muestras que contienen emulsificantes, previamente observado para los extractos totales, indicaría que dichos aditivos formarían una matriz de gluten más lábil que permitiría extraer mayor cantidad de dichas proteínas. Estos resultados sugieren que se formarían redes de gluten con diferentes estructuras dependiendo también de la naturaleza del emulsificante.

## 1.4 Gliadinas y Gluteninas presentes en el gluten

El análisis por RP-HPLC se llevó a cabo para determinar si alguna de las fracciones proteicas del gluten, gliadinas o gluteninas, sufrieron cambios conformacionales que cambiarán su hidrofobicidad como consecuencia de la interacción con los emulsificantes, que teóricamente, sería de naturaleza hidrofóbica.

La Figura 1.7 muestra los cromatogramas RP-HPLC de las fracciones enriquecidas en gliadinas y gluteninas extraídas del gluten control liofilizado ( $DO_{210}$  vs  $t_{\text{retención}}$ ). En el cromatograma a) se identificaron 3 zonas que abarcaron diferentes grupos de proteínas (G1 a G3), de acuerdo al tiempo de retención y en el cromatograma b) se identificaron 2 zonas (G1 y G2). Los primeros compuestos que eluyen de la columna son los más hidrofílicos y los que poseen mayor masa molecular y por último los más hidrofóbicos y de menor masa molecular que se encuentran unidos a la fase continua hidrofóbica (RP). Por lo tanto a medida que aumenta el número en el grupo, de G1 a G3, aumenta la hidrofobicidad de las proteínas/polipéptidos.

En el caso de las gliadinas los grupos se dividieron de acuerdo a los siguientes tiempos de retención: G1) 2-6 min, G2) 30-45 min y G3) 45-62 min. Para las gluteninas los grupos fueron los siguientes: G1) 2-10,5 min y G2) 30-62 min (Figura 1.7). Se calculó el área de cada grupo mediante la suma de las áreas de los picos que conformaban ese grupo, tomándose como área total la suma de las áreas de todos los grupos considerados.



**Figura 1.7.** Cromatograma RP-HPLC del Gluten Control. **a)** GLIADINAS. **b)** GLUTENINAS.

En la Tabla 1.5 se muestra el efecto del nivel de emulsificante sobre el porcentaje de extracción de cada grupo de fracciones de gliadinas y gluteninas.

Se observaron diferencias en los porcentajes de área de los diferentes grupos para los diferentes agentes emulsificantes.

Las gliadinas, separadas por RP-HPLC, fueron identificadas conforme a su movilidad molecular según lo establecido previamente por Lookhart y Albers (1988) y Seilmeier y Wieser (2003). Según lo mencionado anteriormente, y en analogía a los resultados obtenidos por estos autores, de acuerdo a los tiempos de retención se identificaron 3 subgrupos, a los cuales se les asignaron las siguientes fracciones proteicas: grupo 1 (G1):  $\omega$ -gliadinas ( $\omega$ -GD), grupo 2 (G2):  $\alpha$  y  $\beta$ -gliadinas ( $\alpha/\beta$ -GD) y grupo 3 (G3):  $\gamma$ -gliadinas ( $\gamma$ -GD). En general, en términos de porcentaje de extracción, las gliadinas extraídas presentaron la siguiente tendencia:  $\alpha, \beta > \gamma > \omega$  (Tabla 1.5). Esta secuencia también fue encontrada por Seilmeier y Wieser (2003) y por Zhang y col. (2007). La extracción de  $\omega$ -GD no mostró diferencias significativas con respecto a G, en ninguna de las muestras evaluadas.

Por otra parte, se extrajo una menor cantidad de  $\alpha/\beta$ -gliadinas de las muestras GS0,5 y GD0,5. Un nivel de 0,5% p/p de emulsificante permitió, con respecto a G, una mayor extracción de  $\gamma$ -GD (Tabla 1.5). La interacción de los emulsificantes al 0,5% p/p con las proteínas del gluten favoreció la liberación de mayor cantidad de proteínas hidrofóbicas, como las  $\gamma$ -gliadinas, especialmente en el caso del SSL.

**Tabla 1.5.** Área (%) de picos de RP-HPLC de los extractos enriquecidos de gliadinas y gluteninas obtenidos de las diferentes muestras de gluten. Extracto enriquecido en gliadinas (EGD): G1 (2-6 min), G2 (30-45 min) y G3 (45-62 min). Extracto enriquecido en gluteninas (EGT): G1 (10-12,5 min) y G2 (30-62 min). G: gluten control, GS: gluten + SSL, GD: gluten + DATEM, GSD: gluten + SSL-DATEM. Números: % p/p emulsificante.

EGD	G	GS0,5	GS1	GD0,5	GD1	GSD0,5	GSD1
G1	1,12ab	0,87b	1,48a	1,31ab	1,15ab	0,90b	1,04b
G2	58,9a	54,2c	57,7ab	55,5bc	60,5a	59,4a	58,3ab
G3	39,7c	44,9a	40,8bc	43,2b	38,3c	39,7c	40,7bc
EGT	G	GS0,5	GS1	GD0,5	GD1	GSD0,5	GSD1
G1	33,3abc	30,2b	31,2bc	34,2ab	33,3abc	34,0ab	34,9a
G2	65,2bc	68,8a	67,6ab	64,6c	65,8bc	65,3bc	64,4c

Letras diferentes en la misma fila indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

En el caso de las gluteninas los perfiles se asociaron a las gluteninas de alta masa molecular (HMW-GT) y a las de baja masa molecular (LMW-GT) de acuerdo a

Kruger y col. (1988). El grupo 1 (G1) se asignó a las gluteninas de alta masa molecular (HMW-GT) y el grupo 2 (G2) a las de baja masa molecular (LMW-GT) (Kruger y col., 1988; Kawka y col., 1992). En el grupo 1 (G1) no se observaron diferencias significativas en ninguna de las muestras con respecto al control (G). De la muestra GS0,5 se extrajo mayor cantidad de LMW-GT (grupo 2, G2) (Tabla 1.5).

Estos resultados sugieren que un emulsificante más polar como el SSL interactuaría con las HMW-GT principalmente a través de uniones iónicas formando la matriz proteica del gluten y liberando de la misma las proteínas más pequeñas e hidrofóbicas (LMW-GT) (Gianibelli y col., 2001; Lookhart y col., 2003).

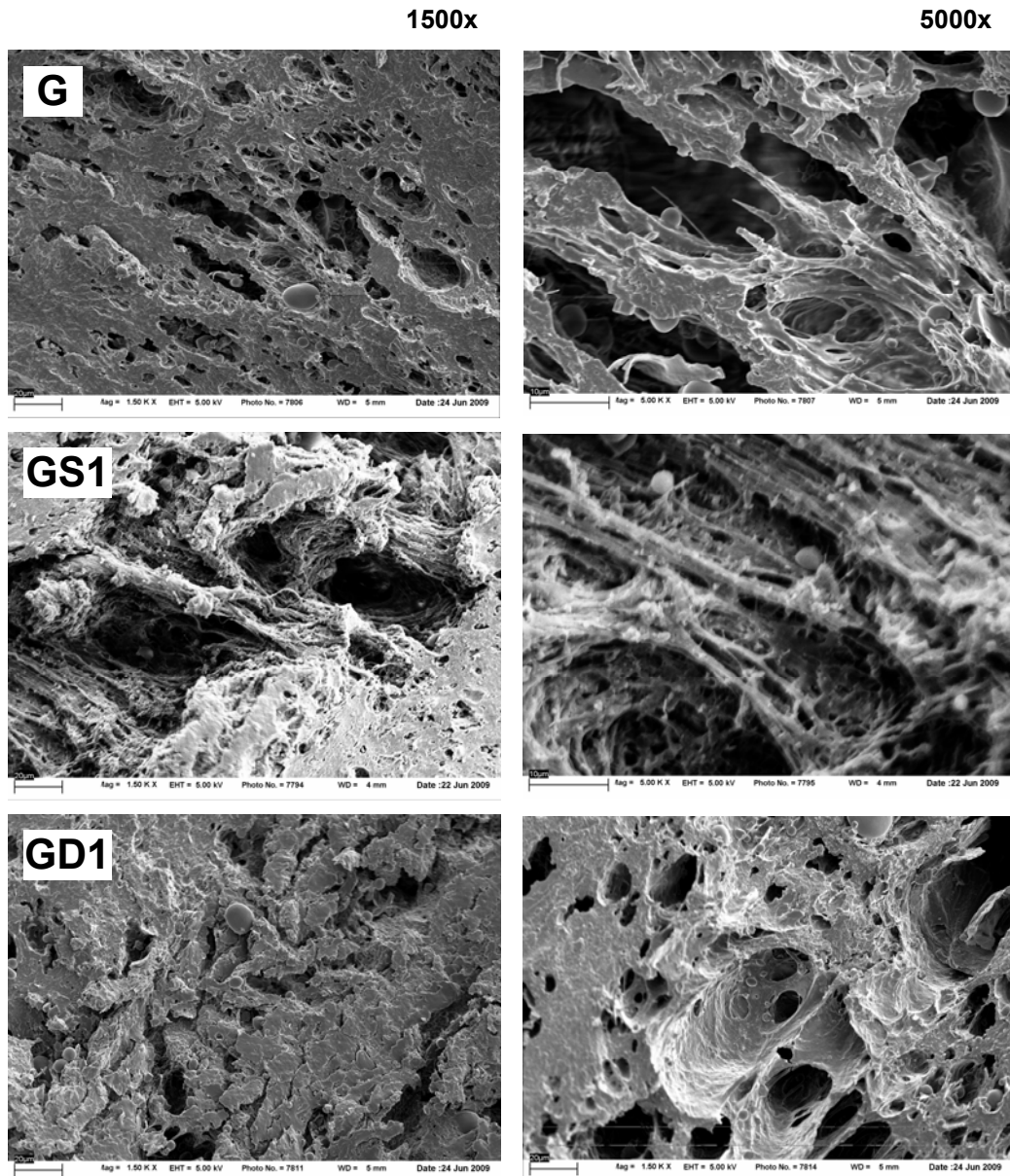
La alta solubilidad de las proteínas, el tipo de agregados solubles formados y el diferente perfil resultante de la extracción diferencial de gliadinas y gluteninas; sugiere la formación de una red de gluten más lábil debido a la acción del SSL.

## 1.5 Microestructura de la red de gluten

Los cambios que se producen en la estructura de las proteínas del gluten debido a la presencia de los emulsificantes están directamente relacionados con el tipo de red de gluten formada. En las micrografías SEM la red de gluten se presenta como una red fibrilar con la presencia de unos pocos gránulos de almidón (Figura 1.8).

Se pueden observar diferencias en la estructura de la red de gluten entre el gluten preparado con los aditivos y el control con dos aumentos diferentes: 1500x y 5000x. El gluten control (G) presentó una red continua y homogénea. Esta red fue modificada en presencia de SSL (GS1), presentando esta última una estructura más abierta y fibrosa. El agregado de DATEM (GD1) formó una red de gluten más laminar, con características similares a las del gluten control (G).

La red de gluten formada fue consecuente con los resultados obtenidos de solubilidad, SH<sub>L</sub> y SDS-PAGE. El agregado de los emulsificantes SSL y DATEM provocó cambios en la estructura de las proteínas del gluten como consecuencia de la formación y/o ruptura de enlaces disulfuro o uniones no covalentes (hidrofóbicas y/o iónicas). Estas modificaciones provocaron la formación de una matriz más lábil en el gluten que contenía SSL que la obtenida con DATEM, demostrando así que el modo de interacción de cada aditivo con las proteínas del gluten cuando se forma la matriz es diferente.



**Figura 1.8.** Micrografías de gluten control (G) y gluten con el agregado de 1% de SSL (GS1) y 1% de DATEM (GD1).

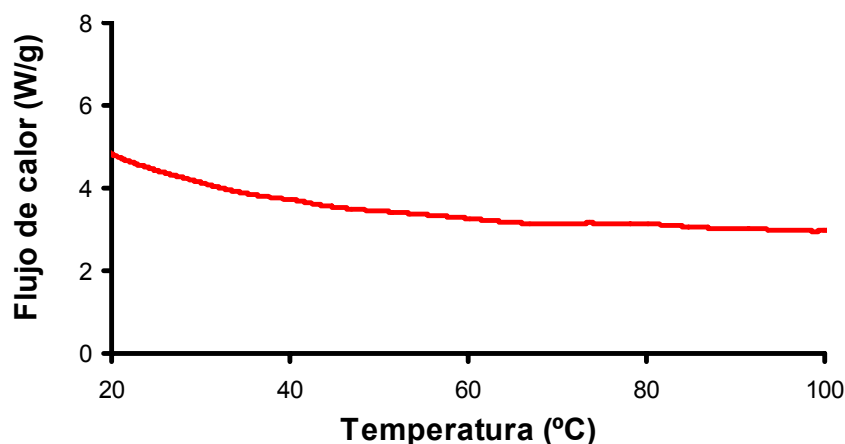
## 1.6 Transición vítrea del gluten

Las modificaciones estructurales pueden tener influencia en características físicas tales como la elasticidad o la gomosidad de la matriz del gluten. Trabajos anteriores indican que las sustancias que interactúan con el gluten pueden afectar la cinética de las reacciones de entrecruzamiento, la formación de la red de gluten y en



consecuencia su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) (Kalichevsky y col., 1992; Noel y col. 1995; Pommet y col. 2003). Los emulsificantes, al igual que el agua, tienen un efecto plastificante que causa una disminución en la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del gluten (Kalichevsky y col., 1992; Toufeili y Kokini, 2004). Debido a lo mencionado previamente, no sólo el proceso de calentamiento es importante en la transformación del gluten en la estructura del pan, sino también resulta de interés el estudio del efecto que ejercen los emulsificantes sobre la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del mismo. Por tal motivo se decidió también evaluar la  $T_g$  de todas las muestras de gluten reconstituidas con agua.

Se realizaron corridas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las muestras de gluten liofilizado reconstituido con agua. En la Figura 1.9 se muestra el termograma obtenido para el gluten control, en el cual no se observó ninguna transición térmica. Estas observaciones coinciden con resultados previos de otros autores (Arntfield y Murray, 1981; Ma, 1990), en los cuales de todas las proteínas vegetales estudiadas, sólo las de gluten no presentan la/s endoterma/s características de la desnaturalización proteica. El agregado de emulsificantes a la harina formó una estructura de gluten que tampoco presentó cambios endotérmicos (datos no mostrados), sugiriendo que los cambios conformacionales producidos por los emulsificantes sobre las gliadinas y gluteninas no son detectables por esta técnica.

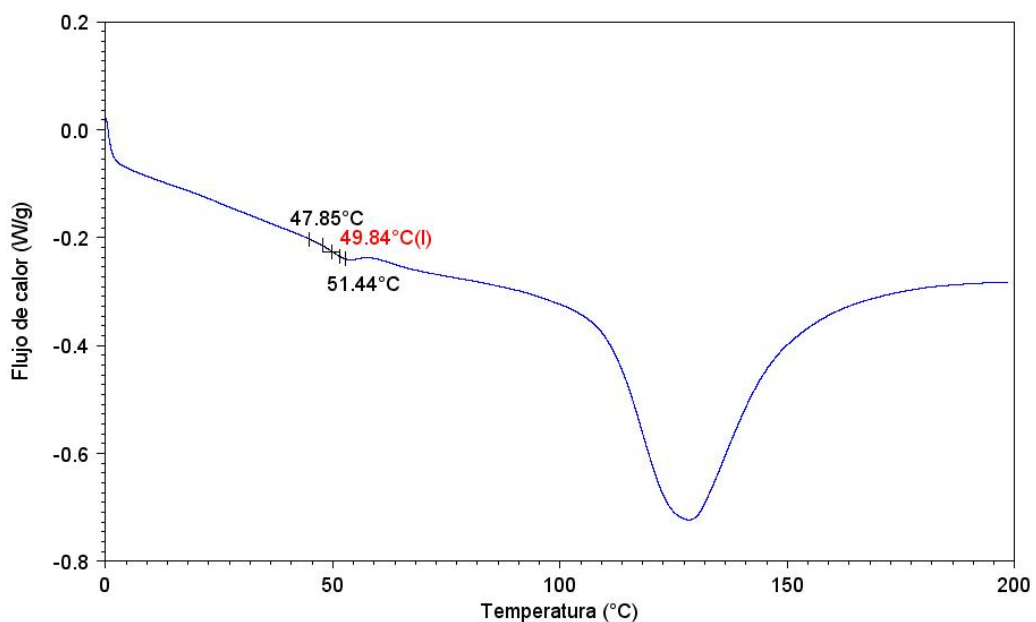


**Figura 1.9.** Termograma de gluten control.

El valor de  $T_g$  obtenido para la muestra de gluten control (G) liofilizado (8,2% de humedad) fue coincidente al obtenido por otros investigadores (Kalichevsky y col., 1992). En sus ensayos Kalichevsky y colaboradores (1992) encontraron que la  $T_g$  del gluten a una humedad de 10% fue de 54 °C, mientras que en nuestro caso fue de  $55,4 \pm 3,56$  °C (Tabla 1.6).

Todas las muestras presentaron un termograma semejante al mostrado en la Figura 1.10. En el mismo se puede observar la temperatura de transición vítrea calculada en el punto de inflexión ( $T_g = 49,84$  °C).

En todas las muestras analizadas (G, GS y GD) se observó una pequeña transición endotérmica que acompañó a la transición vítrea, la cual puede ser atribuida a una baja temperatura de relajación requerida por la red de gluten para alcanzar la movilidad necesaria para superar la transición vítrea (Toufeili y col., 2002). Además, se observó un gran pico endotérmico a una temperatura próxima a 120 °C. Tanto la temperatura (100-130 °C) como la entalpía (120-200 J/g) presentaron un comportamiento aleatorio no pudiéndose obtener resultados concluyentes. Diversos autores (Sartor y Johari, 1996; Ferrari y Johari 1997; Toufeili y col., 2002) han atribuido esta endoterma a reacciones de entrecruzamiento en el gluten.



**Figura 1.10.** Termograma de muestras de gluten liofilizado.

Para las muestras de gluten liofilizado (Tabla 1.6), la adición de SSL en bajas concentraciones (GS0,25 y GS0,5) provocó una disminución en el valor de  $T_g$ , mientras que el agregado de SSL al 1% (GS1) no presentó diferencias significativas con respecto al gluten control (G). El mismo comportamiento fue observado para las muestras de gluten-DATEM (GD), donde los valores de  $T_g$  se encontraron en el rango de 45,3 a 58,1 °C (Tabla 1.6). Para las muestras de gluten-SSL-DATEM al 1% (GSD1) (0,5% de cada emulsificante) los valores de  $T_g$  fueron significativamente inferiores a los obtenidos para GS1 y GD1, sugiriendo que el efecto de los emulsificantes no se potencia, sino que actúan cada uno de manera independiente. Toufeili y Kokini (2004) estudiaron el efecto del contenido de humedad sobre la  $T_g$  de muestras de gluten que contenían 10% (base gluten) de emulsificantes tales como SSL, DATEM y la mezcla de ambos aditivos. El rango de humedades evaluadas fue de 6,5-21,3% (base gluten). Estos autores encontraron una pequeña disminución en los valores de  $T_g$  del gluten en presencia de dichos aditivos.

**Tabla 1.6.** Valores de temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) obtenidos para las muestra de gluten liofilizado (columna 2) y gluten liofilizado reconstituido con agua (columna 3), preparado con emulsificantes. G: gluten control, GS: gluten + SSL, GD: gluten + DATEM, GSD; gluten + SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

	$T_g$ (°C)	
	Gluten liofilizado	Gluten rehidratado
<b>G</b>	55,4a	-7,35c
<b>GS0,25</b>	44,6b	- 7,21bc
<b>GS0,5</b>	46,0bc	- 6,93a
<b>GS1</b>	56,5a	- 6,97a
<b>GD0,25</b>	45,3bc	- 6,93a
<b>GD0,5</b>	47,7bc	- 7,04ab
<b>GD1</b>	58,1a	- 7,10ab
<b>GSD0,25</b>	45,9bc	- 7,08ab
<b>GSD0,5</b>	47,8bc	- 7,01ab
<b>GSD1</b>	50,2c	- 7,11ab

Letras diferentes en la misma fila indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

El gluten húmedo (67,2% de humedad) presentó un valor de  $T_g$  de  $-7,35$  °C (Tabla 1.6). Valores similares fueron encontrados por Toufeili y colaboradores (2002) para el gluten con un contenido de humedad equivalente. Estos autores también observaron un decrecimiento en los valores de  $T_g$  con el incremento de la humedad de la muestra, consistente con el efecto plastificante del agua sobre las proteínas. Los valores de  $T_g$  obtenidos por estos autores no mostraron cambios por debajo de  $-20$  °C para muestras con un porcentaje de humedad superior al 24%, sugiriendo la formación de un sistema concentrado con la máxima cantidad de agua congelable (Toufeili y col., 2002). En nuestros ensayos pudo observarse que para todas las muestras con aditivo el valor de  $T_g$  fue superior al de G. Contrariamente a lo ocurrido en las muestras de gluten liofilizado los emulsificantes no mostraron la propiedad plastificante característica de estos aditivos. Este comportamiento podría atribuirse a que el gran contenido de agua de las muestras (67,2%) minimizó el efecto plastificante de los aditivos.

Los resultados obtenidos para las muestras preparadas mediante la incorporación in situ de emulsificantes (1 y 5% p/p) al gluten nativo se muestran en la Tabla 1.7.

**Tabla 1.7.** Valores de temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) obtenidos para mezclas de gluten-emulsificante reconstituido con agua "in situ". G: gluten control, GS: gluten + SSL, GD: gluten + DATEM, GSD: gluten + SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

Gluten rehidratado	$T_g$ (°C)
<b>G</b>	-7,35a
<b>GS1</b>	- 7,14a
<b>GS5</b>	-7,99bc
<b>GD1</b>	-7,33a
<b>GD5</b>	-7,99c
<b>GSD1</b>	-7,16a
<b>GSD5</b>	-7,89b

Letras diferentes indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

La adición de emulsificantes en un nivel de 5% p/p provocó una disminución en el valor de  $T_g$ , obteniéndose valores cercanos a  $-8\text{ }^\circ\text{C}$ , mientras que el agregado de 1% p/p no mostró diferencias significativas con respecto al control. En ambos casos no se observaron diferencias entre los distintos aditivos. La disminución en el valor de  $T_g$  observada para el nivel de emulsificante de 5% sugiere que estos aditivos ejercen un efecto plastificante sobre el gluten, al igual que el agua y los ácidos grasos de baja masa molecular (Kalichevsky y col., 1992; Noel y col., 1995; Sartor y Johari, 1996; Micard y Guilbert, 2000; Pommet y col., 2003). Este comportamiento no es específico, es decir, no depende de la naturaleza del emulsificante.

Al comparar las muestras de gluten con 1% de emulsificantes reconstituidas con agua (Tabla 1.6) con aquellas reconstituidas "in situ" (Tabla 1.7) pudo comprobarse que el agregado de emulsificantes "in situ" no mostró diferencias significativas con respecto al gluten control (G), mientras que para las muestras reconstituidas con agua los valores de  $T_g$  obtenidos en presencia de emulsificantes fueron superiores al de G. Esto podría atribuirse a que la incorporación de dichos aditivos junto con la harina y el agua para formar la masa condicionarían la formación de la red de gluten, mientras que al agregar dichos aditivos al 1% p/p, luego que el gluten ya se ha formado, no modifica su estructura y por lo tanto no ejerce efectos sobre la temperatura de transición vítrea del gluten.

Los valores de  $T_g$  de este trabajo de tesis fueron similares a los encontrados por Toufeili y Kokini (2004), quienes atribuyeron dichos valores al fenómeno de hidratación del gluten. Durante este fenómeno, los dominios hidrofílicos del gluten serían los responsables de la transición vítrea. Estudios realizados por diversos autores (Belton y col., 1995; Gilbert y col., 2000) han demostrado que la movilidad de las proteínas de gluten así como la formación de estructura lámina plegada  $\beta$  aumentan durante la hidratación. Estas observaciones llevaron a la elaboración del modelo "bucle y cadena" ("loop and train") propuesto por Belton (1999) y detallado en la Introducción de esta tesis. El resultado de la hidratación del gluten es un equilibrio entre las regiones hidratadas "bucle" y las regiones "cadena" unidas por puente hidrógeno, con una relación entre ambas que dependerá del estado de hidratación del sistema. Este fenómeno estaría asociado a los cambios moleculares que se producen cuando la muestra pasa del estado vítreo al estado gomoso (Belton, 1999).

## 1.7 Conclusiones parciales

Los emulsificantes SSL y DATEM provocaron diferentes cambios en la estructura del gluten. El SSL a concentraciones de 0,25% y 0,5% p/p indujo un plegamiento en la estructura proteica con un incremento en la conformación  $\alpha$ -hélice (formación de puentes hidrógeno) y un decrecimiento en las conformaciones lámina y giro  $\beta$  y en las estructuras al azar (random coil). Este plegamiento de las proteínas fue confirmado por: los cambios producidos en los modos vibracionales del estiramiento de los puentes disulfuros (S-S), la baja exposición de los residuos de tirosina y el ocultamiento de los residuos de triptófano a 0,25% p/p de emulsificante hacia un entorno hidrofóbico. El bajo valor obtenido para el SSL a 0,25% p/p en la banda correspondiente al estiramiento C-H ( $2934-2950\text{ cm}^{-1}$ ) podría estar relacionado a la baja exposición de la tirosina, sugiriendo un cierto grado de orden en la estructura proteica, lo cual correlacionaría con el mayor contenido de  $\alpha$ -hélice.

A alta concentración de emulsificante (1% p/p) el SSL provocó un mayor grado de desorden que a concentraciones menores, evidenciado en una estructura más abierta y más lábil (micrografías SEM). Esta estructura permitió la solubilización de una gran proporción de agregados poliméricos, formados por los péptidos de 60 y 103 kD y principalmente por las subunidades de 35 y 40 kD. El SSL al 0,5% también permitió la extracción de un mayor porcentaje de  $\gamma$ -gliadinas y de gluteninas de baja masa molecular (LMW-GT), en comparación con las muestras de gluten y de gluten-DATEM. Estos resultados confirman la evidencia de la formación (a niveles de 0,5% de SSL) de una red de gluten más débil, con una gran tendencia a la depolimerización.

Las diferencias producidas por los emulsificantes SSL y DATEM en la estructura del gluten podría ser atribuída a las diferentes estructuras químicas que poseen dichos aditivos, las cuales condicionarían su balance hidrofílico/lipofílico y, por lo tanto, el tipo de unión que cada uno establecería con las proteínas del gluten. Al ser SSL un emulsificante con un alto balance hidrofílico-lipofílico (HLB=21) interactuaría con las proteínas del gluten principalmente mediante enlaces iónicos, mientras que el DATEM al poseer un mayor carácter hidrofóbico (HLB=9,2) lo haría mediante uniones hidrofóbicas. Estas diferencias en los valores de HLB serían determinantes a la hora de constituir la red de gluten, lo cual conllevaría a la formación de matrices

de diferentes características. Ambos emulsificantes mostraron que al ser agregados a la harina para obtener el gluten disminuyen la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), demostrando de esta manera su capacidad plastificante.

Estas diferencias son las que influirían directamente en las propiedades estructurales, reológicas y térmicas de la masa y consecuentemente en la calidad del pan obtenido.

# **CAPITULO 2**

---

**Efecto de los emulsificantes sobre la estructura y el  
comportamiento reológico de masas**

---



## 2.1 Caracterización de la harina

A fin de evaluar la calidad de la harina que se utilizó en este trabajo de tesis, se realizaron los ensayos físicoquímicos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Propiedades físicoquímicas y reológicas de la harina 000 utilizada en el ensayo (Harina 000<sub>exp</sub>) y de una harina promedio (Harina 000<sub>prom</sub>) proveniente de las campañas 2003/2004 y 2004/2005 (Cuniberti y Riberi, 2003, 2004).

Parámetro*	Harina 000 <sub>exp</sub>	Harina 000 <sub>prom</sub>
Humedad (%)	13,2 ± 0,3	12,4 ± 0,6
Cenizas (%)	0,705**	0,514 ± 0,052
Proteínas (%)	10,7 ± 0,0	10,2 ± 0,2
Gluten húmedo (%)	29,8 ± 0,5	24,3 ± 1,1
Gluten seco (%)	9,8 ± 0,2	8,7 ± 0,6
<b>Alveograma</b>		
Tenacidad-P (mm H <sub>2</sub> O)	110 ± 5,7	101,5 ± 12,0
Extensibilidad-L (mm)	80 ± 1,4	74,5 ± 4,9
Relación P/L	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Trabajo de deformación-W (10 <sup>-4</sup> J)	301 ± 18	273 ± 43
<b>Farinograma</b>		
Absorción de agua (%)	60,0**	60,4 ± 1,3
Tiempo de desarrollo (min)	8,5**	6,9 ± 0,0
Estabilidad (min)	16,0**	10,0 ± 1,9
Aflojamiento (UF)	40,0**	47,0 ± 14,1

\* Porcentajes expresados en base húmeda.

\*\* Datos suministrados por Molino Campodónico Ltd.

Los resultados obtenidos fueron comparados con los valores registrados para una harina promedio, de la zona norte de la provincia de Buenos Aires (Harina 000<sub>prom</sub>), correspondiente a las campañas 2003/2004 y 2004/2005 (Cuniberti y Riberi, 2003, 2004).

El valor de humedad obtenido se encuentra dentro de las especificaciones del CAA (máx. 15,0%). Este parámetro tiene importancia desde el punto de vista de la conservación de la harina, por lo que se lo considera un parámetro de calidad (Kent, 1975). También es importante en la determinación de los ensayos alveográficos y

farinográficos, ya que dichas pruebas se realizan a humedad constante (14,0%) y, por lo tanto, es necesario conocer previamente el valor de humedad de la muestra.

Según estudios previos, la relación óptima entre el gluten húmedo y el gluten seco debe ser cercana a 3 para harinas de calidad panadera estándar (Almutawah y col., 2007; Zaidel y col., 2009). En base a esta correlación nuestra harina presentó una relación entre el gluten húmedo y seco de 3,04, por lo que se pudo comprobar, según lo mencionado anteriormente, que es una harina óptima para panificar (Georget y Belton, 2006; Almutawah y col., 2007).

Tanto los parámetros alveográficos como los farinográficos mostraron valores similares a los registrados para la harina promedio (Tabla 2.1). Los parámetros alveográficos dieron valores aceptables de P y L, la relación P/L arrojó un valor de 1,4. El parámetro P/L representa el balance entre la tenacidad y la extensibilidad de la masa. Cuando ese valor se acerca a 1 (óptimo) (Cheftel y Cheftel, 1992), la masa presenta una relación equitativa de elasticidad y extensibilidad, por lo tanto, es una masa óptima para ser utilizada en panificación (Indrani y col., 2007; Indrani y Rao 2007), siempre y cuando el trabajo de deformación (W) sea aceptable (harinas de calidad panadera presentan valores de W mayores a 250) (Cheftel y Cheftel, 1992).

Los parámetros obtenidos para la harina utilizada en este trabajo fueron similares a los de la harina promedio destinada a panificación, por lo que se considera que nuestra harina es indicada para el estudio del efecto de emulsificantes en la calidad panadera.

Como se mencionó en el Capítulo 1 el 80% de los aspectos de calidad panadera de las harinas se deben a las variaciones producidas en las proteínas que conforman el gluten (Shewry y col., 2001). Los emulsificantes, como se ha evidenciado anteriormente (Capítulo 1), produjeron cambios en la estructura del gluten que influirán en las propiedades reológicas de la masa y la calidad del pan.

## 2.2 Efecto de los emulsificantes sobre la estructura de masas

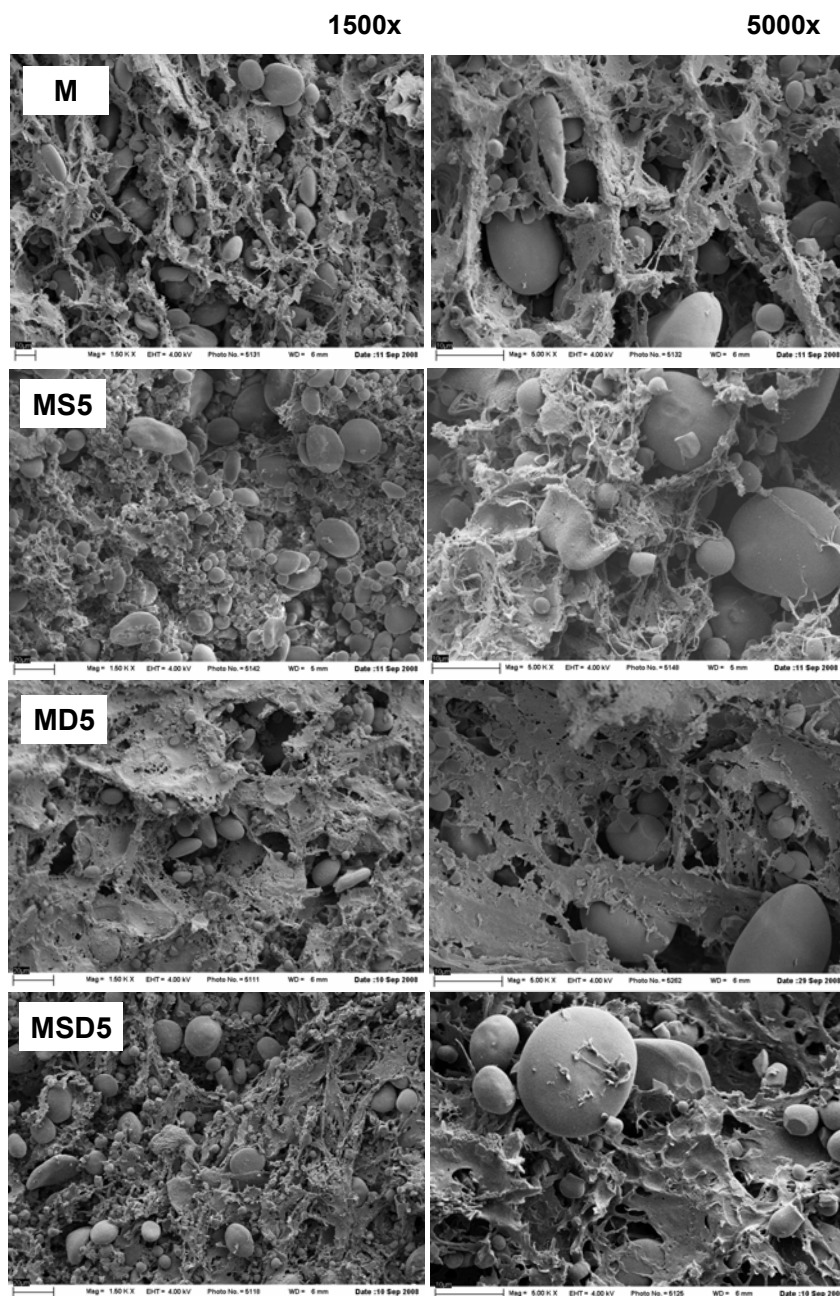
### 2.2.1 Microestructura de las masas

Con el propósito de evaluar si se producen cambios estructurales provocados por los emulsificantes sobre la matriz del gluten, se realizaron ensayos de microscopía electrónica de barrido (SEM) sobre las masas con y sin el agregado de aditivos. En estas micrografías la red de gluten se presenta como una red fibrilar en la cual están inmersos los gránulos de almidón (Rojas y col., 2000) (Figura 2.1). Estos gránulos presentan forma aproximadamente esférica y su tamaño es variado, observándose principalmente dos poblaciones predominantes, gránulos grandes de diámetro superior a 10  $\mu\text{m}$  y gránulos más pequeños de diámetro inferior a 10  $\mu\text{m}$  (Prabhasankar y col., 2003). También pueden visualizarse algunas cavidades vacías correspondientes a células de aire formadas durante el amasado. Resultados similares han sido informados por Létang y col. (1999), en cuyos ensayos evaluaron microscópicamente el comportamiento de masas elaboradas con harina de trigo con distintos contenidos de agua y a distintos tiempos de amasado. Las masas obtenidas por estos autores con la cantidad óptima de agua presentaron características similares a la masa control (sin aditivo, M) de esta tesis.

Las micrografías SEM (Figura 2.1) mostraron diferencias en la conformación de la red de gluten entre las masas preparadas con los emulsificantes y el control (sin aditivo). La masa control (M) presentó una red de gluten fibrosa, mientras que en la masa que contenía 5% p/p de DATEM (MD5) se formó una matriz más homogénea de tipo laminar. Por su parte, en la muestra con 5% p/p de SSL (MS5) se generó una red más desagregada. La mezcla de ambos aditivos al 5% (2,5% de SSL+ 2,5% de DATEM, MSD5) mostró una red de gluten de aspecto aparentemente intermedio al de la de los aditivos puros, aunque levemente similar a MS5 (Figura 2.1). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el Capítulo 1 (Inciso 1.6) para las muestras de gluten.

Ribotta y col. (2004) estudiaron el efecto del agregado de DATEM al 0,5% y otros aditivos a masas congeladas elaboradas con harina de trigo. Estos autores, a través de las micrografías SEM, encontraron que tanto para masas congeladas como sin congelar, en presencia de DATEM se formó una matriz con mayor cantidad de

celdas de aire y menos densa que la masa control. En nuestros ensayos, la masa control (M) presentó características similares a las observadas por dichos autores, mostrando una red de gluten fibrosa con gránulos de almidón embebidos en ella. Sin embargo, la masa que contenía DATEM (MD5) formó una matriz más homogénea (tipo laminar) que la masa control (M) (Figura 2.1). No se observó mayor cantidad de celdas de aire que en el control, esto puede atribuirse a que en nuestros ensayos se utilizaron masas preparadas con una concentración mucho mayor de emulsificante (5% p/p, base harina).

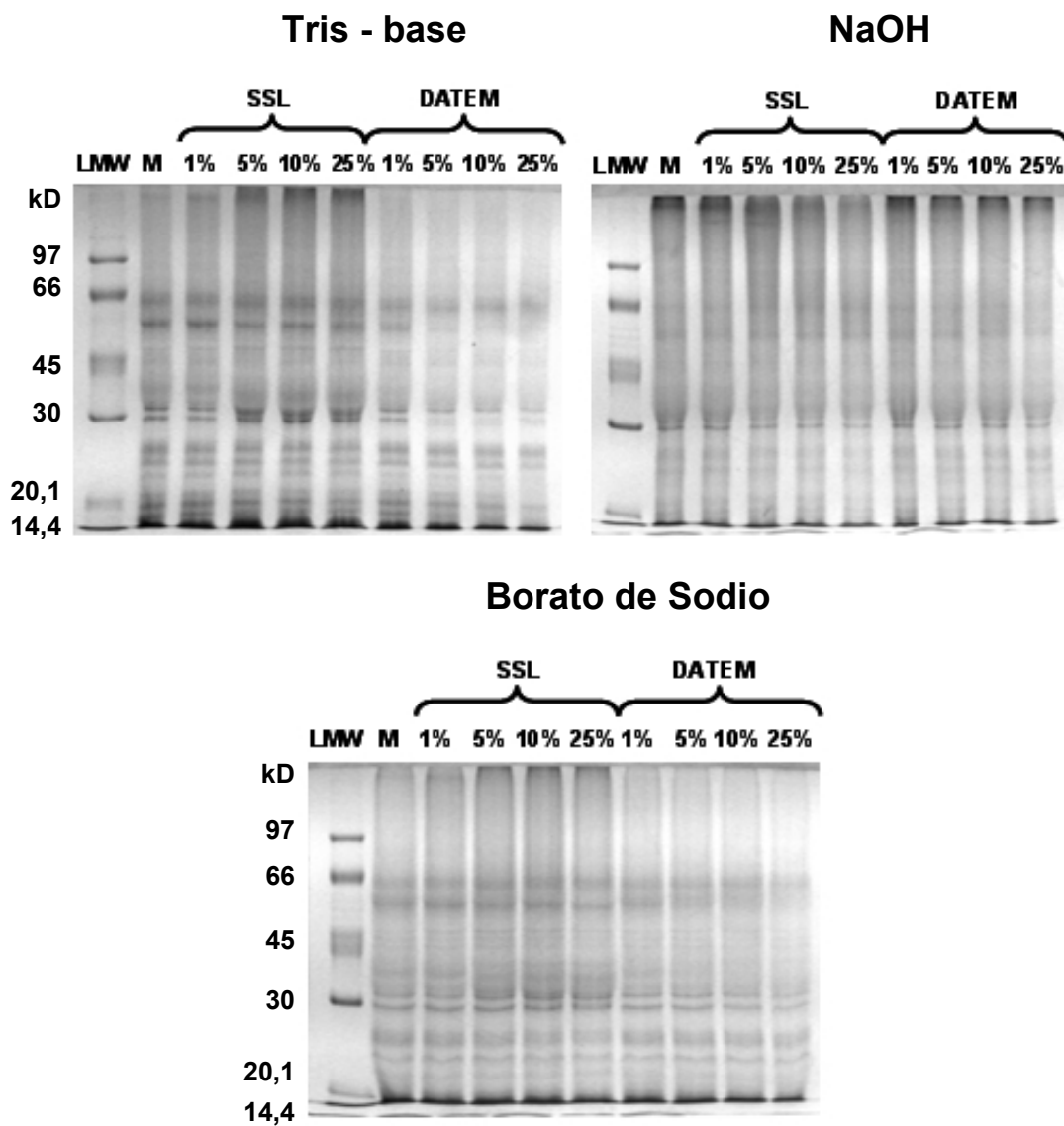


**Figura 2.1.** Micrográficas de masa control (M) y masa con el agregado de 5% de SSL (MS5), DATEM (MD5) y la mezcla de ambos aditivos (MSD5).

## 2.2.2 Proteínas de las masas

La extracción de proteínas de la masa y su posterior análisis por electroforesis permite evaluar la naturaleza de las proteínas solubles que forman parte de la matriz.

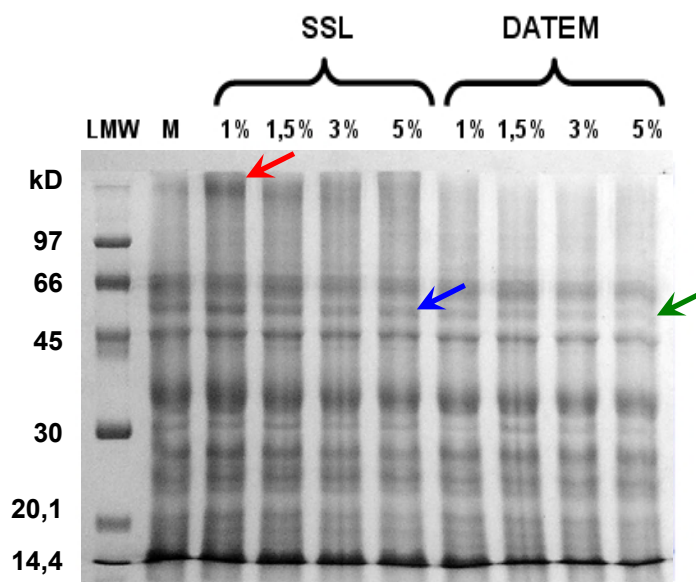
Se analizaron en un ensayo previo tres buffers de extracción distintos: Tris-base 0,0625 M (pH = 10), NaOH 0,1 M (pH = 13) y Borato de Sodio 0,1 M (pH = 10). La Figura 2.2 muestra la SDS-PAGE de las proteínas extraídas de las masas con dichos medios de extracción.



**Figura 2.2.** LMW = patrón de proteínas de bajo peso molecular. M = masa control

Con Tris-base se observaron agregados de alta masa molecular en las muestras que contenían SSL. A mayor contenido de emulsificante, mayor fue la extracción de dichos agregados. Con la solución de NaOH se extrajo una mayor cantidad de agregados de alta masa molecular en la muestra control (M) y en las que contenían menor proporción de aditivos, evidenciando una diferente acción del NaOH sobre la matriz formada por las proteínas y los emulsificantes. El buffer Borato de Sodio no permitió la extracción de agregados de alta masa molecular. En base a estos resultados se decidió utilizar el Tris-base como medio de extracción.

Diversos autores (Kruger y col. 1988, 1990; Singh y col., 1990) identificaron mediante SDS-PAGE, tal como se indicó previamente, diferentes tipos de proteínas en el siguiente orden decreciente de masas moleculares: gluteninas de alta masa molecular (HMW, 70-100 kD),  $\omega$ -gliadinas (50-65 kD), en forma conjunta gluteninas de baja masa molecular (LMW, 30-40 kD) y  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas (33-40 kD) y por último albúminas y globulinas ( $\leq 25$  kD). Basándonos en los resultados obtenidos por estos autores, la masa control (M) (Figura 2.3) presentó un perfil con subunidades en el rango de 15-25 kD (15,2; 17,2; 19,2; 20,8; 23,7; 24,8) correspondiente a las albúminas y globulinas.



**Figura 2.3.** SDS-PAGE. Masa liofilizada (M) con diferentes contenidos de SSL y DATEM. LMW: patrón de proteínas de baja masa molecular.

También se observaron subunidades en el rango de 26-36 kD (26,1; 27,6; 31,0; 33,6; 35,4) correspondiente a las gluteninas LMW y a las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas. Por

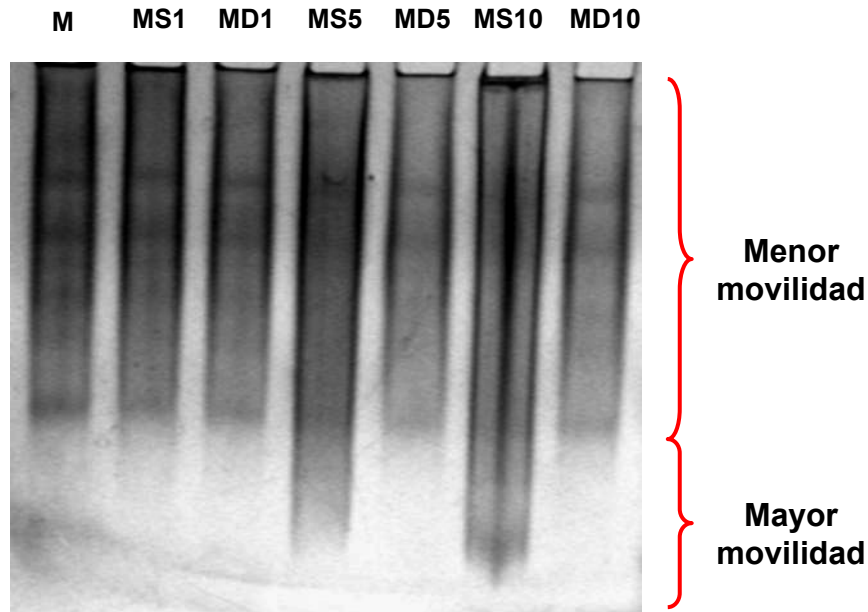
último proteínas en un rango de 45-69 kD (45,4; 54,6; 62,6; 65,0 y 68,2 kD) correspondiente a las  $\omega$ -gliadinas, a excepción de la subunidad de 68,2 kD posiblemente glutenina HMW.

Bajas concentraciones de SSL formaron una matriz que fue afectada por la adición de buffer Tris-base permitiendo la extracción de agregados de alta masa molecular (Figura 2.3, flecha roja) y la subunidad de 54,6 kD (Figura 2.3, flecha azul). Cantidades superiores de SSL estabilizaron la matriz de un modo tal que dificultó la extracción de los agregados proteicos. Por su parte el DATEM, en forma independiente de la concentración, formó una matriz más estable a la extracción con Tris-base. La ausencia de agregados de alta masa molecular en el extracto soluble sugiere una posible participación de los mismos en la estabilización de los agregados insolubles que conforman la matriz del gluten. La banda de 54,6 kD se extrajo en menor proporción que en el caso del SSL y su intensidad disminuyó al aumentar la concentración de DATEM (Figura 2.3, flecha verde).

### *Agregados proteicos*

Los agregados proteicos extraídos en buffer Tris-base se analizaron mediante electroforesis nativa (Figura 2.4). La movilidad electroforética (relación carga/masa) de las proteínas fue mayor en las muestras con nivel de SSL igual o mayor al 5% (MS5 y MS10). Este comportamiento puede deberse a que el SSL, emulsificante de mayor HLB que el DATEM, en grandes cantidades inhibe la formación de grandes polímeros de la matriz. La repulsión electrostática generada por el SSL entre moléculas de proteínas, conduce a una mayor extracción de especies de baja masa molecular y a su vez de mayor carga.

Por su parte el DATEM, como mencionamos anteriormente, formó una matriz cuyos agregados con alta relación carga/masa no pudieron ser extraídos en condiciones nativas (Figura 2.4). Por lo tanto, el SSL modificaría, en forma diferente al DATEM, el entrecruzamiento entre moléculas de proteínas en la masa, formando una matriz de gluten más lábil de la que se logra extraer proteínas de mayor movilidad electroforética.



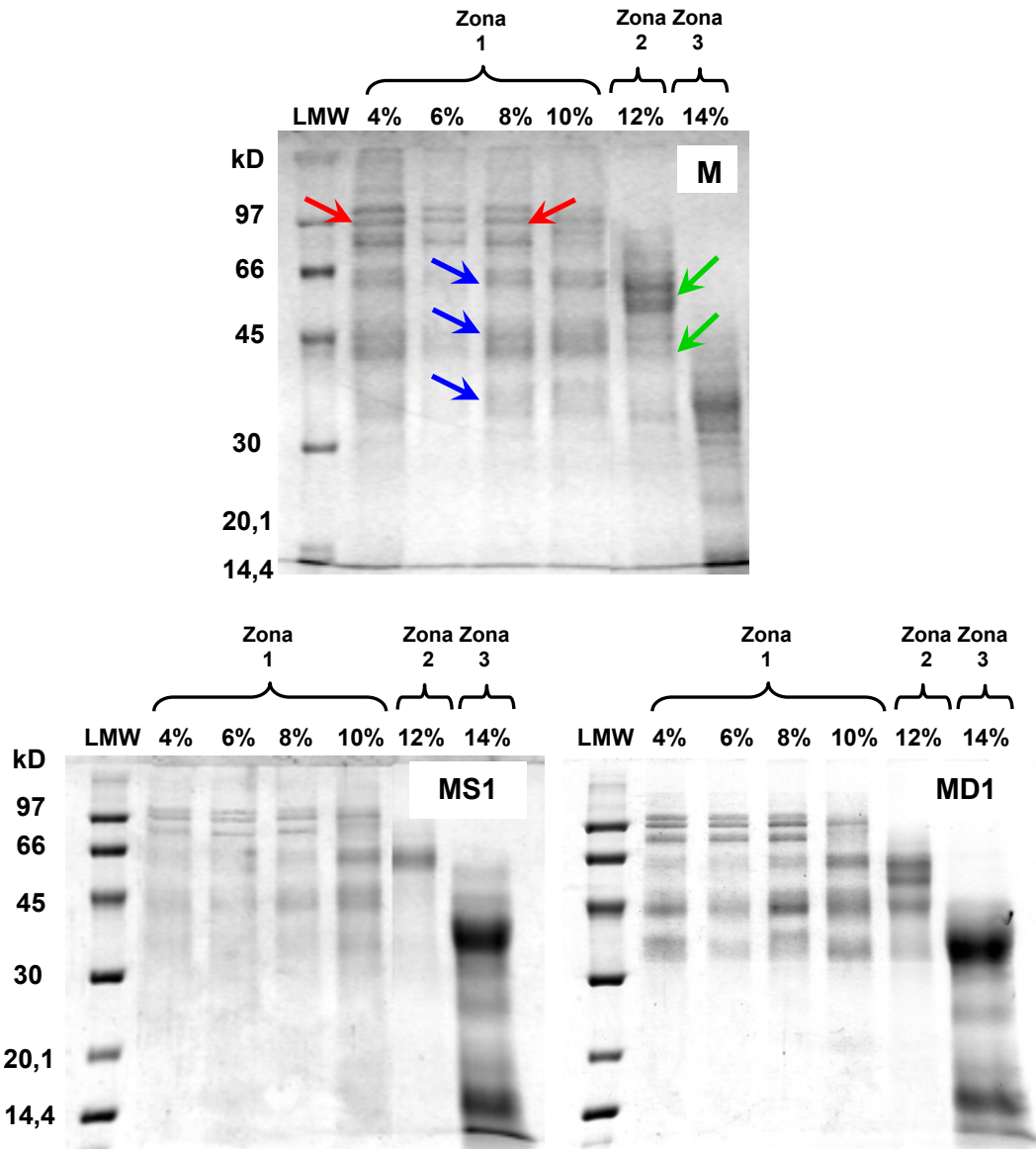
**Figura 2.4.** PAGE-Nativa. M: masa control, MS: masa + SSL, MD: masa + DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

En la Figura 2.5 se muestra un perfil MS-SDS-PAGE para la masa control (M), masa preparada con SSL al 1% (MS1) y con DATEM al 1% (MD1). De manera similar a lo realizado con las muestras de gluten (Capítulo 1, Inciso 1.3), se dividieron los diferentes stackings en tres zonas para facilitar la interpretación de los resultados.

Al igual que en las muestras de gluten (Capítulo 1, Figura 1.6), los agregados retenidos en los stackings de 4, 6 y 8% (zona 1) están formados por subunidades de 105, 98 y 85 kD (Figura 2.5, flechas rojas), y por subunidades de menor masa molecular (64, 46, 44 y 35 kD) (Figura 2.5, flechas azules).

De la masa control (M) se extrajo una menor proporción de polímeros de tamaño intermedio (stacking de 6%) en comparación a lo detectado para los stackings de 4 y 8% (Figura 2.5). Este comportamiento indica que una proporción de los polímeros de tamaño intermedio se encontrarían estabilizando la matriz de gluten. Los polímeros retenidos en el stacking de 10% presentaron composición polipeptídica de masa molecular mayor a 45 kD. Los agregados retenidos en la zona 2 (12%) están formados principalmente por subunidades de 62, 56, 46 y 44 kD ausentes en los agregados de mayor tamaño (Figura 2.5, flechas verdes). En la zona 3 (14%) quedaron retenidos los monómeros de baja masa molecular (< 40 kD) (Figura 2.5).





**Figura 2.5.** Electroforesis Multistacking. M: masa control, MS1: Masa + 1% SSL, MD1: Masa + 1% DATEM. LMW: patrón de proteínas de baja masa molecular.

Tanto la masa preparada con SSL (MS1) como la elaborada con DATEM (MD1), presentaron perfiles similares a la masa control (M) en la zona 1 (Figura 2.5). Sin embargo se extrajo mayor proporción de polipéptidos de la muestra que contenía DATEM. Este comportamiento puede atribuirse a que al extraer las proteínas con un buffer que contiene SDS, éste agente desnaturizante estaría rompiendo principalmente los enlaces hidrofóbicos (Rabilloud y Chevallet, 2000; Campbell y Farrell, 2009), uniones predominantes entre el DATEM y las proteínas. De esta manera se extraería mayor cantidad de proteínas de las masas que contienen DATEM que de las que poseen SSL.

Los agregados más pequeños retenidos en la zona 2 (12%) presentaron diferente composición polipeptídica para las diferentes masas. En las muestras M y MD1 se observaron principalmente tres bandas de 44, 56 y 62 kD; mientras que para MS1 se detectó sólo una banda a 62 kD, observándose un comportamiento análogo entre la masa control (M) y la masa con DATEM (MD1). En el caso de la masa control (M) se observaron bandas de 46 y 44 kD, que estuvieron ausentes en el perfil de la masa con SSL (MS1). Sólo la banda de 46 kD fue detectada en MD1. Estos resultados sugieren que los agregados solubles de masa molecular semejante estarían formados por diferente tipo de monómeros.

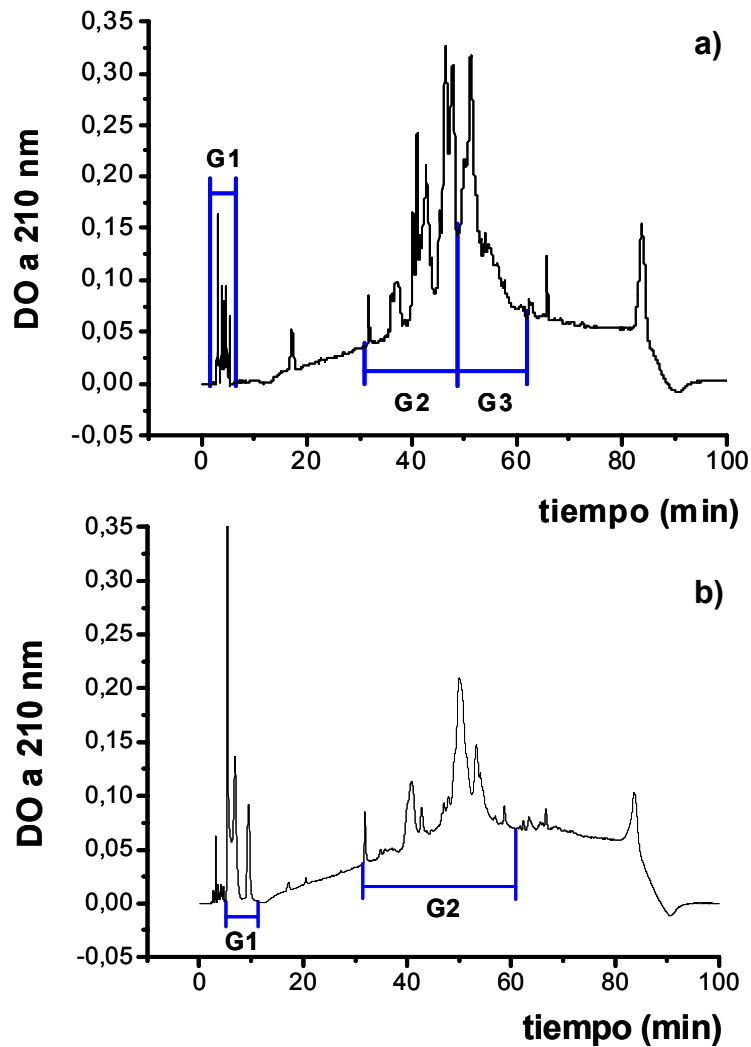
Al comparar los resultados obtenidos con las muestras de gluten analizadas en el Capítulo 1 (Inciso 1.3) pudo comprobarse que los perfiles observados para la zona 1 fueron similares en ambos grupos de muestras. Sin embargo en la masa que contenía DATEM se extrajo mayor cantidad de proteínas que de la que contenía SSL. Al ser el SSL un emulsificante más hidrofílico que el DATEM (HLB=21 vs. HLB=9,2) se uniría no sólo por uniones hidrofóbicas al gluten, sino también por uniones iónicas y puente hidrogeno a la amilopectina del almidón, formando una matriz más estable de menor grado de depolimerización.

Esta diferencia también fue observada en los agregados retenidos en el stacking de 12%. En el caso del gluten estos agregados están formados por subunidades de 35 kD, mientras que en la masa están constituidos por las subunidades 56 y 62 kD (Figura 1.6 y 2.5). Diferencias entre los perfiles electroforéticos entre la masa y el gluten sugieren que el almidón interacciona con los emulsificantes jugando un rol importante en la formación de la matriz de la masa.

### *Gliadinas y Gluteninas*

Las fracciones enriquecidas en gliadinas y gluteninas extraídas de las masas fueron analizadas por HPLC. En la Figura 2.6 se muestran los cromatogramas de RP-HPLC de las fracciones de gliadinas y gluteninas extraídas de la masa control liofilizada ( $DO_{210}$  vs  $t_{retención}$ ). Para las gliadinas se identificaron 3 zonas que abarcaron diferentes grupos de proteínas (G1 a G3), los cuales se dividieron de acuerdo a los siguientes tiempos de retención: G1) 2-5,5 min, G2) 31-49 min y G3)

49-63 min. Para las gluteninas se identificaron 2 zonas, las cuales fueron divididas en los grupos G1 (5-11 min) y G2 (39-61 min) (Figura 2.6). Se calculó el área de cada grupo mediante la suma de las áreas de los picos que conformaban ese grupo, tomándose como área total la suma de las áreas de todos los grupos considerados.



**Figura 2.6.** Cromatograma RP-HPLC de masa control. **a)** GLIADINAS. **b)** GLUTENINAS.

El análisis de las áreas mostró diferencias de comportamiento entre los diferentes grupos de picos y agentes emulsificantes.

Las gliadinas, separadas por RP-HPLC, fueron identificadas conforme a su movilidad molecular (Lookhart y Albers, 1988; Seilmeier y Wieser, 2003). De manera análoga a lo mencionado en el Capítulo 1 (Inciso 1.4), se identificaron 3 subgrupos (de acuerdo a los tiempos de retención y a datos bibliográficos), a los cuales se les

asignaron las siguientes fracciones proteicas: grupo 1 (G1):  $\omega$ -gliadinas, grupo 2 (G2):  $\alpha$  y  $\beta$ -gliadinas y grupo 3 (G3):  $\gamma$ -gliadinas (Seilmeier y Wieser, 2003). En general, en términos de porcentaje de extracción, y al igual que en gluten, las gliadinas extraídas presentaron la siguiente tendencia:  $\alpha, \beta > \gamma > \omega$  (Tabla 2.2). Esta secuencia también fue encontrada por Seilmeier y Wieser (2003) y por Zhang y col. (2007).

En el caso de las  $\omega$ -gliadinas (G1), en presencia de emulsificante no se logró extraer mayor cantidad que la que se extrajo en la muestra control (M). Para el grupo 2 (G2:  $\alpha, \beta$ -gliadinas) no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de extracción correspondiente a las muestras con aditivos respecto al control, mientras que para el grupo 3 (G3) la extracción de  $\gamma$ -gliadinas se vio favorecida en presencia de DATEM al 5% (MD5) (Tabla 2.2). La interacción de este emulsificante al 5% con las proteínas de gluten en la masa favoreció la extracción de mayor cantidad de proteínas más hidrofóbicas y de baja masa molecular, como son las  $\gamma$ -gliadinas.

El emulsificante favoreció en la masa la interacción de las  $\omega$ -gliadinas con las demás proteínas de gluten. Sin embargo, al comparar estos valores con los obtenidos en el Capítulo 1 (Inciso 1.4), en el caso de la masa se extrae mayor % de  $\omega$ -gliadinas. Este comportamiento sugiere que el almidón se interpondría entre las moléculas de proteínas y los emulsificantes, resultando en una interacción más débil con las  $\omega$ -gliadinas y, por lo tanto, de más fácil extracción con 1-propanol 50% v/v. No se observaron diferencias significativas en la cantidad extraída de  $\alpha/\beta$  y  $\gamma$  gliadinas con respecto a las muestras de gluten (Capítulo 1, Inciso 1.4). En este caso, la relación gliadinas/gluteninas sería independiente de la presencia de almidón al momento de la extracción.

En el caso de las gluteninas se identificaron 2 grupos, cuyos perfiles fueron asociados a gluteninas de alta masa molecular (HMW-GT, grupo 1: G1) y a gluteninas de baja masa molecular (LMW-GT, grupo 2: G2) de acuerdo con Kruger y col. (1988). No se observaron diferencias significativas en la extracción de gluteninas HMW y LMW para las muestras que contenían SSL. Por su parte, la extracción de gluteninas HMW se vio favorecida en las muestras que contenían 5% de DATEM (MD5) y en la mezcla de ambos emulsificantes en sus dos concentraciones (MSD1 y MSD5) a expensas de las LMW-GT (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Área (%) de picos de RP-HPLC de los extractos enriquecidos de gliadinas y gluteninas obtenidos de las diferentes muestras de masa. Extracto enriquecido en gliadinas (EGD): G1 (2-5,5 min), G2 (31-49 min) y G3 (49-63 min). Extracto enriquecido en gluteninas (EGT): G1 (5-11 min) y G2 (39-61 min). M: masa control, MS: masa + SSL, MD: masa + DATEM, MSD: masa + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

EGD	M	MS1	MS5	MD1	MD5	MSD1	MSD5
G1	4,40a	3,55b	3,32b	3,60b	3,26b	3,05b	3,65b
G2	55,8a	54,4a	54,3a	53,5a	53,5a	54,0a	53,7a
G3	39,8b	42,1ab	42,4ab	42,9ab	43,2a	42,9ab	42,7ab
EGT	M	MS1	MS5	MD1	MD5	MSD1	MSD5
G1	36,0d	37,6cd	37,1d	37,9cd	40,6c	45,6b	49,6a
G2	64,0a	62,4ab	62,9a	62,1ab	59,4b	54,4c	50,4d

Letras diferentes en la misma fila indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

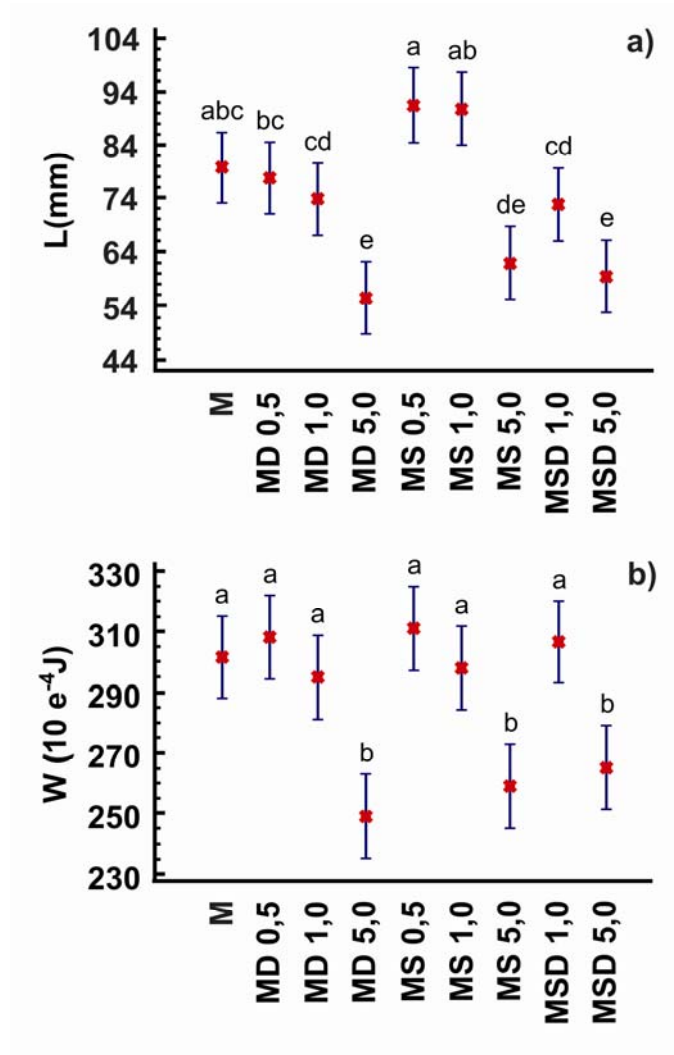
EGD. G1:  $\omega$ -gliadinas, G2:  $\alpha$  y  $\beta$ -gliadinas, G3:  $\gamma$ -gliadinas (Seilmeier y Wieser, 2003). EGT. G1: gluteninas HMW, G2: gluteninas LMW (Kruger y col., 1988).

Estos resultados sugieren que altas concentraciones de DATEM y SSL-DATEM (5%) interferirían con la unión entre las gluteninas, formándose menor proporción de macropolímeros de HMW-GT, y por lo tanto quedando estas proteínas libres para su extracción. Por ende, un emulsificante más hidrofóbico como el DATEM se uniría a las gluteninas LMW-GT mediante uniones hidrofóbicas, liberando así mayor cantidad de gluteninas HMW-GT (proteínas más hidrofílicas) al medio de extracción.

### 2.3 Efecto de los emulsificantes sobre las propiedades alveográficas y farinográficas

Los ensayos alveográficos mostraron que el agregado de emulsificantes no modificó en forma significativa, a ninguno de los niveles ensayados, la tenacidad (P) de la masa control (datos no mostrados).

Las masas elaboradas con 0,5% y 1% de SSL (MS0,5 y MS1) mostraron una extensibilidad (L) mayor a la observada en las preparadas con DATEM (MD0,5 y MD1) y la mezcla de ambos emulsificantes al 1% (MSD1) (Figura 2.7 a). La variación de extensibilidad para niveles superiores a 1% p/p de emulsificante en masas con MD y MSD resultó similar. Estos resultados sugieren que en MSD, el DATEM gobierna la extensibilidad de la masa.



**Figura 2.7. a)** Extensibilidad (L). **b)** Trabajo de deformación (W). M: masa control, MS: masa + DATEM, MS: masa + SSL, MSD: masa + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

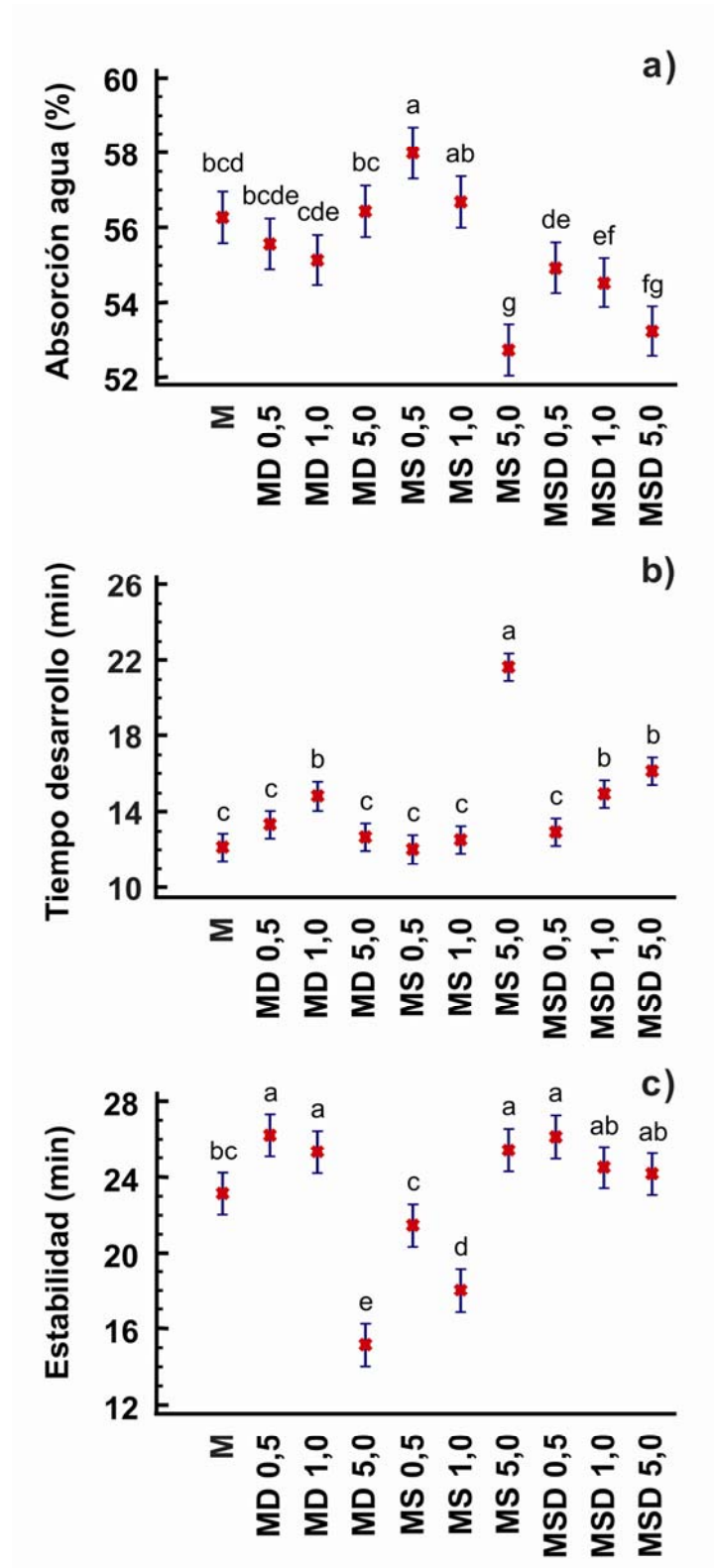
En todas las muestras se observó que la incorporación de 5% de aditivo disminuyó la extensibilidad de la masa con respecto a la masa control (M) (Figura 2.7 a). Por otra parte, sólo la incorporación de los emulsificantes al 5% mostraron un valor significativamente menor de trabajo de deformación (W) aplicado a la masa durante la extensión alveográfica, con respecto al control (Figura 2.7 b). Esto resulta lógico ya que al no existir diferencias significativas en la tenacidad (P) y al disminuir la extensibilidad (L), el trabajo de deformación (W) será menor. Esta disminución en los parámetros L y W obtenidos a un nivel de emulsificante de 5% puede ser atribuida a que concentraciones tan elevadas dan como resultado masas menos extensibles debido a que la red de gluten que se genera es muy débil y no es capaz de formar

una estructura como la masa control (Figura 2.1).

Los ensayos farinográficos mostraron que el agregado de SSL a la masa (MS) provocó un incremento en la absorción de agua al 0,5% de concentración y luego una disminución pronunciada hasta alcanzar un valor mínimo al 5% de  $52,7 \pm 0,8\%$  (Figura 2.8 a). No se observaron diferencias significativas en la masa que contenía DATEM (MD) con respecto a la masa control (M) en ninguna de las concentraciones ensayadas. El agregado de la mezcla de ambos aditivos (MSD) al 1% y 5% a la masa mostró que la absorción de agua disminuyó con respecto a M hasta alcanzar un valor de  $53,2 \pm 0,3\%$  (MSD5), similar al del SSL (Figura 2.8 a).

La capacidad de absorción de agua está íntimamente relacionada con el almidón. Al agregar altas concentraciones de emulsificante este parámetro disminuye. Esto podría ser atribuido a la formación del complejo amilosa-emulsificante. En la formación de este complejo la cola hidrofóbica del emulsificante se introduciría en el interior lipofílico de la hélice de amilosa, quedando la cabeza hidrofílica del aditivo (extremo polar) orientada hacia fuera (entorno hidrofílico). La amilopectina, al ser ramificada, no forma tan fácilmente dichos complejos con el emulsificante, sino que las interacciones que se producen entre ambos ocurrirían en la superficie de los gránulos de almidón vía enlaces puente hidrógeno con la cabeza polar del aditivo (Gaupp y Adams, 2004; Boute y Skogerson, 2004; Lakshminarayan y col., 2006). Debido a que el SSL posee mayor carácter hidrofílico que el DATEM, su cabeza polar interactuaría mediante uniones puente hidrógeno con la amilopectina. Al aumentar la concentración en las muestras de SSL de 0,5 a 5% (Figura 2.8 a) se establecerían mayor cantidad de uniones con la amilopectina, por lo que quedarían menos sitios disponibles para formar puente hidrógeno con las moléculas de agua, disminuyendo así la absorción de la misma. El agregado de la mezcla de ambos aditivos (MSD) a la masa mostró un comportamiento análogo a MD al 1%.

Los tiempos de desarrollo dieron valores entre 12 y 16 min, a excepción de MS5 que fue muy superior al resto, arrojando un valor de 21,6 min. Las muestras MD1, MSD1 y MSD5 mostraron un aumento significativo con respecto a M (Figura 2.8 b). El valor tan elevado registrado por la muestra MS5 podría atribuirse, entre otras causas, a que como la masa MS5 absorbió una cantidad de agua mucho menor tardará más tiempo en llegar a la consistencia óptima. Tiempos de desarrollo muy elevados no son deseables en la industria porque implican un consumo de energía mayor.



**Figura 2.8.** a) Absorción de agua. b) Tiempo de desarrollo. c) Estabilidad. M: masa control, MD: masa + DATEM, MS: masa + SSL, MSD: masa + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.



Al evaluar las características microestructurales obtenidas para esta masa (Figura 2.1) pudo observarse que la red de gluten formada presentó una textura desagregada, por lo tanto se esperaría que la masa preparada con esta cantidad elevada de emulsificante presente características texturales deficientes.

Las muestras MD0,5, MD1, MS5 y MSD0,5 mostraron una estabilidad superior a la masa control (M). Resultados similares han sido informados por Tsen y Weber (1981) quienes evaluaron el efecto de distintos emulsificantes en niveles de 0,5% p/p (b.h.) en las propiedades reológicas de masas elaboradas con harina de trigo. Coincidentemente con nuestros resultados, al realizar el ensayo farinográfico estos autores observaron que el agregado de 0,5% de DATEM a la masa provocaba un aumento en la estabilidad de la misma. Azizi y Rao (2004) evaluaron el comportamiento reológico de masas con el agregado de diferentes aditivos. Las muestras que contenían DATEM 0,5% (b.h.) mostraron una estabilidad superior a la masa control. Sin embargo, a diferencia de lo obtenido en nuestros ensayos también encontraron que las masas elaboradas con 0,5% de SSL presentaban una mayor estabilidad.

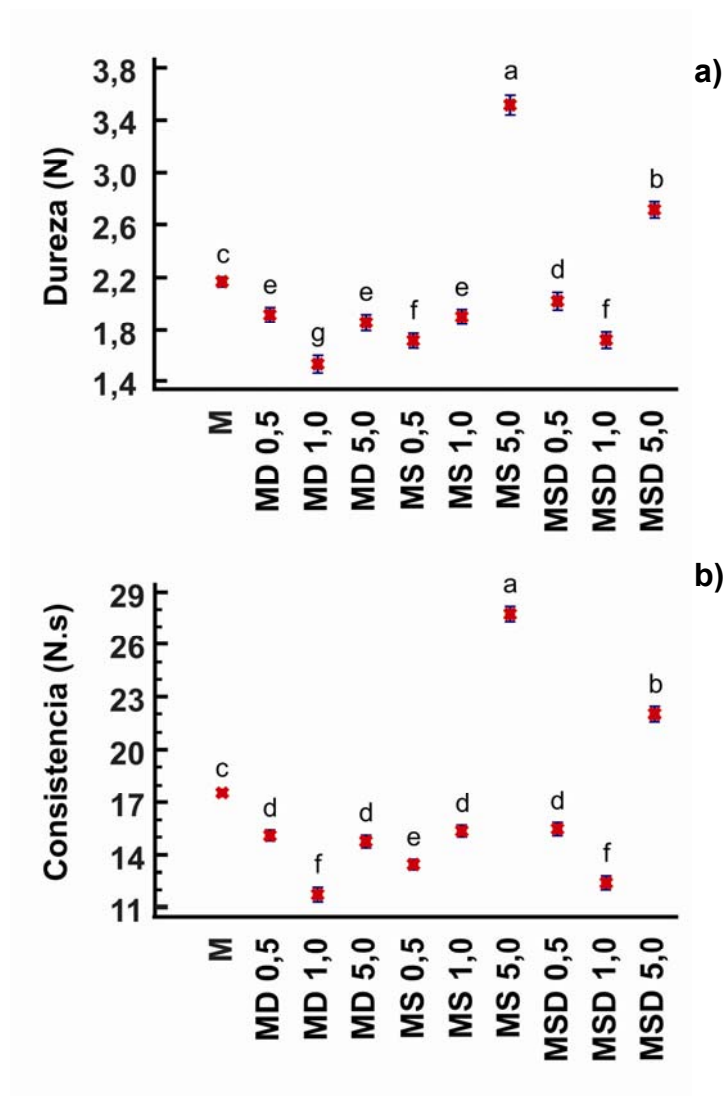
La muestra MD5 mostró una disminución pronunciada en la estabilidad hasta alcanzar un valor mínimo de  $15,1 \pm 1,2$  min (Figura 2.8 c). Al igual que el SSL, la cola hidrofóbica del DATEM forma complejos con la amilosa del almidón, pero a diferencia de éste, a pesar de poseer un residuo polar (residuo del ácido diacetil tartárico) formaría uniones puente hidrógeno con la amilopectina en menor proporción, lo que conllevaría a una desestabilización de la matriz, debido a la alta concentración de emulsificante (5%), que daría como resultado una masa menos estable.

La masa con SSL al 0,5% no mostró diferencias significativas con respecto al control, mientras que al 1% y al 5% arrojó valores de  $18,0 \pm 1,0$  min y  $25,4 \pm 0,5$  min, respectivamente. Para la mezcla de ambos aditivos (MSD) sólo la concentración de 0,5% mostró un aumento significativo con respecto a la masa control ( $26,1 \pm 0,6$  min) (Figura 2.8 c).

## 2.4 Efecto de los emulsificantes sobre las propiedades reológicas de masas

### 2.4.1 Textura y relajación de masas

La dureza de las masas que contenían 5% de SSL (MS5) y de la mezcla de ambos emulsificantes (MSD5) fue significativamente mayor a la de la masa control (M) (Figura 2.9 a), siendo MS5 la de mayor dureza ( $3,48 \pm 0,03$  N). Como observamos anteriormente, a nivel de 5% en la mezcla de ambos aditivos el que gobierna el efecto es el SSL.

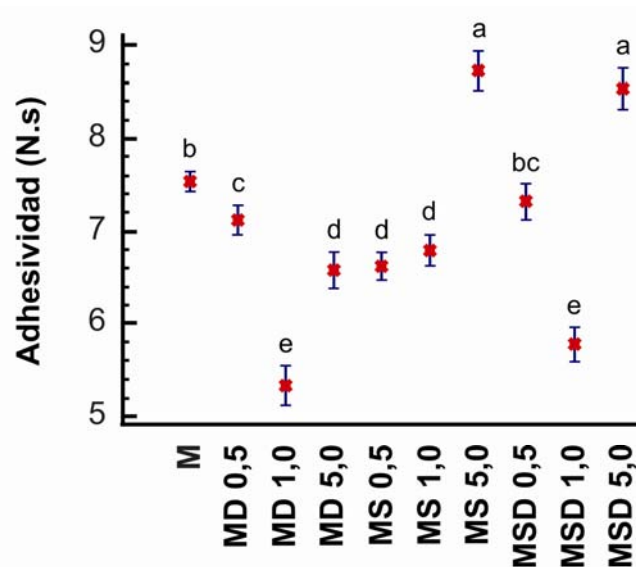


**Figura 2.9.** Dureza (a) y Consistencia (b) para el Análisis de Perfil de Textura (TPA). M: masa control, MD: masa + DATEM, MS: masa + SSL, MSD: masa + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

Con el agregado de 1% de emulsificante se obtuvieron masas menos duras que la masa control (M) para todas las muestras evaluadas, siendo la de menor valor (1,55 N) la masa preparada con DATEM (MD1). Al 0,5% de aditivo todas las masas presentaron una dureza inferior a la de la muestra control (M), siendo la muestra con SSL (MS0,5) la que arrojó el menor valor (1,70 N) (Figura 2.9 a).

Los resultados obtenidos para la consistencia, como era de esperar por la relación entre ambos parámetros, mostraron la misma tendencia que para la dureza (Figura 2.9 b).

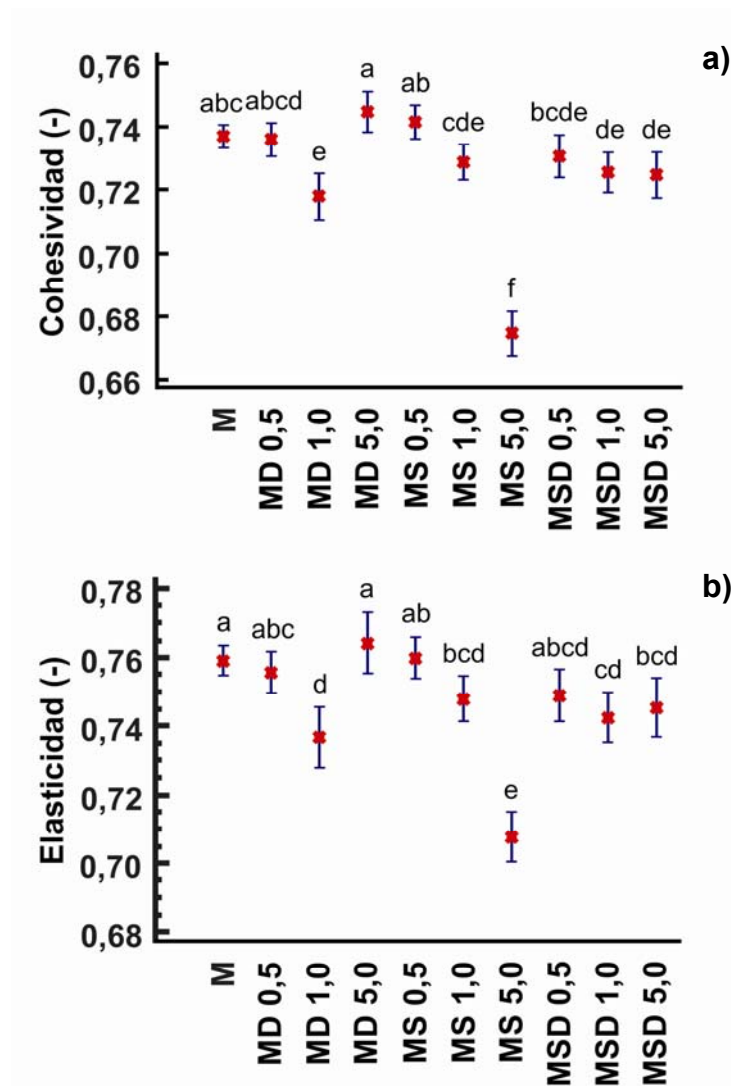
Las masas con SSL (MS5) y la mezcla de ambos aditivos (MSD5) al 5% fueron más adhesivas que la masa control (M), con un valor máximo de  $8,73 \pm 0,02$  N.s para MS5 (Figura 2.10). A excepción de las masas anteriores y también de MSD0,5, todas las demás muestras presentaron una adhesividad menor que la masa control (M) (Figura 2.10), especialmente MD1 ( $5,27 \pm 0,45$  N.s) y MSD1 ( $5,81 \pm 1,07$  N.s).



**Figura 2.10.** Adhesividad para el Análisis de Perfil de Textura (TPA). M: masa control, MD: masa + DATEM, MS: masa + SSL, MSD: masa + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

La cohesividad y elasticidad mostraron comportamientos análogos (Figura 2.11). Para ambos parámetros las muestras que presentaron menores valores fueron MD1 ( $0,71 \pm 0,02$  y  $0,73 \pm 0,02$ , respectivamente) y MS5, la cual presentó el menor valor de cohesividad ( $0,67 \pm 0,01$ ) y de elasticidad ( $0,69 \pm 0,02$ ). La elasticidad obtenida del TPA es la capacidad que presenta la masa para retornar a su estado inicial luego

aplicar una fuerza. El valor tan bajo de elasticidad obtenido para la muestra MS5 puede estar relacionado con que a altas concentraciones de SSL (5%) la matriz de gluten que se formó fue mucho más débil que la de la masa control (M) (Figura 2.1), esta matriz presentó una textura desagregada generando una masa mucho menos elástica.



**Figura 2.11.** Cohesividad (a) y Elasticidad (b) para el Análisis de Perfil de Textura (TPA). M: masa control, MD: masa + DATEM, MS: masa + SSL, MSD: masa + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

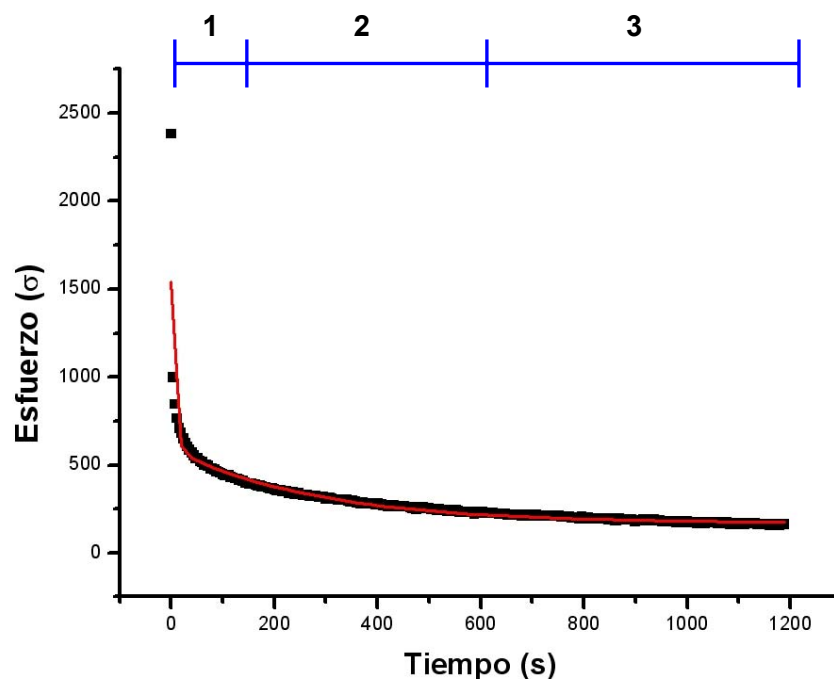
Resultados similares han sido reportados por Indrani y Rao (2003), quienes prepararon masas elaboradas con harina de trigo, sal, azúcar, huevos, aceite y agua (“parotta”). Se analizaron los parámetros de textura de dichas masas con el agregado de DATEM y SSL al 0,5%, entre otros aditivos. Los resultados obtenidos

por estos autores mostraron una disminución en los valores de dureza y adhesividad en presencia de los emulsificantes, con un aumento en la cohesividad.

Manohar y Rao (1999) estudiaron el efecto del agregado de SSL, entre otros aditivos, sobre las propiedades reológicas de masas elaboradas con harina de trigo. Coincidentemente con los resultados obtenidos en esta tesis, estos autores encontraron que concentraciones de 0,5% de este emulsificante disminuyeron la dureza, la consistencia y la adhesividad de la masa control.

Con el fin de estudiar la respuesta a largo plazo de la masa frente a un esfuerzo constante se realizaron ensayos de relajación. Estos ensayos muestran cómo, en una masa que ha sido sometida a una deformación, los segmentos de cadena poliméricos se reacomodan y toman la posición energéticamente más favorable (la de menor energía libre) liberando los esfuerzos internos del material.

Las curvas de esfuerzo de relajación fueron analizadas según el modelo de Maxwell y ajustadas mediante un análisis de decaimiento exponencial de segundo orden. Todas las muestras presentaron una curva de relajación similar, como la presentada en la Figura 2.12 correspondiente a la variación de la respuesta (esfuerzo) en función del tiempo para una masa con 1% de DATEM, sometida a una deformación por compresión (40%).



**Figura 2.12.** Curva de esfuerzo-relajación para una masa con 1% de DATEM ajustada por el modelo de Maxwell. ■ Datos experimentales, — Curva ajustada.  $R^2 = 0,98$ .

La curva presenta claramente tres zonas: la primer zona (1), de rápido decaimiento; la tercer zona (3) con la menor pendiente que se aproxima a un valor de equilibrio; y una segunda zona (2) intermedia (Rodríguez-Sandoval y col., 2009).

Según informes previos, las medidas del esfuerzo de relajación en masas y gluten han demostrado que el comportamiento de relajación de las masas puede ser descrito mediante dos procesos: una relajación rápida (0,1-10 s) y un proceso lento (10-10.000 s). La primera ha sido asociada con moléculas pequeñas que relajan rápidamente, y la segunda ha sido relacionada a polímeros de alta masa molecular que componen el gluten que relajan lentamente (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003; Li y col., 2003).

En la Tabla 2.3 se muestran los parámetros del esfuerzo de relajación obtenidos según el modelo de Maxwell para cada muestra. En todos los casos el  $R^2$  alcanzado fue igual o mayor a 0,98. Los módulos de relajación  $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$  están relacionados con la dureza y/o elasticidad de la masa; a mayor valor de  $E$  la masa será más dura.

**Tabla 2.3.** Parámetros de esfuerzo de relajación según el modelo de Maxwell para masas sin aditivo (Control) y con los distintos emulsificantes. M: masa control, MS: masa + SSL, MD: masa + DATEM, MSD: masa + SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

	$E_1$ (kPa)*	$E_2$ (kPa)*	$E_3$ (kPa)*	$\lambda_{rel1}$ (s)*	$\lambda_{rel2}$ (s)*
<b>M</b>	1,05c	2,72c	0,50d	282,4ab	6,79bc
<b>MS0,5</b>	0,92de	2,25d	0,38f	263,4c	5,85d
<b>MS1</b>	1,09cd	2,48cd	0,51de	278,8abc	6,74abc
<b>MS5</b>	1,95a	4,50a	1,52a	268,3bc	7,33a
<b>MD0,5</b>	1,05c	2,52cd	0,43def	276,5bc	6,61bc
<b>MD1</b>	1,07cd	2,49d	0,43def	270,6bc	6,27bc
<b>MD5</b>	0,88e	2,20d	0,51def	291,6a	6,46c
<b>MSD0,5</b>	1,02cd	2,48cd	0,41ef	265,0c	6,32cd
<b>MSD1</b>	1,33b	3,06b	0,66c	272,8bc	7,18ab
<b>MSD5</b>	1,32b	3,12b	0,85b	275,0bc	7,00ab

\*Letras diferentes en la misma columna indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Como puede observarse en la Tabla 2.3, la masa con SSL al 5% (MS5) es la que arrojó mayores valores para los tres módulos de relajación. Las masas con la mezcla de ambos emulsificantes (MSD) al 1% y 5% mostraron valores de E inferiores a los de MS5, pero significativamente mayores a todas las demás muestras. Por otra parte, las masas MD5 y MS0,5 fueron las que arrojaron menores valores de  $E_1$  (Tabla 2.3).

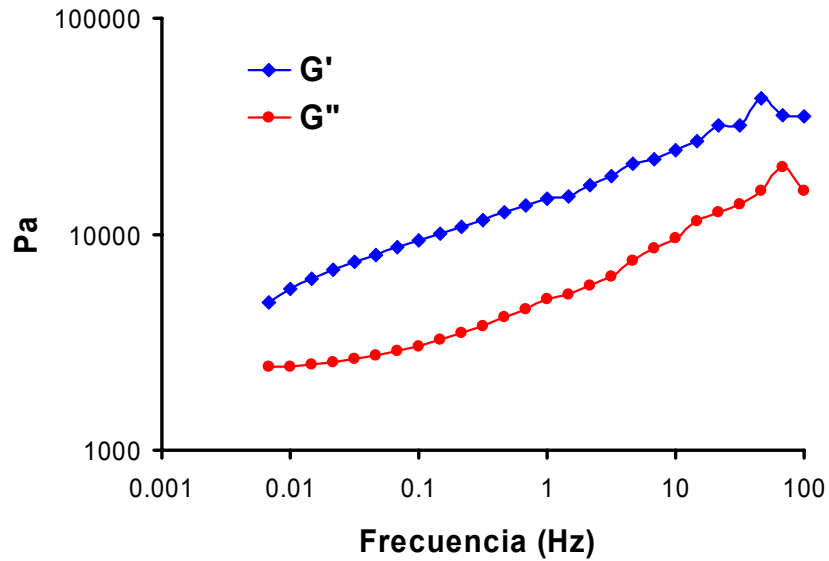
Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en los ensayos de TPA para el parámetro dureza. La masa MS5 resultó ser la de mayor dureza seguida de MSD5, siendo concordante con los valores de E hallados para los ensayos de relajación. Mientras que las muestras MS0,5 y MD5 fueron las que presentaron menor dureza y arrojaron menores valores de E.

El tiempo de relajación ( $\lambda_{rel}$ ) es el cociente entre la viscosidad ( $\eta$ ) y el módulo elástico (E); es un parámetro que da idea del grado de relajación de la muestra en las diferentes zonas de la curva de relajación. En la Tabla 2.3 se observa que, para  $\lambda_{rel1}$ , sólo las masas MS0,5 y MSD0,5 mostraron una disminución significativa con respecto al control (M) con valores de 263,4s y 265,0s, respectivamente. En el caso de  $\lambda_{rel2}$  la masa MS0,5 también mostró una disminución en este parámetro con respecto a M, observándose el mismo comportamiento que para  $\lambda_{rel1}$ . La muestra MS5 fue la única que mostró un  $\lambda_{rel2}$  mayor a M evidenciando un mayor grado de relajación en la segunda parte del ensayo.

#### **2.4.2 Viscoelasticidad de masas**

La influencia de los emulsificantes en la viscoelasticidad de las masas se estudió mediante ensayos de reometría dinámica. En la Figura 2.13 puede observarse que el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) fue mayor que el módulo de pérdida ( $G''$ ) en todo el rango de frecuencias analizado. Esta relación que se observa entre los módulos ( $G' > G''$ ) se presentó en todas las muestras ensayadas, e indica que predomina en el sistema el comportamiento elástico sobre el viscoso.

Al evaluar la viscoelasticidad de las masas se observó que a medida que incrementa la concentración de emulsificante en la formulación aumentan el módulo  $G'$  y  $G''$  (Tabla 2.4).



**Figura 2.13.** Relación entre el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) para la masa control.

Los resultados obtenidos muestran que existe una tendencia a aumentar los valores de  $G'$  y  $G''$  con el aumento de la concentración de SSL (Tabla 2.4). Esta tendencia también fue informada por Shiau (2004) para masas con harina de trigo y con el agregado de distintos emulsificantes. Los estudios de reometría de estos autores realizados en el rango de temperatura 30-50 °C en masas preparadas con SSL en niveles entre 0,5-1,5% (base harina) mostraron que a medida que aumentaba la concentración de aditivo aumentaban significativamente los valores de  $G'$  y  $G''$ .

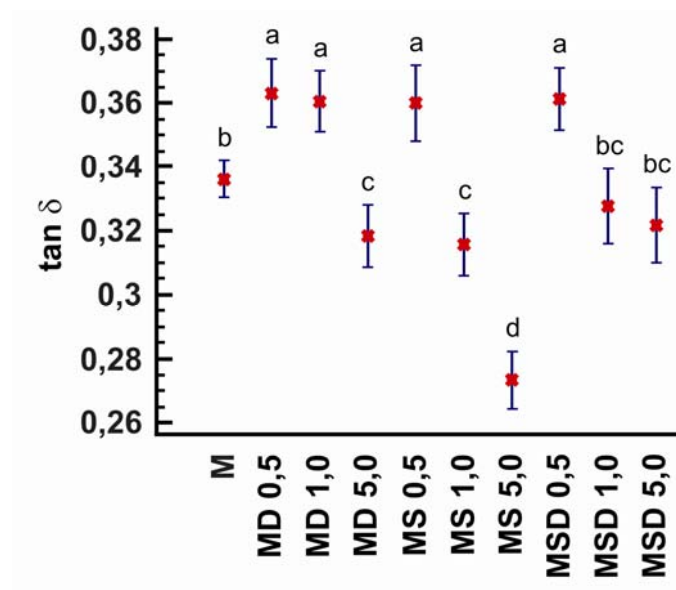
En nuestro caso, los resultados obtenidos (1 Hz) para la tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta = G''/G'$ ) mostraron que todas las masas al 0,5% y MD1 presentaron valores superiores a la masa control (M), dichos resultados demuestran que las mismas poseen un carácter más viscoso, mientras que la masa MS5 resultó la más elástica con el menor valor de  $\tan \delta$  (Figura 2.14).



**Tabla 2.4.** Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y módulo de pérdida ( $G''$ ) para masas sin aditivo (Control) y con los distintos emulsificantes. M: masa control, MS: masa + SSL, MD: masa + DATEM, MSD: masa + SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

	$G'$ (kPa)*	$G''$ (kPa)*
<b>M</b>	14,7e	4,93f
<b>MS0,5</b>	14,4e	5,13f
<b>MS1</b>	17,4d	5,47ef
<b>MS5</b>	42,5a	12,3a
<b>MD0,5</b>	14,1e	5,13f
<b>MD1</b>	19,4cd	7,00cd
<b>MD5</b>	17,3d	5,29f
<b>MSD0,5</b>	17,1d	6,20cd
<b>MSD1</b>	21,9bc	7,68b
<b>MSD5</b>	24,5b	8,06b

\*Letras diferentes en la misma columna indican que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.14.** Tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta$ ). M: masa control, MD: masa + DATEM, MS: masa + SSL, MSD: masa + SSL-DATEM. Número: % de emulsificante.

El carácter elástico medido mediante ensayos en el rango de viscoelasticidad lineal suele no ser comparable con la elasticidad medida en un ensayo de grandes deformaciones como lo es el análisis de textura ya que la forma en la que se suele medir el parámetro relacionado con la elasticidad no es equivalente. En general la elasticidad medida por TPA es inversamente proporcional a la dureza ya que a grandes deformaciones muestras más duras suelen ser menos elásticas. En cambio la elasticidad medida en condiciones de no deformación es un parámetro relacionado con la estructura intrínseca del material, observándose para muestras más estructuradas (posiblemente más duras) menores valores de  $\tan \delta$  que representan un predominio del comportamiento elástico sobre el viscoso.

El aumento en la dureza como en los parámetros  $G'$  y  $G''$  al agregar 5% de SSL puede ser atribuido al tipo de interacción entre el emulsificante y el gluten. Es posible que la cola lipofílica del SSL se una a los sitios hidrofóbicos de la proteína, permitiendo que la carga negativa del aditivo se incorpore al complejo proteína-lípido promoviendo la agregación de las proteínas y provocando un aumento en la dureza y una disminución en la elasticidad de la masa determinada a grandes deformaciones (Stauffer, 1990).

## 2.5 Conclusiones parciales

Al caracterizar la harina de trigo utilizada en este trabajo de tesis, pudo comprobarse que la misma es apta para panificación, ya que los parámetros ensayados se encuentran dentro de las normas establecidas por el CAA.

El agregado de SSL y DATEM a la masa provocó cambios en la matriz de la misma que fueron confirmados por diversos ensayos. La incorporación de altas concentraciones de emulsificantes (5% p/p) provocó cambios en la red de gluten, con la consecuente modificación en la conformación de la matriz de la masa. Estas modificaciones se vieron reflejadas en las características texturales de la misma, generándose con el agregado de 5% de SSL masas con una dureza y consistencia demasiado elevadas. Estas masas también presentaron baja absorción de agua y tiempos de desarrollo muy altos, condiciones no recomendables para la industria panadera. Por su parte las masas con DATEM al 5% p/p a pesar de presentar una dureza y consistencia aceptables fueron muy poco estables, esto sugiere que

niveles muy elevados de este aditivo no serían recomendables ya que podrían provocar el colapso de la masa durante la fermentación y/o horneado de los panes. Por lo tanto, el agregado de ambos emulsificantes en concentraciones elevadas genera una desestabilización en la masa que impediría el adecuado desarrollo de la misma.

El agregado de 1% de SSL generó una masa con estructura abierta de la cual pudieron extraerse agregados solubles de alta masa molecular. Esto sugiere que un emulsificante cargado como el SSL favorecería la disociación de agregados proteicos en la masa. Por su parte el DATEM no permitió la extracción de dichos agregados de la matriz. La ausencia de estos polipéptidos en el extracto soluble sugiere una posible participación de los mismos en la estabilización de los agregados insolubles que estabilizan la matriz del gluten.

La incorporación de 0,5% y 1% de ambos emulsificantes dio como resultado masas menos duras, consistentes y adhesivas que la masa sin aditivo, demostrando así la capacidad de estos aditivos para ablandar o hacer menos duras las masas y así mejorar sus características texturales. De esta manera, el agregado a la masa de SSL y DATEM en concentraciones inferiores a 1% conllevaría a la obtención de panes que desarrollen un mayor volumen y que presenten una miga más suave y esponjosa.

# **CAPITULO 3**

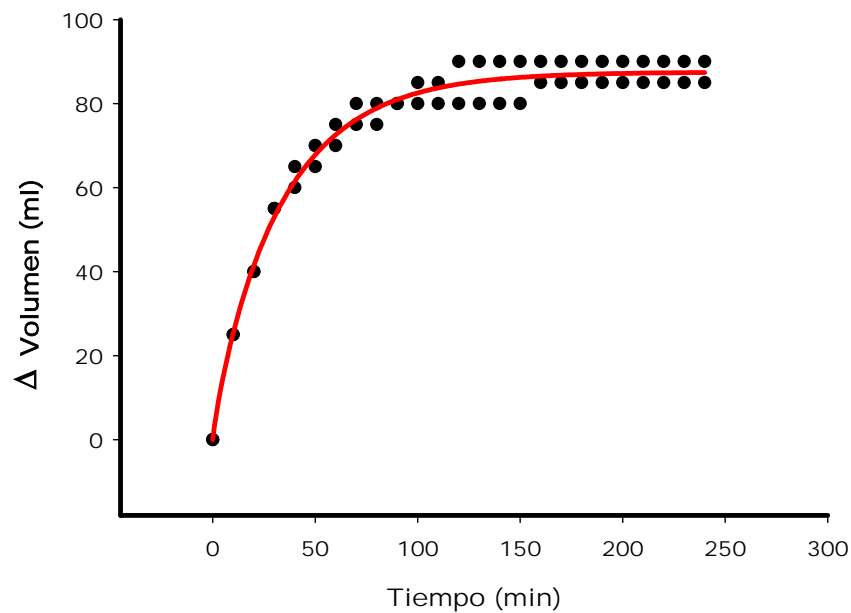
---

**Efecto de los emulsificantes en panificación**

---

### 3.1 Capacidad de expansión de la masa durante la fermentación de masa

En la Figura 3.1 se muestra una curva típica de fermentación de masa obtenida para todas las muestras ensayadas. En la misma se puede observar que, a medida que transcurre el tiempo, el volumen aumenta en forma exponencial hasta alcanzar un valor máximo. A partir de ese momento el volumen se mantiene constante.



**Figura 3.1.** Curva de fermentación para la masa control.

Los resultados obtenidos para el tiempo de fermentación de acuerdo a la ecuación de Chapman (Materiales y Métodos, Inciso 1.12.1), es decir el tiempo correspondiente a un aumento de volumen igual a 3/4 del volumen máximo ocupado por la masa, se muestran en la Tabla 3.1. Se puede observar que sólo la muestra que contenía SSL 1% (MS1) presentó un tiempo de fermentación significativamente mayor con respecto al control (M). En todos los casos el agregado de emulsificante provocó un aumento de volumen máximo de fermentación con respecto al control, siendo el SSL el que arrojó el mayor volumen.

Las curvas de fermentación dan un indicio de cómo se comportará la masa al momento de ser utilizada en la panificación, de esta manera, y basándonos en los datos obtenidos, podremos esperar que los panes elaborados con el agregado de emulsificantes presenten un volumen mayor que el control.

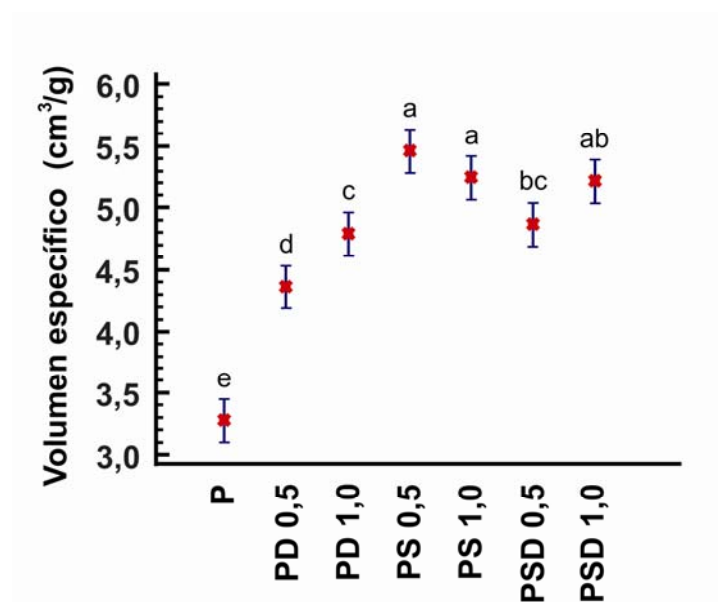
**Tabla 3.1.** Tiempo de fermentación de las muestras de masas. M: masa control, MS1: masa + SSL 1%, MD1: masa + DATEM 1%, MSD1: masa + SSL-DATEM 1%.

	M	MS1	MD1	MSD1
<b>Tiempo de fermentación* (min)</b>	44,1b	68,1a	47,4b	54,7b
<b>Volumen máximo* (mL)</b>	88,8d	136,3a	105,0c	118,8b

\* Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2 Calidad de los panes obtenidos

En la Figura 3.2 se presentan los resultados hallados para el volumen específico de los panes obtenidos. Como se puede observar, todos los panes elaborados con los distintos emulsificantes presentaron mayor volumen específico que el pan control (P). La muestra que contenía 0,5% de SSL (PS0,5) fue la que presentó mayor volumen, seguida de PS1. Los panes con DATEM (PD0,5 y PD1) fueron los que menor diferencia de volumen arrojaron con respecto P. Por último la mezcla de ambos emulsificantes (PSD) mostró un comportamiento intermedio entre los dos aditivos puros.



**Figura 3.2.** Efecto de los emulsificantes sobre el volumen específico del pan. P: pan control, PD: pan + DATEM, PS: pan + SSL, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Coincidentemente con resultados obtenidos por otros autores (Campbell y col., 2001), el agregado de emulsificantes provocó un aumento de volumen en los panes con respecto al pan control, especialmente para el caso del SSL. Aamodt y col. (2005a y b) observaron que al agregar 0,45% de DATEM a la masa se obtenían panes con mayor volumen, mayor altura y mayor peso. Por su parte El-Hady y col. (1999) estudiaron el efecto del agregado de ácido ascórbico, bromato de potasio, SSL y la combinación de estos tres aditivos en panes elaborados a partir de masas congeladas. Los resultados obtenidos por estos autores muestran que el volumen de pan obtenido con 0,5% p/p (base harina) de SSL fue mayor al alcanzado con el control, con valores de 5,07 y 4,93 mL/g de harina, respectivamente.

Xu y col. (1992) estudiaron el efecto de ciertos aditivos en distintas formulaciones de masas y elaboraron panes a los que les determinaron el volumen, la humedad de la miga durante el almacenamiento, y la relación entre las características amilográficas y la dureza de la miga durante dicho proceso. El volumen de pan preparado con 0,5% de SSL o DATEM también resultó mayor al obtenido sin emulsificante. A su vez, dicho volumen fue mayor en la muestra que contenía SSL que en la de DATEM. Resultados similares han sido informados por Azizi y Rao (2004) en cuyos estudios se evaluó el efecto de diversos emulsificantes sobre el almacenamiento de panes elaborados con harina de trigo. Los emulsificantes utilizados fueron SSL, DATEM, GMS (monoestearato de glicerol) y DGMS (monoestearato de glicerol destilado) en un nivel de 0,5%. Los resultados mostraron que el volumen de pan obtenido para las muestras que contenían SSL y DATEM fue superior al del control y, de manera similar a lo observado por Xu y col. (1992), el SSL fue el que provocó el mayor aumento.

Por su parte, Gómez y col. (2004) estudiaron la funcionalidad de diversos emulsificantes (SSL, DATEM, MG, Polisorbato, entre otros) sobre la calidad de panes elaborados con harina de trigo. Evaluaron el aumento de volumen a distintos tiempos de fermentación y encontraron que para tiempos de fermentación de 120 min, tanto el SSL como el DATEM al 0,3% mostraron un mayor volumen de pan que la muestra control. Siendo nuevamente el SSL el emulsificante que mayor volumen de pan desarrolló.

El aumento de volumen de pan con el agregado de estos emulsificantes podría ser atribuido a que dichos aditivos al ser agregados en bajas concentraciones

formarían, como discutimos anteriormente (Capítulos 1 y 2), una red de gluten adecuada que se estabilizaría durante el proceso de panificación.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de color de la corteza de los panes. El valor  $L^*$  es una medida de la luminosidad de las muestras analizadas, este parámetro puede alcanzar valores máximos de 100 (color blanco) y mínimos de 0 (color negro). Los panes que contenían SSL en su formulación (PS) presentaron valores de  $L^*$  similares al del pan control (P), mientras que los panes con DATEM (PD) mostraron una luminosidad mayor a la observada en P (Tabla 3.2). Las muestras con la mezcla SSL-DATEM (PSD) mostraron valores de  $L^*$  intermedios.

**Tabla 3.2.** Valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de color de la corteza de los panes. P: control, PS: pan con agregado de SSL, PD: pan con agregado de DATEM, PSD: pan con agregado de SSL-DATEM. Números: % p/p de emulsificante.

	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<b>P</b>	70,3f	5,10a	34,0ab
<b>PS0,5</b>	71,2def	4,06c	34,1ab
<b>PS1</b>	70,7ef	4,75ab	33,9b
<b>PD0,5</b>	72,1b	4,55bc	33,9b
<b>PD1</b>	73,9a	3,51d	32,8c
<b>PSD0,5</b>	71,3bcd	4,63ab	34,8a
<b>PSD1</b>	71,7bc	4,81ab	34,4ab

Letras distintas en la misma columna indican que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Resultados similares fueron obtenidos por Xiujin y col. (2007) para muestras de pan francés y de panes chinos preparados al vapor (CSB). En ambos casos comprobaron que con el agregado de DATEM en distintas concentraciones (0,03-0,1%; b.h.) se obtenían panes más blancos comparados con el control. Esto podría atribuirse a que el DATEM estaría interfiriendo en la reacción de Maillard, mediante la interacción emulsificante-proteína, la cual estaría dificultando la unión proteína-



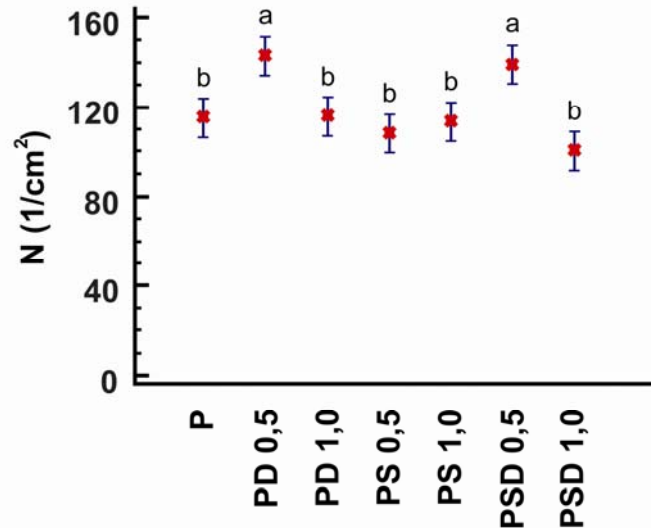
azúcar necesaria para la formación del primer intermediario, la base de Shift (Whistler y Daniel, 1993).

El parámetro de color  $a^*$  varía entre valores negativos correspondientes al color verde y valores positivos correspondientes al color rojo. En la Tabla 3.2 puede observarse que todos los valores de  $a^*$  obtenidos fueron positivos, lo que indica que la coloración de la corteza de los panes fue principalmente amarillo-rojiza. En las muestras PS0,5, PD0,5 y PD1 dicho parámetro disminuyó significativamente con respecto al control (P), siendo el pan PD1 el que menor valor mostró. Los resultados sugieren que estos panes mostraron una coloración de corteza menos rojiza que la del pan sin aditivo.

El parámetro  $b^*$  varía entre valores negativos correspondientes al color azul y positivos correspondientes al amarillo. Como puede apreciarse en la Tabla 3.2, al igual que para el parámetro  $a^*$ , todos los valores de  $b^*$  obtenidos fueron positivos, por lo tanto, la coloración de la corteza fue predominantemente amarilla. Sólo la muestra PD1 presentó un valor de  $b^*$  significativamente menor que el control (P), por lo que el pan elaborado con DATEM al 1% presentó una corteza con coloración menos intensa que el pan control (P), coincidente con el menor valor de  $a^*$  (Tabla 3.2). La combinación de los valores  $a^*$  y  $b^*$  es lo que le confiere el color anaranjado-amarillento característico a los panes.

Muchos de los atributos de la calidad del pan pueden predecirse a partir del conocimiento de ciertas características de la estructura que define la apariencia de la miga. A nivel microscópico pueden distinguirse dos fases en la miga de pan: una sólida (paredes de las celdas de aire) y una gaseosa (celdas de aire o alvéolos), de las cuales la primera se encuentra totalmente conectada (Torquato, 2000), mientras que la segunda fase sólo está conectada en forma parcial. La estructura y, por consiguiente, las propiedades mecánicas del pan están determinadas por la fracción del volumen de ambas fases (Mackenzie, 1950; Ahmed y Jones, 1990) así como por la naturaleza de su conectividad (Warren y Kraynik, 1997; Torquato, 1998). En este sentido, el desarrollo del gluten a través del proceso de mezclado es fundamental para la conformación de la estructura de la miga, cuya densidad está notablemente afectada por la agregación de los polímeros de gluten (Zghal y col., 1999). Así, la adición de emulsificantes sobre la estructura de la masa tendría influencia directa sobre la estructura de la miga del pan resultante.

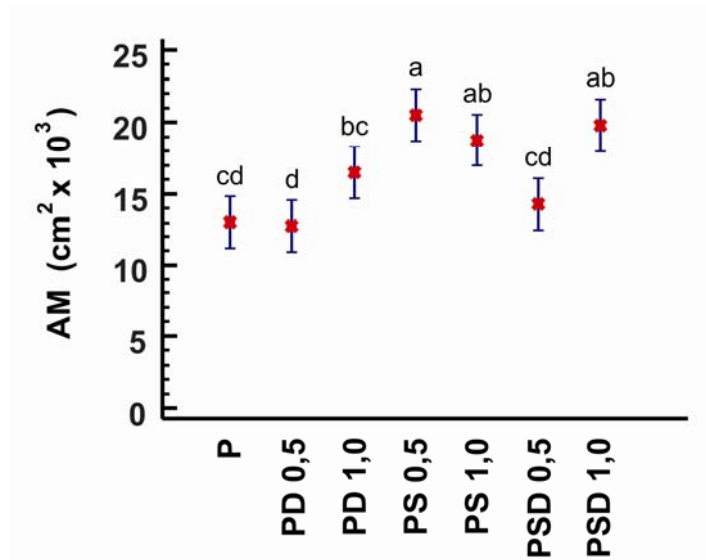
Al comparar las estructuras de las migas pudo observarse que los panes elaborados con DATEM y SSL-DATEM al 0,5% (PD0,5 y PSD0,5) fueron los únicos que presentaron un valor de cantidad de alvéolos por unidad de área (N) significativamente mayor con respecto al pan control (P) (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Efecto de los emulsificantes en el número de alvéolos por unidad de área (N). P: pan control, PD: pan + DATEM, PS: pan + SSL, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

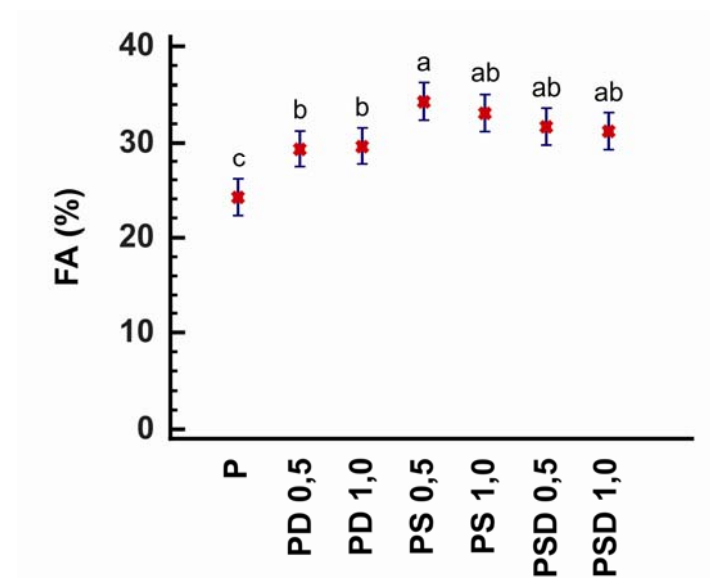
La Figura 3.4 muestra el área media (AM) de los alvéolos de la miga de pan. Las muestras PS0,5; PS1 y PSD1 mostraron un tamaño medio de alvéolo significativamente superior al de la muestra control (P), siendo PS0,5 la que mayor valor arrojó ( $0,021 \text{ cm}^2$ ) (Figura 3.4). El alto valor observado para PSD1 podría ser atribuido a la presencia del 0,5% de SSL en la mezcla.

Comparando los resultados mostrados en las Figuras 3.3 y 3.4 se observó que las muestras PD0,5 y PSD0,5 fueron las que mostraron mayor cantidad de alvéolos, pero estos fueron de menor tamaño, en comparación con las migas obtenidas con 1% de emulsificante (PD1 y PSD1). Por lo que la miga resultante de los panes con 0,5% de DATEM y SSL-DATEM fue más uniforme con alvéolos más pequeños.



**Figura 3.4.** Efecto de los emulsificantes en el área media de los alvéolos (AM) de la miga de pan. P: pan control, PD: pan + DATEM, PS: pan + SSL, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

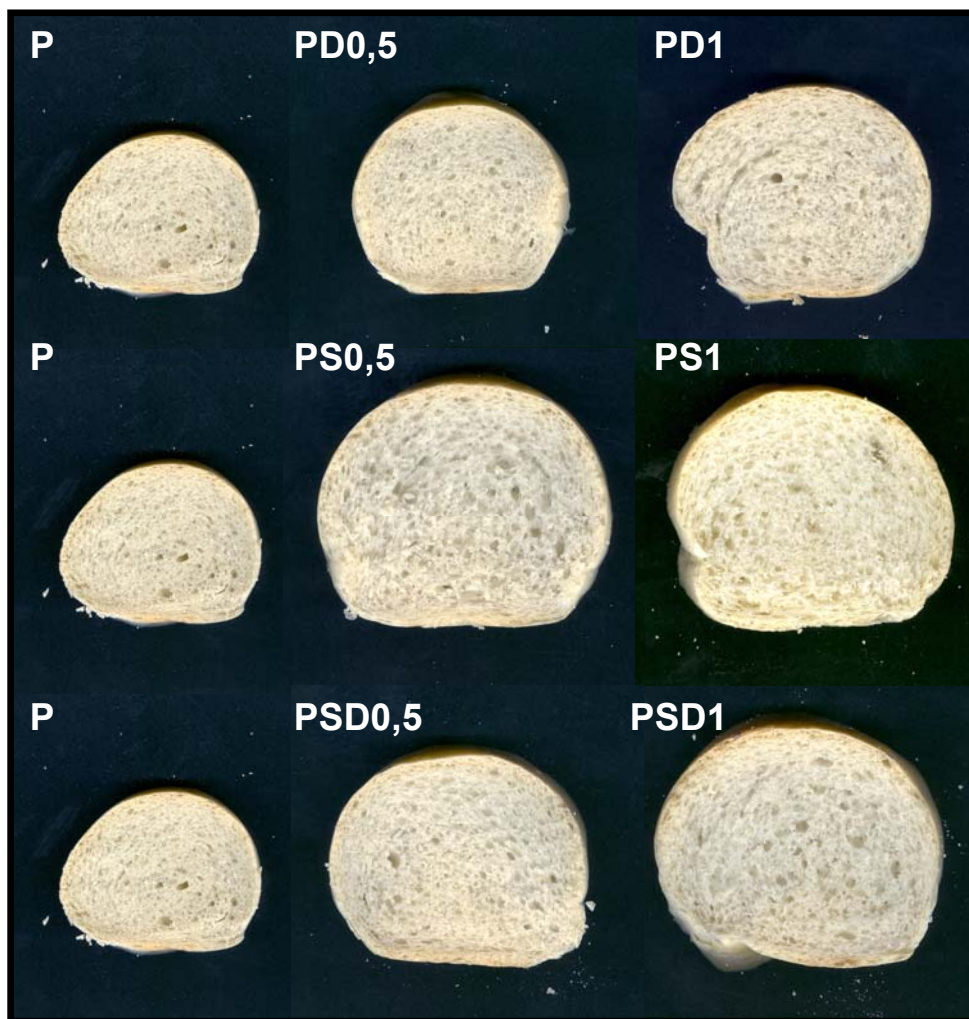
La fracción de área total (FA) ocupada por los alvéolos de la miga de pan para todos los panes con emulsificantes fue superior al valor de la miga control (P), siendo la muestra PS0,5 la que mayor valor presentó (34,3%) (Figura 3.5). Los resultados mostraron que el SSL a nivel de 0,5% dio panes con menor N y mayor AM y FA, parámetros deseables en una miga abierta y esponjosa.



**Figura 3.5.** Efecto de los emulsificantes en la fracción de área total (FA) ocupada por los alvéolos de la miga de pan. P: pan control, PD: pan + DATEM, PS: pan + SSL, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Estos resultados se correlacionan con el mayor volumen específico de pan obtenido para todas las muestras con emulsificantes (Figura 3.2), especialmente para la muestra PS0,5, la cual mostró la mayor FA y el mayor volumen específico de todos los panes evaluados.

En la Figura 3.6 se muestran las fotos de las rodajas de los panes obtenidos. En dichas fotografías se observa claramente como el agregado de emulsificantes a la formulación aumentó el volumen de los panes. También puede apreciarse que el agregado de SSL (PS) provocó un mayor aumento de volumen de las piezas que la incorporación de DATEM (PD). La mezcla de ambos aditivos (PSD) mostró un volumen intermedio. Por otra parte, también se observa que las muestras PD0,5 y PSD0,5 son las que presentaron una miga más cerrada con alvéolos más pequeños y uniformes, mientras que las migas de los panes PS0,5, PS1 y PSD1 mostraron un tamaño de alvéolos mayor.

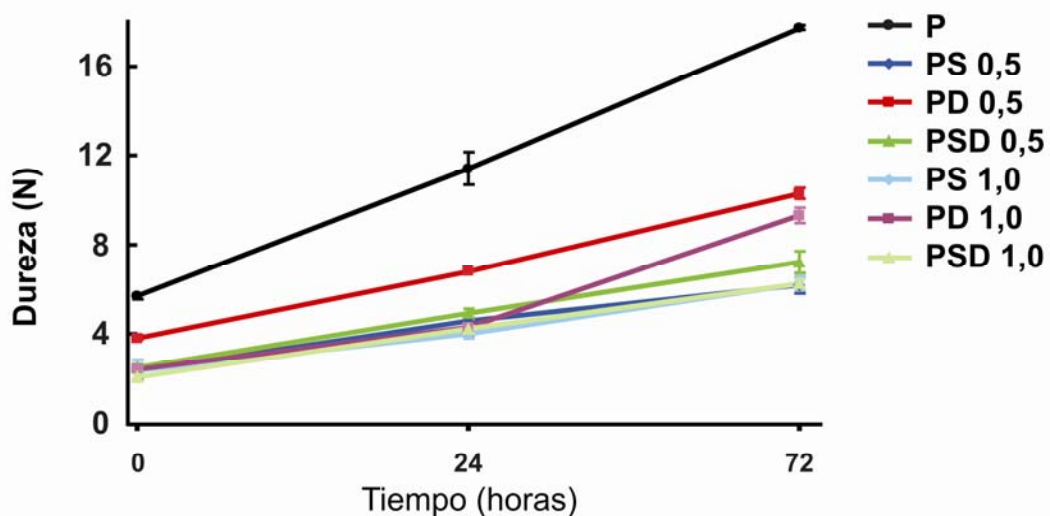


**Figura 3.6.** Fotos de rodajas de panes obtenidos a partir de masas con el agregado de emulsificantes. P: pan control. PD: pan + DATEM. PS: pan + SSL. PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

### 3.3 Estabilidad de los panes frente al almacenamiento

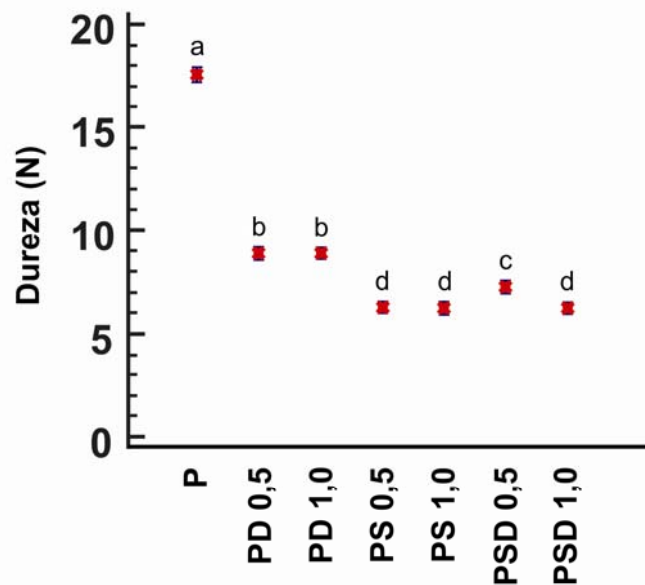
Existen parámetros de calidad importantes a tener en cuenta a la hora de analizar el efecto de los aditivos en el pan. Algunos de los más utilizados son los obtenidos a partir del análisis de perfil de textura (TPA) de la miga, ya que se relacionan frecuentemente con la percepción del consumidor. Por lo general los consumidores prefieren panes con una corteza crujiente y con una miga tierna y aireada. La pérdida de frescura del pan durante el almacenamiento disminuye la aceptabilidad de los consumidores. Este fenómeno se conoce como envejecimiento del pan e incluye los siguientes procesos: endurecimiento de la miga, pérdida de crujibilidad de la corteza y deterioro de las propiedades organolépticas (Cauvain, 1998).

En la Figura 3.7 se muestran los resultados obtenidos para la dureza de la miga durante el período de almacenamiento. Como se puede observar, a tiempo 0 (pan fresco), el agregado de emulsificantes disminuyó significativamente la dureza de la miga, siendo el pan con DATEM al 0,5% (PD0,5) la muestra que menor diferencia presentó con respecto al pan control (P). Esta tendencia se observó durante todo el período de almacenamiento, a pesar de que el almacenamiento (24 y 72 h) provocó un aumento de la dureza de la miga, en forma más pronunciada, en ausencia de emulsificantes. Estos resultados sugieren que dichos aditivos mitigaron el aumento de dureza del pan durante el almacenamiento.



**Figura 3.7.** Efecto de los emulsificantes sobre la Dureza de la miga de pan durante 72 h de almacenamiento ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $H_{rel} = 74\text{ }\%$ ) P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

Al evaluar las muestras a las 72 h de almacenamiento, si bien todas las migas fueron más blandas que la miga control (Figura 3.7), los emulsificantes mostraron diferencias entre sí (Figura 3.8). Las migas que contenían DATEM (PD0,5 y PD1) mostraron una dureza superior a las migas con SSL (PS) y SSL-DATEM (PSD). También se observó que las migas que contenían SSL (PS0,5 y PS1) y SSL-DATEM al 1% (PSD1) fueron las que menor valor de dureza mostraron. De esta manera el SSL sería un emulsificante más efectivo que el DATEM a la hora de minimizar el aumento de la dureza de la miga durante el almacenamiento del pan.



**Figura 3.8.** Efecto de los emulsificantes sobre la Dureza de la miga de pan a las 72 h de almacenamiento ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $H_{\text{rel}} = 74\%$ ). P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

En la Tabla 3.3 se muestran las ecuaciones de cada una de las rectas mostradas en la Figura 3.7, las cuales representan la dureza de la miga durante el almacenamiento. La pendiente de cada recta nos proporciona una idea de la velocidad de endurecimiento de la miga de pan. Como puede observarse en la Tabla 3.3, para todos los niveles de emulsificantes se obtuvieron valores de pendientes inferiores a la muestra control (P), esto significa que ambos emulsificantes son capaces de retardar el envejecimiento del pan. Las muestras que contenían SSL (PS) fueron las que presentaron el mínimo valor de pendiente, por lo tanto la velocidad de endurecimiento lograda con este aditivo fue menor que para PD, PSD y P. Las muestras PD fueron las que menos diferencia presentaron con respecto al

control, mientras que la mezcla de ambos aditivos (PSD) mostró un comportamiento intermedio.

Resultados similares fueron encontrados por Pisesookbunternng y D'Appolonia (1983); en sus estudios comprobaron que el agregado de SSL al 0,5% disminuía la dureza de la miga de pan fresco, como así también del pan almacenado durante 24 y 96 h. Xu y col. (1992) observaron que el agregado de 0,5% de DATEM y SSL a los panes provocó una disminución en la dureza de la miga con respecto al control a las 24, 48 y 120 h. de almacenamiento. En sus ensayos también mostraron que el SSL fue el aditivo que menor dureza presentó con respecto al control. Resultados análogos fueron hallados por Azizi y Rao (2004) en panes frescos (sin almacenar), quienes observaron que tanto el SSL como el DATEM al 0,5% dieron migas más blandas que la obtenida en el pan sin el agregado de emulsificantes. Al igual que lo observado por Xu y col. (1992), el SSL fue el aditivo que mostró la miga mas blanda.

**Tabla 3.3.** Ecuaciones de las rectas mostradas en la Figura 3.7. P: pan control, PS: pan con agregado de SSL, PD: pan con agregado de DATEM, PSD: pan con agregado de SSL-DATEM. Y= Dureza (N), x = tiempo (horas). Números: % p/p de emulsificante.

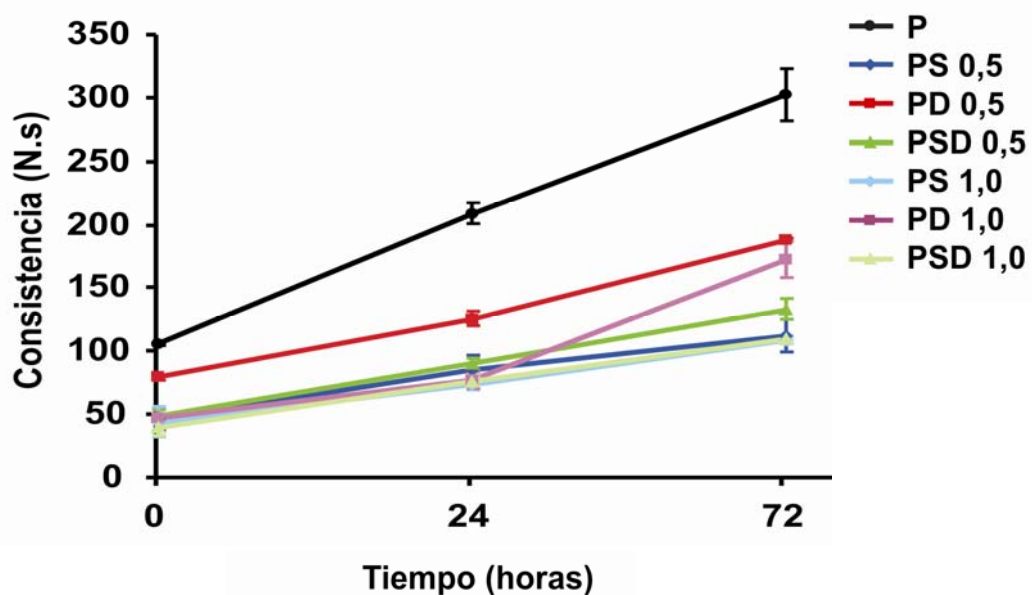
	Ecuación de la recta
<b>P</b>	$Y = 0,1621x + 6,4157$
<b>PS0,5</b>	$Y = 0,0498x + 2,7800$
<b>PS1</b>	$Y = 0,0533x + 2,5143$
<b>PD0,5</b>	$Y = 0,0872x + 4,2086$
<b>PD1</b>	$Y = 0,0968x + 2,2429$
<b>PSD0,5</b>	$Y = 0,0633x + 2,8543$
<b>PSD1</b>	$Y = 0,0561x + 2,3814$

Por su parte, Koocheki y col. (2007) estudiaron el efecto del agregado de DATEM en concentraciones de 0,25; 0,5; 0,75 y 1% y comprobaron que para todas ellas el DATEM disminuía la firmeza de la miga del pan luego de una hora de cocido y durante su almacenamiento (24, 48 y 72 h).

La disminución de la dureza por parte de los emulsificantes estaría asociada al fenómeno de gelatinización de almidón. Durante este proceso la mayoría de los

gránulos de almidón absorbe agua y cambian su estado semi-cristalino a un estado amorfo. Este cambio facilita la movilidad molecular en las regiones amorfas, permitiendo el hinchamiento de los gránulos, los cuales se expanden al mismo tiempo que los polímeros se hidratan. En esta transición parte de las moléculas de amilosa se escapan del gránulo (Hug-Iten y col., 1999; Gray y Bemiller, 2003). Durante la cocción, los emulsificantes interactúan con las moléculas de almidón disminuyendo la hinchazón de los gránulos. Este fenómeno se daría al interactuar la cola hidrofóbica del emulsificante con la hélice de la molécula de amilosa, formando el complejo amilosa-emulsificante (Ponte y col., 1973; Ribotta y col., 2004) y la cabeza hidrofílica (especialmente en el caso del SSL, HLB=21) con la amilopectina mediante uniones puente hidrógeno. Debido a que los gránulos de almidón se hinchan menos, la solubilización de las moléculas de almidón será menor, con lo que habrá menor interacción entre el almidón y las proteínas del gluten, y por lo tanto, la dureza de la miga disminuirá (Martin y col., 1991; Hug-Iten y col., 2001; Gray y Bemiller, 2003).

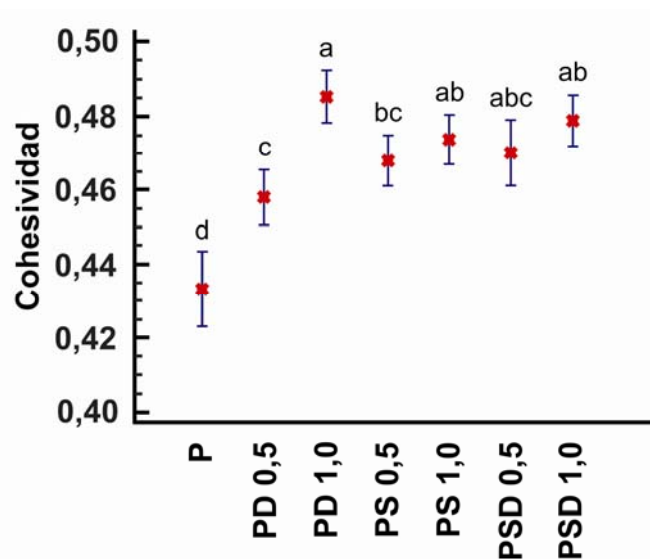
La consistencia de las migas (Figura 3.9) mostró la misma tendencia que la observada para la dureza (Figura 3.7). La miga del pan control (P) fue la que mayor consistencia mostró a lo largo de todo el período de almacenamiento, seguida de la muestra que contenía 0,5% de DATEM (PD0,5).



**Figura 3.9.** Efecto de los emulsificantes sobre la Consistencia de la miga de pan durante 72 h de almacenamiento ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $H_{\text{rel}} = 74\text{ }%$ ). P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.



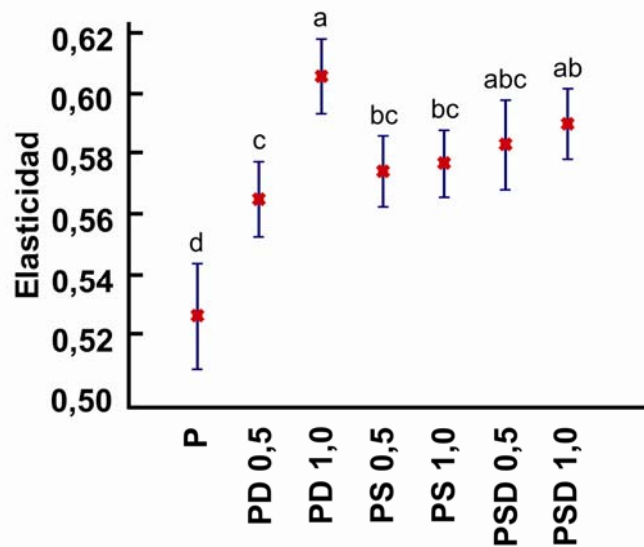
La cohesividad es una propiedad relacionada con la integridad del sistema, es decir con la fuerza de las uniones internas del material. En el caso de la miga de pan, una baja cohesividad se puede evidenciar en la muestra como una estructura que se desgrana fácilmente. Con el aumento del tiempo de almacenamiento todas las muestras mostraron una disminución progresiva en su cohesividad. A tiempo cero no se encontraron diferencias significativas de las muestras que contenían emulsificantes con respecto a la miga control (P), presentando la miga sin emulsificante un valor de cohesividad de 0,532. Al cabo de 24 h de almacenamiento todas las migas con emulsificantes mostraron mayor cohesividad que P, siendo la muestra con 1% de DATEM (PD1) la más cohesiva (Figura 3.10). Por lo tanto, según lo mencionado anteriormente la muestra P se desgranaría más fácilmente que las muestras con 0,5% y 1% de emulsificante y más aún que la muestra PD1. A las 72 h de almacenamiento sólo la muestra PSD1 presentó una cohesividad significativamente mayor a la de la miga control (P, 0,357) con un valor de 0,382.



**Figura 3.10.** Efecto de los emulsificantes sobre la Cohesividad de la miga de pan a las 24 h de almacenamiento ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $H_{\text{rel}} = 74\%$ ). P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante. Letras distintas indican que existen diferencias significativas

Otro parámetro importante a evaluar es la elasticidad. Es deseable que la miga tenga cierto grado de elasticidad, aunque no muy elevado para evitar que resulte muy gomosa. Al igual que lo observado para la cohesividad, a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento todas las muestras mostraron una disminución

progresiva en su elasticidad. Sólo las muestras que contenían SSL (PS0,5 y PS1) a tiempo cero mostraron una elasticidad inferior a la de la miga control (P), siendo la muestra PS1 la que menor valor presentó (0,688). A las 24 horas de almacenamiento todas las migas presentaron una elasticidad superior a la de P (Figura 3.11). La muestra que contenía DATEM al 1% (PD1) fue la que mayor valor arrojó (0,605). A las 72 horas de almacenamiento sólo la muestra PSD1 mostró una elasticidad significativamente mayor a la de la miga control (P, 0,402), con un valor de 0,442.



**Figura 3.11.** Efecto de los emulsificantes sobre la Elasticidad de la miga de pan a las 24 h de almacenamiento ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $H_{\text{rel}} = 74\%$ ). P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

En la Tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos para la humedad de la miga durante el almacenamiento. En el caso del pan fresco, sólo los panes que contenían DATEM en su formulación (PD) mostraron una humedad significativamente menor que el pan control (P). Los resultados sugieren que el SSL sería el emulsificante más eficiente en la retención de agua en la miga de pan fresco, fenómeno atribuible al tipo de interacción entre el SSL y las proteínas y/o almidón, y especialmente al tipo de interacción establecida con el agua.

Todas las muestras mostraron con el aumento del tiempo de almacenamiento una disminución en la humedad de la miga. Este fenómeno se debe a que a medida que el pan comienza a enfriarse luego de ser horneado se genera un gradiente de

humedad en la hogaza (Piazza y Masi, 1995). Las diferencias de presión de vapor que se generan entre la corteza y las regiones internas de la pieza de pan dan como resultado una migración de agua de la miga hacia la corteza. Durante el almacenamiento el gluten incrementa su dureza debido a la transferencia de agua desde el gluten hacia el almidón o hacia la corteza del pan (Pisesookbunternrg y D'Appolonia, 1983; Baik y Chinachoti, 2000). A medida que transcurre el tiempo este fenómeno continúa y el contenido de humedad en el centro de la pieza de pan disminuye, mientras que en las regiones externas aumenta (Baik y Chinachoti, 2000; Gray y Bemiller, 2003). A las 24 h todos los panes, excepto aquel que contenía 1% de SSL (PS1) mostraron una humedad inferior a la de P, siendo PS0,5 y PSD0,5 las que menores valores presentaron. A las 72 h de almacenamiento pudo observarse que, al igual que a las 24 h, todas las muestras mostraron una humedad inferior a la de la muestra control. Las migas que contenían 1% de emulsificante (PS1, PD1 y PSD1) fueron las que menor diferencia mostraron con respecto a P, mientras que las migas con 0,5% de aditivo (PS0,5, PD0,5 y PSD0,5) presentaron una diferencia mayor de humedad con respecto a la miga control (P) (Tabla 3.4). Los emulsificantes resultaron poco efectivos en la retención de agua de la miga durante el envejecimiento del pan.

**Tabla 3.4.** Porcentaje de humedad de las migas de pan durante el periodo de almacenamiento (0, 24 y 72 h) ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $H_{\text{rel}} = 74\text{ }%$ ). P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

	0 horas*	24 horas*	72 horas*
<b>P</b>	42,3a	40,4a	37,6a
<b>PS0,5</b>	41,7ab	35,6c	28,1e
<b>PS1</b>	42,3a	38,0ab	33,9b
<b>PD0,5</b>	40,8c	36,4bc	30,2cd
<b>PD1</b>	41,2bc	36,9bc	33,6b
<b>PSD0,5</b>	41,5abc	35,4c	29,1de
<b>PSD1</b>	41,5abc	37,3bc	31,8bc

\* Letras distintas en la misma columna indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Resultados similares fueron encontrados por Xu y col. (1992). Estos autores estudiaron el efecto del agregado de 0,5% de SSL y DATEM (entre otros aditivos) sobre la firmeza de la miga, la pérdida de humedad y las características amilográficas durante el almacenamiento (1, 2 y 5 días) de panes elaborados con harina de trigo. Sus resultados mostraron que los emulsificantes incrementaron la pérdida de humedad de la miga con respecto al pan sin aditivo a lo largo del período de almacenamiento.

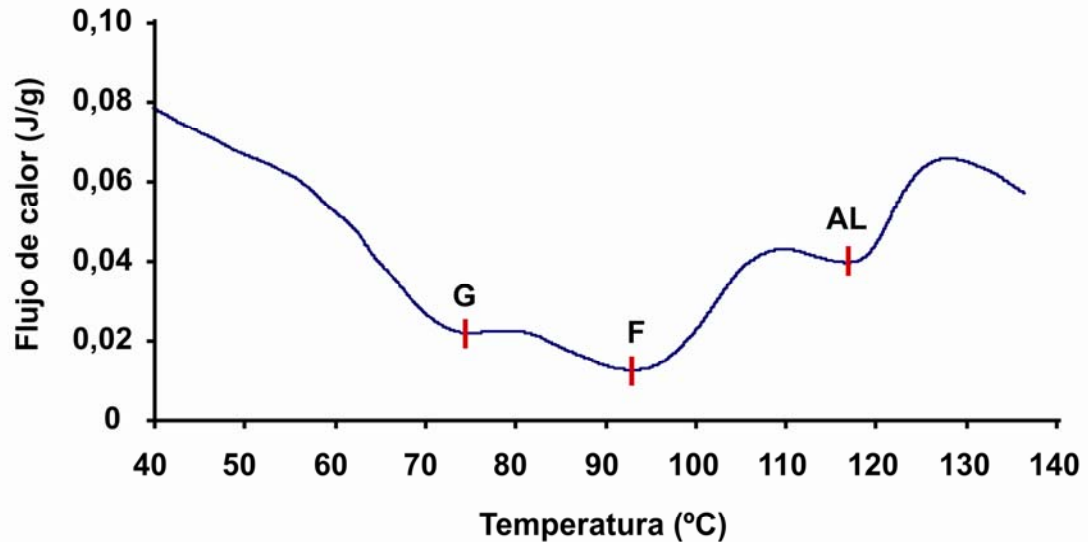
Estos resultados sugieren que el agregado de SSL y DATEM disminuye la humedad de la miga a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento. Esto podría atribuirse a que dichos emulsificantes al adsorberse en la superficie de los gránulos de almidón dificultarían que dichos gránulos absorban el agua liberada por el gluten durante el almacenamiento, permitiendo de esta manera que la misma quede libre y migre desde la miga hacia la corteza (Pisesookbunternng y D'Appolonia, 1983; Xu y col., 1992).

### **3.4 Comportamiento térmico de las masas durante la cocción y almacenamiento.**

Los cambios de estructura y conformación de los polímeros de la harina durante el calentamiento de la masa de pan que influyen en la funcionalidad de las proteínas y el almidón, se pueden determinar por el estudio de las propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Con esta técnica se puede simular el proceso de horneado del pan, ya que en ella se realiza un barrido de temperatura en el cual la masa se va cociendo dentro de la cápsula de aluminio (Arntfield y col., 1990).

En la Figura 3.12 se muestra un termograma típico obtenido para las muestras en el que se observan tres endotermas. El proceso de gelatinización presentó dos picos endotérmicos, comportamiento que se observa cuando la muestra a evaluar tiene una cantidad de agua restringida, en dicho caso el pico de gelatinización del almidón se desdobra en dos. El primer pico (G) está asociado con la gelatinización propiamente dicha del almidón, mientras que el segundo (F) corresponde a la energía requerida para fundir las estructuras cristalinas más estables (Biliaderis,

1983; León y col., 1997; Ribotta y col., 2004). También puede observarse un tercer pico endotérmico que corresponde a la disociación del complejo amilosa-lípido (AL) (Jovanovich y col., 1992; Jovanovich y Añón, 1999).



**Figura 3.12.** Termograma obtenido mediante DSC para la gelatinización de la masa control (sin aditivo). Endotermas: G, gelatinización del almidón. F, fusión de los cristales más estables. AL, disociación complejo amilosa-lípido.

La temperatura de gelatinización de la masa fresca fue 71 °C para el pico G y 91 °C para el F. Los emulsificantes aumentaron levemente la temperatura de gelatinización, que en promedio fue de alrededor de 74 °C y 94 °C para G y F, respectivamente (Stauffer, 1991; Whitehurst, 2004). La retrogradación del almidón durante el almacenamiento a 20 °C, ya al primer día, provocó una disminución de la temperatura de gelatinización de aproximadamente 20 °C ( $\cong$  55 °C) sin grandes modificaciones en F (89-92 °C). Los valores de temperatura (G y F) obtenidos para retrogradación en la masa control no fueron modificados por los emulsificantes. El efecto de los emulsificantes se vio reflejado en cambios en los valores de las entalpías de gelatinización y retrogradación.

En la Tabla 3.5 se muestran los valores de entalpía obtenidos en los ensayos de gelatinización y retrogradación de almidón. Como puede observarse para el proceso de gelatinización, todos los emulsificantes provocaron una disminución de la entalpía, siendo la muestra PS0,5 la que menor valor presentó (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Entalpías de gelatinización y retrogradación para las distintas muestras. P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

	$\Delta H$ (J/g masa seca)*			
	Gelatinización	1 día	3 días	7 días
<b>P</b>	5,09a	1,64a	4,56a	5,55a
<b>PS0,5</b>	3,35c	0,21e	0,99e	2,42d
<b>PS1</b>	3,85bc	0,02f	1,20e	4,41b
<b>PD0,5</b>	4,32b	1,04b	2,09c	4,33b
<b>PD1</b>	4,09b	0,86c	1,64d	3,61c
<b>PSD0,5</b>	4,18b	0,49d	2,68b	4,42b
<b>PSD1</b>	3,98bc	0,27e	0,24f	2,35d

\* Letras distintas en la misma columna indican que existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Como se hizo mención anteriormente la reducción en la entalpía de gelatinización con el agregado de emulsificantes a la masa estaría mediada por dos hechos. Por un lado la cola hidrofóbica del emulsificante se uniría a la hélice de amilosa formando el complejo amilosa-emulsificante. Por otro lado la cabeza hidrofílica del aditivo (principalmente del SSL) se uniría a la amilopectina mediante enlaces puente hidrógeno. De esta manera la absorción de agua por parte de los gránulos de almidón disminuiría, con una consecuente disminución de la gelatinización de los mismos. Por lo tanto habría menos almidón gelatinizado que sea capaz de retrogradar durante el almacenamiento, ya que al interaccionar el emulsificante con la amilosa y la amilopectina, habrá menos cantidad disponible de estos polímeros gelatinizados para el proceso de retrogradación.

Durante las primeras horas de almacenamiento la amilopectina no retrograda, o lo hace muy lentamente, por lo que la muestra es prácticamente amorfa en su totalidad. Es por ello que las entalpías de retrogradación a las 24 h de almacenamiento presentaron valores bajos, cercanos a cero (Tabla 3.5). Al aumentar este período la amilopectina recristaliza y al calentar la muestra nuevamente vuelve a presentar una endoterma (Sandoval y col., 2005). Al evaluar la retrogradación del almidón durante el período de almacenamiento, pudo observarse que todos los emulsificantes inhibieron en gran medida este proceso, como puede

deducirse de los valores muy bajos de entalpía de retrogradación, en comparación con la muestra control (P) (Tabla 3.5). A las 24 h de almacenamiento las muestras que contenían SSL (PS0,5 y PS1) fueron las que menor grado de retrogradación presentaron, seguidas de las muestras PSD y por último las PD. A este tiempo de almacenamiento el SSL sería el principal responsable de la disminución de la retrogradación en las muestras que contienen la mezcla de ambos aditivos (PSD). A los 3 días de almacenamiento la muestra PSD1 arrojó el menor valor de retrogradación seguida de las muestras PS. Al comparar las muestras PS con las PD se observó nuevamente que el SSL provocó un menor grado de retrogradación en el pan que el DATEM a ambas concentraciones (0,5% y 1% p/p).

Por último a los 7 días de almacenamiento la retrogradación se inhibió más en las muestras que contienen SSL en nivel de 0,5% (PS0,5 y PSD1) (Tabla 3.5), sugiriendo que el SSL gobernaría el comportamiento de la masa PSD1 (SSL 0,5% + DATEM 0,5%).

Diversos estudios han demostrado que los surfactantes son agentes que retardan el envejecimiento del pan (Eliasson, 1983; Rogers y Hosenev, 1983; Russel, 1983; Batres y White, 1986; Evans, 1986; Rao y col, 1992; Lundqvist y col, 2002 a y b). Eliasson y Ljunger (1988) estudiaron el efecto del agregado de emulsificantes sobre la retrogradación de almidones de maíz a las 24 h y a los 7 días de almacenamiento a 20 °C. Encontraron que el agregado de 1,4% p/p (base almidón) de monoglicéridos insaturados reducía la retrogradación a ambos períodos evaluados. Por otra parte, Rao y col. (1992) estudiaron el efecto de diferentes emulsificantes sobre la recristalización de la amilopectina en panes de harina de trigo. En sus ensayos encontraron que para panes almacenados durante 7 días a 22 °C, el agregado de 0,5% p/p (base harina) de SSL a la formulación disminuía la entalpía de retrogradación.

De acuerdo a lo expuesto hasta el momento, los emulsificantes reducen la retrogradación de la amilopectina mediante la formación de complejos. Como se mencionó anteriormente, por un lado su cola hidrofóbica se une a la hélice de amilosa y por otro su cabeza hidrofílica se une a la amilopectina mediante uniones puente hidrogeno. Estas últimas uniones son particularmente importantes a la hora de evaluar la retrogradación del almidón. Al unirse el emulsificante a las cadenas ramificadas de la amilopectina impediría que se establezcan uniones entre las

distintas moléculas de amilopectina y por lo tanto disminuiría la retrogradación de las mismas.

Las entalpías de disociación del complejo amilosa-lípido se muestran en la Tabla 3.6. Los valores obtenidos para el pan fresco muestran que todos los emulsificantes provocaron un aumento en la entalpía de disociación del complejo. Este incremento es debido a la formación del complejo amilosa-emulsificante (Kugimiya y col., 1980; Ghiasi y col., 1982; Eliasson, 1983; Russell, 1983). A mayor concentración de emulsificante, mayor fue el valor obtenido, indicando que hubo mayor proporción de complejo formado, especialmente en el caso del SSL.

Se puede observar que la entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido fue menor luego del almacenamiento (Tabla 3.6). En el proceso de gelatinización del almidón (Día 0) la amilosa se disocia del lípido durante la fusión del complejo; transcurridos los primeros días de almacenamiento, parte de estas moléculas de amilosa recrystalizaron quedando disponibles para volver a formar el complejo. A mayor tiempo de almacenamiento (Día 7), mayor cantidad de moléculas de amilosa recrystalizadas y por ende, mayor cantidad de complejo formado.

**Tabla 3.6.** Entalpías de disociación del complejo amilosa-lípido para las distintas muestras. P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

	$\Delta H$ (J/g masa seca)*			
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 7
<b>P</b>	0,66e	nd**	0,16c	0,21e
<b>PS0,5</b>	1,46b	0,32b	0,37a	0,39d
<b>PS1</b>	3,00a	nd**	0,25b	0,92a
<b>PD0,5</b>	0,86de	0,15cd	0,26b	0,69b
<b>PD1</b>	0,95cd	0,11c	0,13d	0,37d
<b>PSD0,5</b>	1,12c	0,38a	0,36a	0,55c
<b>PSD1</b>	1,48b	0,19c	0,23d	0,54c

\* Letras distintas en la misma columna indican que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

\*\* nd: no determinada

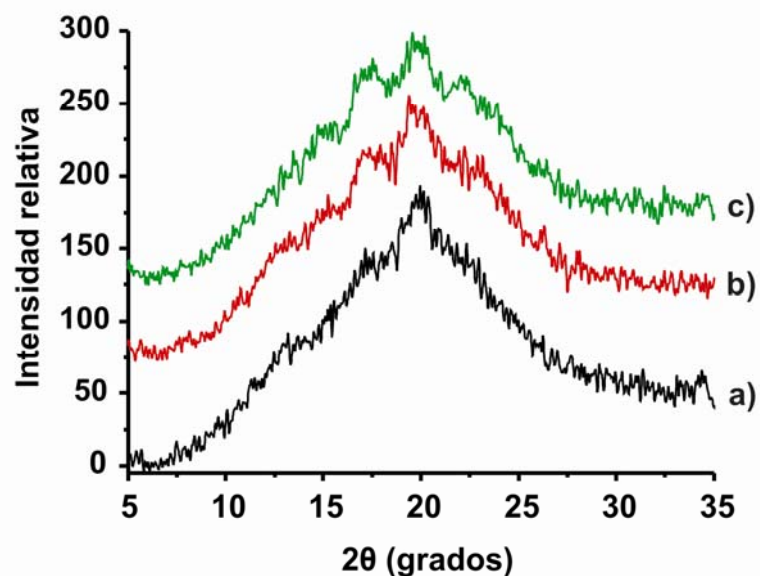


### 3.5 Evaluación del porcentaje de cristalinidad de las migas durante el almacenamiento.

Durante el almacenamiento del pan, la estructura cristalina del almidón se recupera lentamente. Esta recristalización se debe principalmente a la autoasociación de las moléculas ramificadas de la amilopectina (Karim y col., 2000; Primo-Martin y col., 2007). El aumento en el porcentaje de cristalización de este polímero durante el almacenamiento del pan puede ser evaluado mediante difracción de rayos X (Ottenhof y Farhat, 2004; Primo-Martin y col., 2007; Ratnayake y Jackson, 2007).

Se identificaron cuatro picos en la muestra de harina de trigo (almidón nativo) a ángulos  $2\theta$  de 15,0; 18,1; 20,1 y 23,0° (datos no mostrados). Estos datos fueron coincidentes con los valores informados para almidones nativos de trigo, en donde los picos de difracción aparecen aproximadamente a  $2\theta$  15, 17, 18 y 23°, correspondientes a una distancia interplanar de 58,0; 51,0; 49,0 y 38,0 nm respectivamente (Jovanovich, 1997; Primo-Martín y col., 2007), concordante con el patrón de difracción de rayos X tipo A descrito por otros autores para almidones de cereales (Zobel y col., 1988).

En la Figura 3.13 se muestra el diagrama de difracción de rayos X obtenido para las muestras de miga de pan.



**Figura 3.13.** Diagrama de difracción de rayos X de miga de pan control. **a)** Pan fresco (día 0). **b)** Pan almacenado 1 día a  $20 \pm 2$  °C. **c)** Pan almacenado 3 días a  $20 \pm 2$  °C.

El difractograma de miga de pan fresco mostró predominantemente un pico a 20 grados (Figura 3.13). Este pico se encontró en todas las muestras y corresponde a la presencia del complejo amilosa-lípido tipo V, formado durante el proceso de gelatinización (Zobel y Kulp, 1996; Primo-Martin y col., 2007). Con el almacenamiento se observó que las muestras, además del pico de 20 grados, presentaron picos en valores alrededor de 15, 17 y 23 grados, cuya área se fue incrementando con el transcurso de las horas, a causa de una mayor recristalización de la amilopeptina.

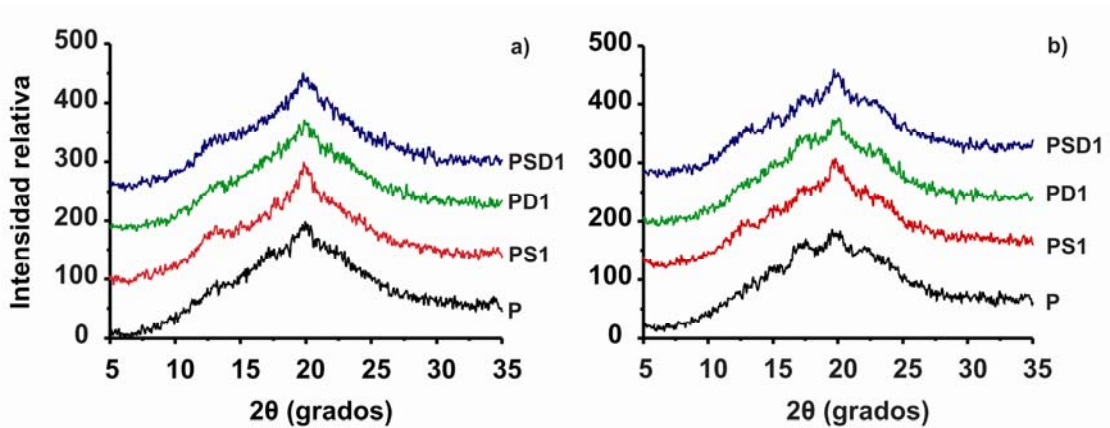
En la Tabla 3.7 se muestra el porcentaje de cristalinidad obtenido para las diferentes muestras de miga de pan.

**Tabla 3.7.** Porcentaje de cristalinidad en las migas de pan durante 3 días de almacenamiento a  $20 \pm 2$  °C. P: pan control, PS: pan + SSL, PD: pan + DATEM, PSD: pan + SSL-DATEM. Número: % p/p de emulsificante.

% Cristalinidad			
	Día 0	Día 1	Día 3
<b>P</b>	5,42	9,10	9,73
<b>PS0,5</b>	6,35	6,62	8,47
<b>PS1</b>	7,34	7,52	7,87
<b>PD0,5</b>	5,83	6,24	7,22
<b>PD1</b>	5,55	5,80	7,71
<b>PSD0,5</b>	6,18	7,40	8,28
<b>PSD1</b>	5,03	6,44	8,61

El porcentaje de cristalinidad obtenido para la harina de trigo fue de 23,4% y coincidió con valores informados por otros autores, cuyo parámetro para almidones nativos de trigo varió entre 20 y 36% (Zobel, 1988; Cooke y Gidley, 1992; Jovanovich, 1997). Durante el proceso de gelatinización la mayor parte del almidón gelatiniza; sin embargo, al ser la masa un sistema con una cantidad de agua limitada, una pequeña fracción de gránulos queda en estado cristalino. Es por ello que al determinar el porcentaje de cristalinidad de la miga control al día cero se encontró un valor de 5,42% (Tabla 3.7). Como se mencionó anteriormente, el agregado de emulsificantes a las formulaciones disminuye la gelatinización del pan

control, debido a que dichos aditivos se unen a la amilosa y a la amilopectina, dificultando la absorción de agua por parte de las mismas. Esta unión impedirá que parte del almidón gelatinice y por lo tanto quede en estado cristalino. Por esta razón, al día cero, el porcentaje de cristalinidad de las muestras que contienen emulsificantes arrojó en general valores superiores al control (P), siendo las muestras con SSL las que mayor valor presentaron (Tabla 3.7 y Figura 3.14 a).



**Figura 3.14.** Diagrama de difracción de rayos X de miga de pan. **a)** Pan fresco. **b)** Pan almacenado 3 días a  $20 \pm 2$  °C. P: pan control, PS1: pan + 1% SSL, PD1: pan + 1% DATEM, PSD1: pan + 1% SSL-DATEM.

Luego de tres días de almacenamiento, en el que el pan envejece, la amilosa y principalmente la amilopectina retrogradan, es decir, retornan a la cristalinidad, por lo que el porcentaje de cristalinidad en las muestras presentó un incremento (Tabla 3.7). La miga del pan control fue la muestra que mayor incremento presentó (Figura 3.14). Este hecho se debió a que durante el envejecimiento del pan la recristalización de la amilopectina en la miga llevó a la formación de un patrón cristalino de tipo B (Primo-Martin y col., 2007). Primo-Martin y col. (2007) encontraron en panes crujientes (“crispy rolls”) y galletitas elaborados con harina de trigo que la cristalinidad relativa de las muestras aumenta luego de almacenar las mismas durante 20 días a 22 °C. Nuestros panes no fueron almacenados durante un período tan prolongado debido a que no se justifica almacenar un pan tipo francés por un lapso superior a 3 días porque comienzan a deteriorarse las características texturales, organolépticas y microbiológicas. Sin embargo, nuestros resultados mostraron la misma tendencia encontrada por Primo-Martin y col. (2007).

A pesar de no contar con duplicados de muestras debido al elevado costo del servicio de rayos X, en general, y como era de esperar, el agregado de emulsificantes provocó una disminución en el grado de recristalización de la amilopectina (Figura 3.14 y Tabla 3.7). Como se mencionó anteriormente, este fenómeno estuvo relacionado principalmente a la unión vía puente hidrógeno de estos emulsificantes con la amilopectina, hecho que dificultaría la autoasociación de esta última e impediría que recristalice.

### 3.6 Conclusiones parciales

Al evaluar el volumen máximo exhibido por las masas durante el desarrollo de la curva de fermentación pudo comprobarse que todas las masas con 1% de emulsificante dieron valores superiores a los de la masa control, siendo el pan que contenía SSL el que mayor volumen presentó seguido del pan con la mezcla SSL-DATEM. Este parámetro da un indicio de cómo se comportarán los panes durante la fermentación y por lo tanto, en la etapa de cocción se espera que el volumen de pan sea mayor. Coincidentemente con lo obtenido para el volumen máximo de masa fermentada, se observó la misma tendencia para el volumen específico de los panes, tanto para las concentraciones de 0,5% y 1% p/p; siendo los panes con SSL los que presentaron mayor volumen específico, seguidos por los que contenían la mezcla de SSL-DATEM. Las migas de los panes preparados con DATEM y SSL-DATEM al 0,5% mostraron una mayor cantidad de alvéolos, pero estos fueron de menor tamaño que los de los panes elaborados con SSL, lo cual no es deseable en una miga de buena calidad. Los alvéolos de los panes elaborados con SSL al 0,5% fueron los que mayor fracción de área de miga ocuparon, seguidos por aquellos panes con SSL al 1% y la mezcla de ambos aditivos en sus dos concentraciones (0,5% y 1%), resultados coincidentes con el volumen específico de los panes. Es decir, los panes con 0,5% de SSL fueron los de mayor volumen específico, con una miga que posee una cantidad adecuada de alvéolos de gran tamaño y a su vez es homogénea.

El comportamiento observado hasta el momento, como sugerimos en capítulos anteriores, podría ser atribuido al carácter hidrofílico-lipofílico de los emulsificantes.

Estas moléculas se unirían a los sitios hidrofóbicos de las proteínas y de esta manera promoverían una adecuada agregación de las proteínas de gluten en la masa. Una red de gluten fuerte y extensible permitiría una mejor expansión de la masa y proporcionaría panes de mayor volumen, mejor textura y miga más blanda y esponjosa. La cabeza hidrofílica de estos surfactantes formaría fases lamelares líquido-cristalina en el agua, las cuales se asociarían con las gliadinas (Tamstorf y col., 1986; Ribotta y col., 2004). Estas estructuras, junto con las gluteninas del gluten, podrían contribuir a la viscoelasticidad de la masa, permitiendo que las células de gas se expandan, lo que resultaría en un aumento del volumen de las piezas de pan.

La disminución de la humedad de la miga con el agregado tanto de SSL como DATEM durante el período de almacenamiento estaría relacionada con la capacidad de dichos emulsificantes de adsorberse en la superficie de los gránulos de almidón e interactuar con la amilosa y la amilopectina, dificultando la absorción de agua por parte del almidón. De esta manera, la misma quedaría libre y migraría desde la miga hacia la corteza.

Los emulsificantes disminuyeron durante el período de almacenamiento la dureza de la miga de pan, siendo el SSL más efectivo que el DATEM. Los panes almacenados durante 1 día presentaron también mayor cohesividad y elasticidad que en ausencia de emulsificantes. El agregado de estos aditivos permitiría obtener panes con estructura más íntegra con una miga menos desgranable y con un comportamiento más elástico.

El agregado de emulsificantes disminuyó la entalpía de gelatinización del pan control. Este fenómeno se atribuyó a la interacción entre dichos aditivos con los gránulos de almidón, lo cual impediría que parte de estos últimos absorbieran agua y por lo tanto disminuiría la cantidad de gránulos que gelatinizan quedando parte de ellos en estado cristalino. Este hecho se confirmó al evaluar la cristalinidad de las migas del pan fresco mediante rayos X, la cual fue inferior a la de los panes que contenían emulsificantes. Durante el período de almacenamiento los emulsificantes retardaron el envejecimiento del pan, siendo el SSL el emulsificante más efectivo en este aspecto. Este fenómeno fue coincidente con la menor dureza presentada por los panes con emulsificantes durante el almacenamiento.

# **CAPITULO 4**

---

**Optimización de una formulación de pan  
enriquecido en fibra, preparado en planta piloto,  
utilizando emulsificantes**

---

Los resultados de este capítulo surgieron de una colaboración bilateral en el marco del Proyecto CYTED 106PI0301 “Obtención de productos de panificación para necesidades específicas” (coordinador: Dr. Alberto E. León). El trabajo experimental fue desarrollado en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos del Departamento de Ingeniería Química de la Escuela Politécnica de la Universidad de San Pablo (USP) y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

En este capítulo se intentó optimizar una formulación de un pan nutricional, enriquecido en fibra y elaborado a escala piloto, utilizando los emulsificantes previamente estudiados (SSL y DATEM) y Polisorbato 80 (PS80) como mejoradores.

Para este trabajo experimental, se buscó una harina de características similares a la usada en los ensayos de laboratorio en Argentina.

Las especificaciones de la harina utilizada en este capítulo (M. EXTRA-PT, Brasil) fueron proporcionadas por el molino Moinho Pacífico S.A. (SP, Brasil) y se detallan en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Especificaciones de la harina M. EXTRA-PT.

Parámetro	Valor obtenido
Humedad (%)	14
Cenizas (%)	0,73
Proteínas (%)	9,1
Gluten húmedo	25,8
Gluten seco	8,6
Falling Number	360
<b>Alveograma</b>	
Tenacidad-P (mm)	125
Extensibilidad-L (mm)	47
Trabajo de deformación-W ( $10^{-4}$ J)	238
<b>Farinograma</b>	
Absorción de agua (%)	59,7
Tiempo de desarrollo (min)	8,9
Estabilidad (min)	9,3
Índice de tolerancia al amasado (UF)	35

**Ensayos preliminares.** Para mejorar las propiedades panificables de las harinas, suelen adicionarse coadyuvantes de tecnología. Algunas harinas necesitan ser corregidas en la cantidad de  $\alpha$ -amilasa para ser consideradas panificables, ya que esta enzima está presente en bajas cantidades en el endosperma del grano de trigo (Leonhardt, 1999). Una medida de actividad de esta enzima es el Falling Number (FN), el cual está basado en la habilidad de la  $\alpha$ -amilasa para licuar un gel de almidón. Harinas con FN superior a 250 resultan muy fuertes para ser utilizadas en panificación.

Para mejorar las propiedades panificables de nuestra harina (FN = 360) se adicionaron como coadyuvantes ácido ascórbico (0,02%) y  $\alpha$ -amilasa (0,00125%). Estos valores fueron seleccionados de acuerdo a las especificaciones del fabricante (DANISCO A/S, Dinamarca).

La cantidad de almidón resistente de maíz (ARM) utilizado fue 12,5%. Estos valores fueron tomados de ensayos previos realizados en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la USP (SP, Brasil), en los cuales se evaluó la sustitución parcial de harina de trigo por 7,5; 10,0; 12,5 y 15,0% de ARM (Matsuda, 2007). Los valores obtenidos para los ensayos de volumen de pan, humedad y concentración de ARM en pan tipo francés precocido y congelado almacenado hasta 46 días mostraron que con niveles superiores al 12,5% de ARM se obtenían resultados satisfactorios. Sin embargo, se observó que la miga de pan era más firme con el agregado del 15% de ARM (Matsuda, 2007), por lo que se optó por el nivel de 12,5%. Los ensayos fueron realizados de acuerdo al proyecto de mezcla de tres componentes (SSL-PS80-DATEM), el cual posee tres puntos centrales, para estimar el error puro (Matuda, 2004) (Materiales y Métodos, Inciso 1.13).

#### 4.1 Propiedades reológicas de masas

Los resultados obtenidos para la mezcla 0 (87,5% harina + 12,5% ARM), correspondiente a la masa control, se expresan en la Tabla 4.2. En esta tabla se comparan dichos valores con los obtenidos para la harina sin el agregado de almidón resistente.

El agregado a la harina de almidón resistente produjo un aumento en la absorción



de agua del 5%. Este resultado era esperable, ya que la sustitución de las proteínas de la harina de trigo por fibra dietaria provoca un aumento en la absorción de agua (Hung y col., 2005). Resultados similares fueron informados por Matsuda (2007) en donde se analizaron mezclas de harinas de trigo sustituidas con distintos niveles de almidón resistente (0 a 30%). El mayor nivel de sustitución arrojó una diferencia en la absorción de agua de 2% con respecto a la harina.

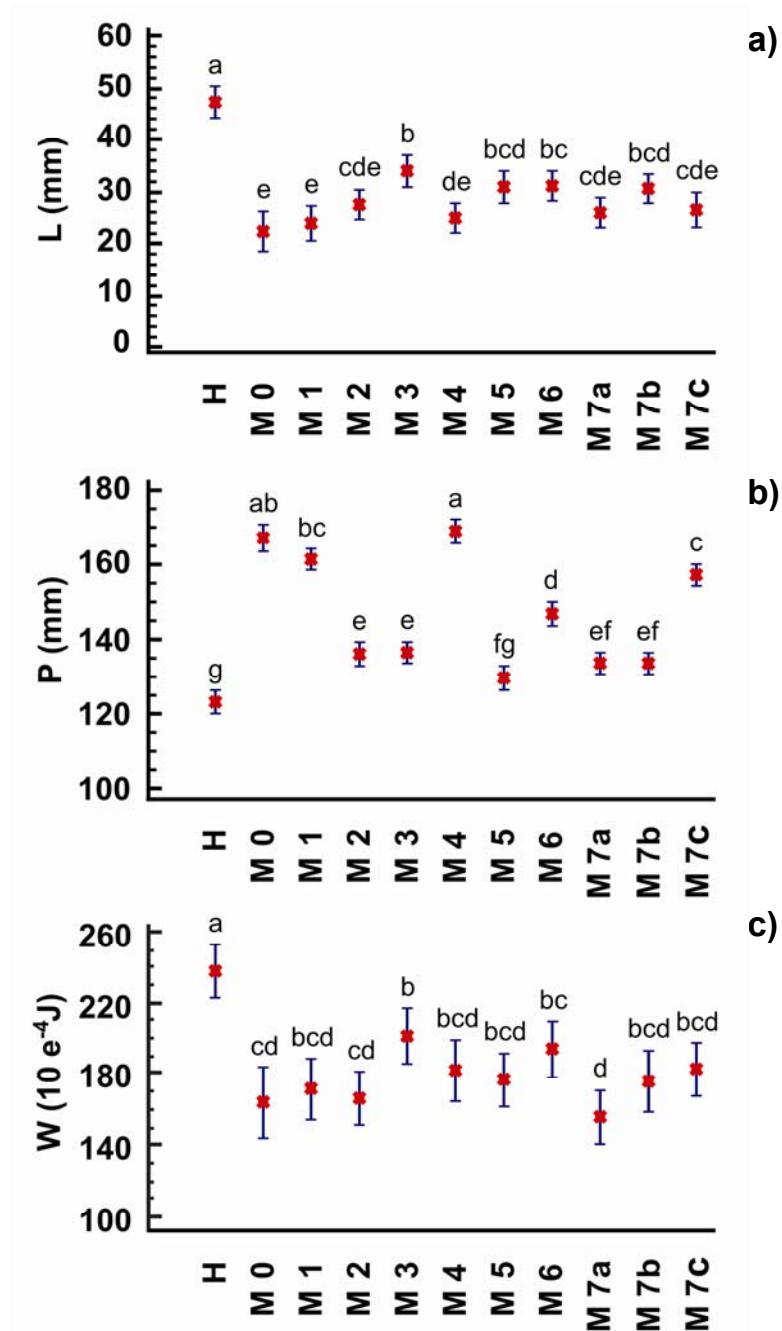
**Tabla 4.2.** Parámetros farinográficos de harina y la mezcla M0 (harina de trigo + ARM).

	Harina	M0
<b>Absorción de agua (%)</b>	59,7	62,7
<b>Tiempo de desarrollo (min)</b>	8,9	7,1
<b>Estabilidad (min)</b>	9,3	2,2
<b>Índice de tolerancia al amasado (UF)</b>	35	79

La estabilidad disminuyó notablemente, demostrando una menor tolerancia de la harina al amasado. El índice de tolerancia al amasado (MTI, mixing tolerance index) arrojó valores muy superiores a los de la harina de trigo, indicando que el agregado de almidón resistente provoca un mayor grado de ablandamiento de la masa durante el amasado.

La variación estadística de los parámetros obtenidos en el ensayo alveográfico se muestra en la Figura 4.1. Todas las mezclas mostraron una disminución significativa en la extensibilidad (L) con respecto a la harina (H), la cual no contenía almidón resistente en su composición (Figura 4.1 a). Estos resultados muestran que el agregado de almidón resistente indujo la formación de masas menos extensibles. A su vez el DATEM fue el emulsificante que contribuyó a una leve recuperación de la extensibilidad, ya que la muestra M3 (masa con 0,5% p/p de DATEM) fue la de mayor L, seguida de M5 y M6 (formulaciones que también contenían DATEM, en menor proporción).

La tenacidad (P) de las mezclas fue superior a la observada en la harina (125 mm H<sub>2</sub>O) (Figura 4.1 b). Uno de los mayores valores obtenidos fue el de la mezcla control (M0, 167 mm H<sub>2</sub>O), esto significa que el ARM aumentó la tenacidad de la masa obtenida. El agregado de PS80 (M2), DATEM (M3) y SSL-DATEM (M5) a la mezcla produjo una disminución de la tenacidad con respecto a M0.

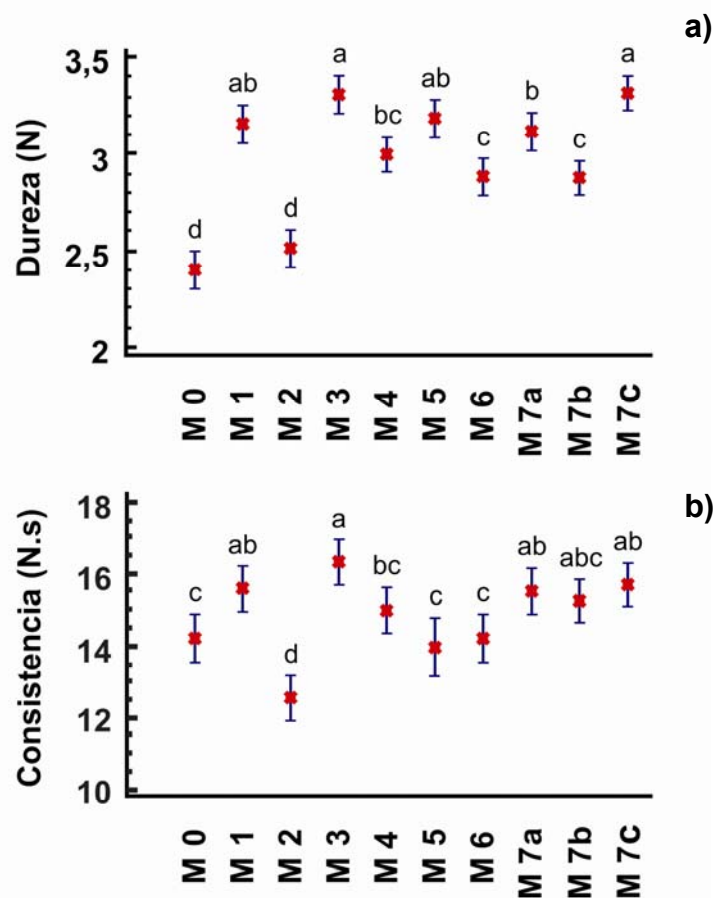


**Figura 4.1.** Valores medios para: **a)** Extensibilidad (L), **b)** Tenacidad (P) y **c)** Trabajo de deformación (W). H: harina. M: mezcla. Número: valor codificado (Materiales y Métodos, Tabla 1.3).

Los resultados obtenidos para el trabajo de deformación (W) mostraron una tendencia similar a los de extensibilidad (L). Se observó una disminución en su valor en las mezclas con ARM con respecto a la harina (H, 238 J) (Figura 4.1 c). A pesar de que no se observaron diferencias significativas con el agregado de los diferentes emulsificantes, al igual que en el caso de la extensibilidad, las masas M3 y M6 fueron las que mayores valores arrojaron.

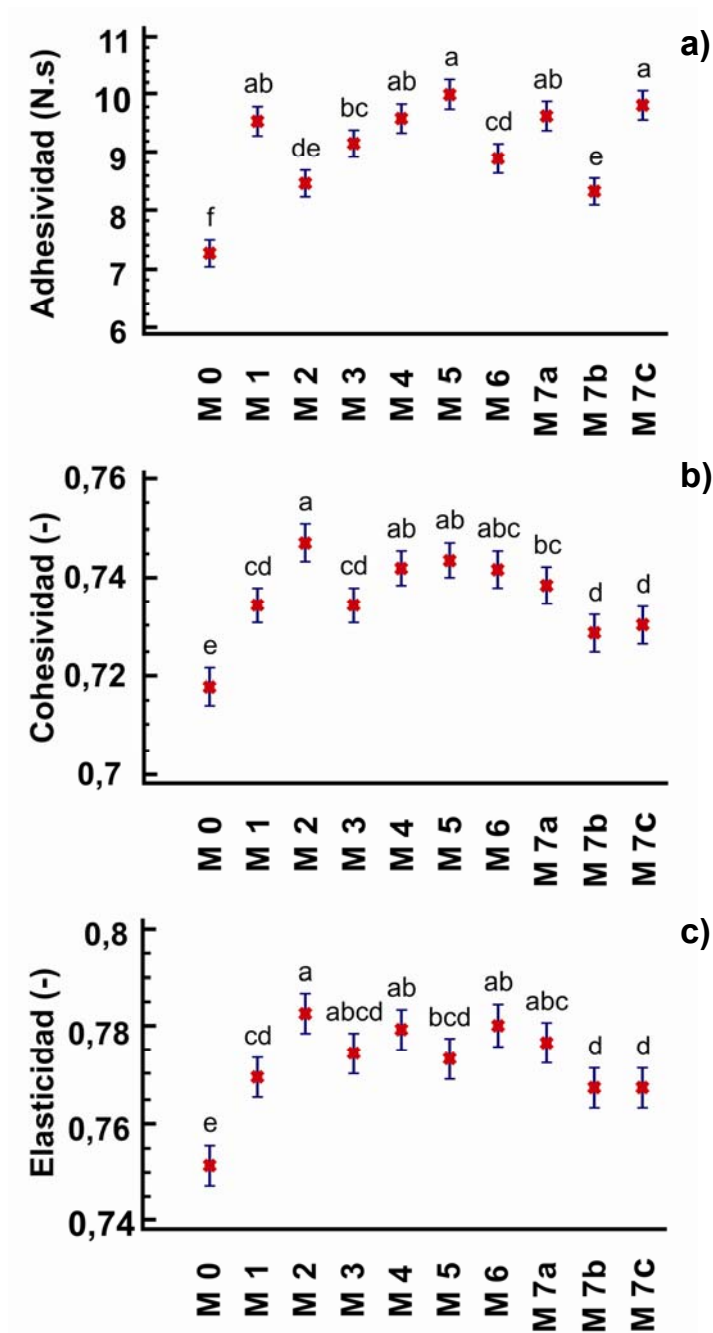
La disminución en los parámetros L y W y el aumento en el parámetro P puede ser atribuido a la dilución proteica. Al sustituir parte de la harina por almidón resistente estamos disminuyendo la cantidad de proteínas presente en la harina de trigo, esto daría como resultado masas menos extensibles y más tenaces, aunque con menor trabajo de deformación alveográfico. Resultados similares fueron obtenidos por Wang y col. (2002), que estudiaron el desempeño de masas de harina de trigo adicionadas con diversos tipos de fibras.

Se observó un aumento significativo de la dureza de las masas (Figura 4.2 a) para todas las muestras excepto M2, con respecto a la mezcla control (M0), siendo M1 y M3 las masas más duras. Estos resultados sugieren que los emulsificantes del tipo SSL y DATEM son más efectivos en la estructuración del gluten que el PS80, aún en presencia de almidón resistente. La masa M2 presentó menor consistencia que M0. Por otro lado, M1, M3 y M7 (a, b y c) mostraron una consistencia superior a la del control (M0) (Figura 4.2 b).



**Figura 4.2.** Valores medios para: **a)** Dureza y **b)** Consistencia obtenidos en el ensayo de TPA de acuerdo al agregado de emulsificantes. M: mezcla. Número: valor codificado.

Todas las masas ensayadas mostraron una adhesividad superior a la de la masa control (M0). La masa M2 (0,5% de PS80) presentó una adhesividad cercana al control (M0), mientras que las masas que contenían SSL (M1, M4 y M5) fueron las más adhesivas (Figura 4.3 a). La elasticidad y cohesividad de las masas mostraron comportamientos similares (Figura 4.3 b y c). En todos los casos el agregado de emulsificantes aumentó los valores de estos dos parámetros con respecto a M0, no observándose diferencias significativas entre los aditivos.



**Figura 4.3.** Valores medios para: a) Adhesividad, b) Elasticidad y c) Cohesividad obtenidos en el ensayo de TPA de acuerdo al agregado de emulsificantes. M: mezcla. Número: valor codificado.

Los resultados obtenidos para la textura de la masa muestran que el agregado de 0,5% de PS80 favorece la formación de masas menos duras y consistentes, similares a las masas sin aditivo. Estas masas a su vez son poco adhesivas y más cohesivas, por lo que cabe esperar que los panes que contengan en su formulación 0,5% de PS80, a pesar de ser menos duros que los elaborados con los demás aditivos, se desgranen con menos facilidad. Las masas elaboradas con 0,5% de DATEM y 0,5% de SSL serán más duras y consistentes y menos cohesivas, por lo que a juzgar por los resultados de textura de las masas, se esperaría que den panes de miga más dura, pero más desgranables.

Al evaluar la extensión uniaxial de las masas, sólo las mezclas M1 (0,5% SSL), M3 (0,5% DATEM) y M5 (0,25% SSL + 0,25% DATEM) mostraron un aumento significativo con respecto al control (M0 = 0,325N) en la resistencia a la extensión de la masa (F), con valores de 0,46N, 0,38N y 0,43N, respectivamente (Tabla 4.3). Todas las muestras, a excepción de M1 y M5, presentaron una disminución significativa de la energía aplicada a la masa hasta la ruptura (A) con respecto a M0. La mezcla 4 (M4, 0,25% SSL+0,25% PS80) fue la que mayor disminución mostró en dicho parámetro con un valor de 1,65 mm<sup>2</sup>. La extensibilidad (L) mostró una disminución en todas las mezclas con respecto a la mezcla control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos aditivos (Tabla 4.3).

Por lo tanto, el agregado de SSL y DATEM a las formulaciones darían masas más resistentes a la ruptura y un poco menos extensibles.

Algunos autores estudiaron la extensión uniaxial de masas, pero en ausencia de ARM, no habiéndose encontrado bibliografía al respecto. Ravi y col. (2000) evaluaron el efecto de los emulsificantes SSL, DATEM y glicerol monoestearato (GMS) (0,25-1% p/p) sobre la extensión uniaxial de masas. A pesar de no contener ARM, estos autores demostraron que todos los emulsificantes en todas sus concentraciones provocaron un aumento en el parámetro F y una disminución en L con respecto a la masa sin aditivo, resultados similares a los de este trabajo de tesis. Por otro lado, Aamodt y col. (2005) encontraron que la máxima resistencia a la extensión (F) fue superior en la masa (sin ARM) con DATEM (0,45% p/p) respecto de la muestra sin aditivo y especialmente en alta concentración (0,90% p/p); mientras que la distancia de extensión hasta la ruptura (L) resultó menor que para el control y disminuyó con el aumento de nivel de emulsificante. Romeu y col. (2006)

encontraron en masas sin ARM elaboradas con 0,25% de PS80 y 0,25% de DATEM una resistencia máxima a la extensión superior a la masa control, mientras que el parámetro L disminuyó en masas preparadas con 0,5% de SSL, 0,5% de PS80 y la mezcla equiproporcional de los tres emulsificantes.

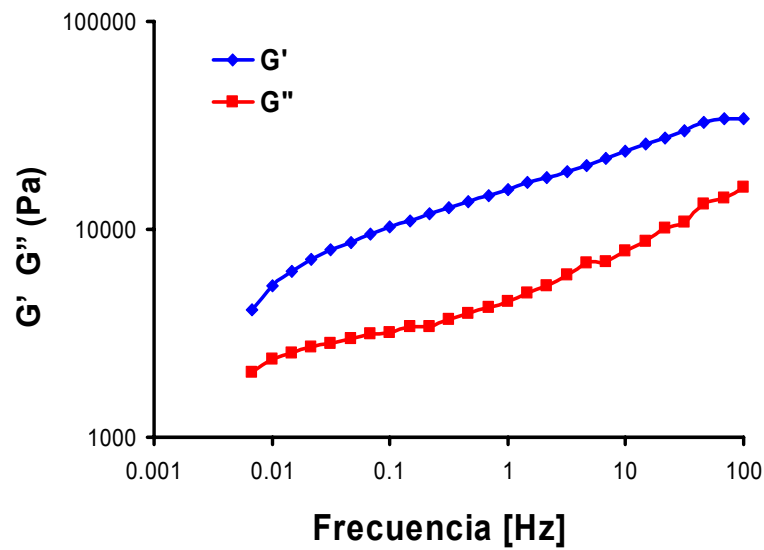
**Tabla 4.3.** Extensión uniaxial de las masas. F: máxima resistencia a la extensibilidad, A: energía aplicada a la masa hasta la ruptura, L: distancia de extensión hasta la ruptura. M: mezcla, Número después de M: valor codificado de cada muestra.

	F (N)	A (mm <sup>2</sup> )	L (mm)
<b>M0</b>	0,325de	2,188a	18,1a
<b>M1</b>	0,464a	2,159a	15,5bc
<b>M2</b>	0,329de	1,751de	15,3bc
<b>M3</b>	0,377c	1,926bcd	15,2bc
<b>M4</b>	0,316e	1,648e	15,5bc
<b>M5</b>	0,432b	2,113ab	15,3bc
<b>M6</b>	0,352cd	1,971bc	16,3b
<b>M7a</b>	0,306e	1,659e	15,4bc
<b>M7b</b>	0,325de	1,435f	15,0c
<b>M7c</b>	0,346cde	1,892cd	15,3bc

\* Letras distintas en la misma columna indican que hay diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

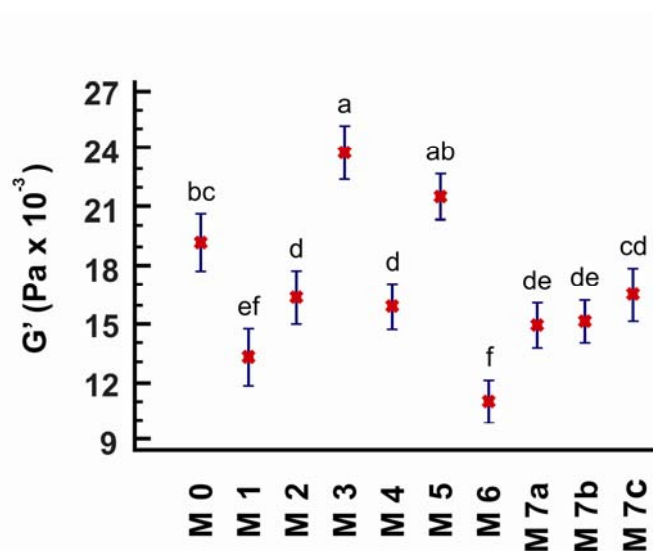
Al estudiar la viscoelasticidad, tal y como sucedió en el caso de las masas del Capítulo 2, todas las muestras ensayadas presentaron una zona de viscoelasticidad lineal entre 0,5 y 10 Pa. Por lo tanto, los barridos de frecuencia se efectuaron a esfuerzo constante de 5 Pa.

La Figura 4.4 muestra un reograma típico de estas masas. El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) fue mayor que el módulo de pérdida ( $G''$ ) en todo el rango de frecuencias para todas las muestras evaluadas, obteniéndose curvas prácticamente paralelas y ascendentes (Figura 4.4). Esta relación observada entre los módulos ( $G' > G''$ ) indica un predominio sobre el sistema del comportamiento elástico.



**Figura 4.4.** Relación entre el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) para la Mezcla con 0,5% de SSL (M1).

Al evaluar el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) a 1 Hz de frecuencia se observó que sólo la mezcla 3 (M3) mostró valores superiores a los de la muestra control (M0), con un valor de  $23,8 \times 10^3$  Pa. Por otra parte, las mezclas M6 y M1 mostraron los menores valores, con un valor mínimo para M6 de  $11,0 \times 10^3$  Pa (Figura 4.5). Estas mezclas tendrían un comportamiento menos elástico que la masa control.

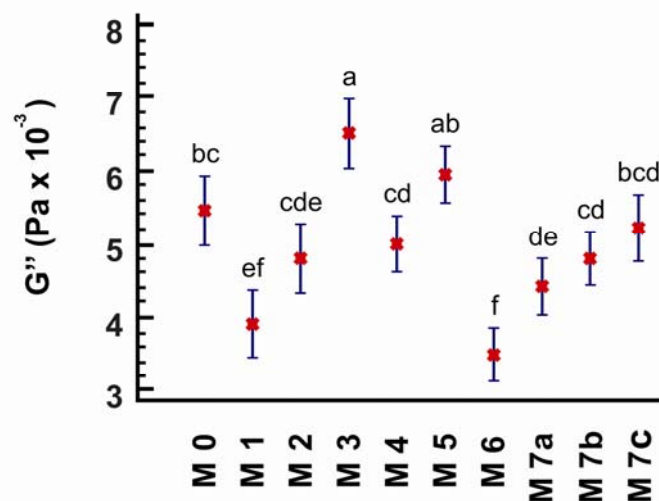


**Figura 4.5.** Módulo de almacenamiento ( $G'$ ). M: mezcla. Número después de M: valor codificado de la mezcla.

Siendo que la mezcla 3 (M3) posee un 0,5% de DATEM y M5 un 0,25% de este emulsificante y 0,25% de SSL, los resultados obtenidos muestran que existe una tendencia a aumentar los valores de  $G'$  con el agregado de DATEM. En el caso de M6 (0,25% PS80 + 0,25% DATEM) el PS80 gobernaría el comportamiento de la masa, dando masas de menor componente elástica.

Las muestras presentaron la misma variación del módulo de pérdida  $G''$  que la observada para  $G'$ . Las masas M3 y M5 presentaron el mayor valor de  $G''$  mientras que las de menor valor fueron M1 y M6 (Figura 4.6).

Por otro lado, los resultados obtenidos (1 Hz de frecuencia) para la tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta = G''/G'$ ) mostraron que tanto M4 como M6 presentaron valores superiores (0,318 y 0,313, respectivamente) a los de M0 (0,284). Dichos resultados muestran que las mismas presentaron un carácter más viscoso que la masa control. Si bien M6 mostró una disminución en los parámetros  $G'$  y  $G''$ , la disminución manifestada en el módulo de almacenamiento, con respecto a M0, fue superior a la de  $G''$ , por esta razón la  $\tan \delta$  fue superior a la de la masa control. Los resultados sugieren que las masas con mayor carácter viscoso fueron las que contenían PS80 en combinación con SSL o DATEM.



**Figura 4.6.** Módulo de pérdida ( $G''$ ). M: mezcla. Número después de M: valor codificado de cada mezcla.

En la Tabla 4.4 se muestran los valores de los parámetros obtenidos de las curvas de desarrollo de masa y de retención de  $\text{CO}_2$  de las mezclas sometidas al



ensayo de reofermentación. Valores altos de altura de desarrollo de la masa (Hm) indican un desarrollo de masa óptimo, a mayor valor de este parámetro mayor será el volumen de pan obtenido. Largos tiempos de desarrollo de masa y de retención de CO<sub>2</sub>, t1 y t'1, respectivamente, son indeseables en los procesos industriales debido al mayor consumo de energía. Valores altos de H'm indican que la masa es capaz de retener gran cantidad de CO<sub>2</sub>, esto es favorable, ya que los panes obtenidos presentarán un mayor volumen y la miga será más esponjosa.

**Tabla 4.4.** Valores obtenidos de las curvas del reofermentógrafo. Curva de desarrollo de masa: Hm: Altura de desarrollo de la masa (mm), t1: Tiempo correspondiente a Hm (min). Curva de retención de CO<sub>2</sub>: H'm: Altura máxima de la curva de retención de CO<sub>2</sub> relativa a la presión máxima (mm), t'1: Tiempo correspondiente a H'm (min), tx: Tiempo en que la masa comienza a perder CO<sub>2</sub> (min). M: mezcla. Número después de M: valor codificado de cada muestra.

	Desarrollo de masa		Retención de CO <sub>2</sub>		
	Hm (mm)	t1 (min)	H'm (mm)	t'1 (min)	tx (min)
<b>M0</b>	42,2	180,0	63,1	126,0	94,5
<b>M1</b>	45,0	160,5	62,4	126,0	93,0
<b>M2</b>	34,5	180,0	62,7	114,0	75,0
<b>M3</b>	40,2	178,5	60,2	127,5	90,0
<b>M4</b>	43,7	171,0	61,3	141,0	103,5
<b>M5</b>	34,4	175,5	58,3	121,5	73,5
<b>M6</b>	37,8	180,0	64,5	126,0	85,5
<b>M7a</b>	45,1	156,0	66,1	130,5	99,0
<b>M7b</b>	44,5	178,5	65,9	133,5	90,0
<b>M7c</b>	44,1	145,5	69,5	128,0	89,0

Las mezclas 2 (M2, 0,5% PS80) y 5 (M5, 0,25% SSL + 0,25% DATEM) impidieron un adecuado desarrollo de la masa, ya que presentaron los menores valores de (Hm) (Tabla 4.4). Por lo tanto, el desarrollo de estas masas será menor y los panes

obtenidos con dichas muestras tendrán un volumen más pequeño. Teniendo en cuenta los valores de Hm para M1 (0,5% SSL) y M3 (0,5% DATEM), el DATEM es el emulsificante que estaría ejerciendo un efecto depresor en M5. La mezcla 1 (M1) y la mezcla del punto triple (M7a, b y c) alcanzaron los máximos valores de Hm en los menores tiempos (t1). En el caso de la mezcla 7, esta masa también mostró un valor de tenacidad (P) menor al de M0 (Figura 4.1), por lo que resultaría una masa menos tenaz que sería óptima para los procesos industriales.

Al evaluar los resultados de retención de CO<sub>2</sub>, pudo observarse que al igual que en el desarrollo de masa, la muestra M5 fue la que presentó menores valores de H'm y t'1. Esta mezcla también mostró un valor bajo de tx (tiempo en que la masa comienza a perder CO<sub>2</sub>), o sea que no solamente tuvo poca producción de gas sino que además la masa comenzó a perder CO<sub>2</sub> en menor tiempo (73,5 min). Por otra parte, la mezcla del punto triple (M7a, b y c) mostró el mayor valor de H'm (67,2 ± 2,0 mm).

## 4.2 Caracterización reológica de la muestra optimizada

### **Ajuste de los parámetros reológicos de masas al modelo cúbico especial.**

Los valores de los distintos parámetros reológicos obtenidos a partir de los ensayos de TPA, Extensión Uniaxial y Reofermentación fueron analizados mediante un ANAVA a fin de estudiar el efecto de los emulsificantes sobre dichos parámetros. El análisis matemático de los datos experimentales se basó en la regresión de un modelo cúbico especial, desarrollado para establecer la relación entre el parámetro reológico evaluado (Y) y los valores codificados de las variables independientes X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> (emulsificantes) así como de sus interacciones. Con el objeto de simplificar el modelo, el mismo fue replanteado a través de la eliminación de los términos que no tuvieron un efecto significativo (p > 0,05). En virtud de ello, los modelos obtenidos para cada parámetro se muestran en la Tabla 4.5.

Con respecto a los parámetros medidos en los ensayos de TPA y Extensión Uniaxial, sólo la Consistencia y la Distancia presentaron valores de p ≤ 0,05 y coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) superiores a 90%. El valor de p ≤ 0,05 indica que habrá una relación estadísticamente significativa entre dichos parámetros y los

componentes del modelo planteado al 95% de nivel de confianza. Por otra parte, el coeficiente de determinación es una medida del grado de ajuste, habiéndose encontrado en la literatura que dicho valor debe ser al menos de 80% para considerar que un modelo presenta un buen grado de ajuste (Guan y Yao, 2008).

**Tabla 4.5.** Modelos predictivos de distintos parámetros característicos de los ensayos de TPA y Extensión Uniaxial en masas con distintos emulsificantes (sin levadura) y de Reofermentación (con levadura).

Ensayo	Parámetro	Ecuación predictiva	p*	R <sup>2</sup>
TPA	Dureza	$D = 3,2278*SSL + 2,6582*PS80 + 3,227*DATEM$	0,118	50,95
	Consistencia	$C = 15,611*SSL + 12,4635*PS80 + 16,2545*DATEM - 5,237*SSL*PS80 - 3,811*SSL*DATEM + 46,2605*SSL*PS80*DATEM$	0,003	99,11
	Adhesividad	$A = 9,88443*SSL + 8,75883*PS80 + 9,13443*DATEM$	0,355	29,21
	Cohesividad	$Cohes = 0,734089*SSL + 0,745289*PS80 + 0,733289*DATEM$	0,261	36,05
	Elasticidad	$E = 0,768822*SSL + 0,779222*PS80 + 0,775622*DATEM$	0,408	25,81
Extensión uniaxial	Fuerza	$F = 0,446189*SSL + 0,352689*PS80 + 0,344689*DATEM$	0,649	13,43
	Distancia	$L = 15,5059*SSL + 15,2612*PS80 + 15,2596*DATEM + 4,29029*PS80*DATEM - 15,5049*SSL*PS80*DATEM$	0,020	91,61
	Área	$A = 2,10207*SSL + 1,85847*PS80 + 1,81247*DATEM$	0,751	9,10
Reofermentación	Hm	$Hm = 45,0*SSL + 34,65*PS80 + 40,35*DATEM + 15,5*SSL*PS80 - 33,1*SSL*DATEM + 176,102*SSL*PS80*DATEM$	<b>0,001</b>	<b>99,60</b>
	t1	$t1 = 163,041*SSL + 180,656*PS80 - 140,15*DATEM$	0,137	63,89
	H'm	$H'm = 61,5035*SSL + 62,5162*PS80 + 59,3162*DATEM + 37,873*PS80*DATEM$	0,055	75,55
	t'1	$t'1 = 133,0*SSL + 118,0*PS80 + 121,0*DATEM$	0,561	17,50
	tx	$tx = 86,6367*SSL + 77,0367*PS80 + 85,6258*DATEM + 85,8904*SSL*PS80$	0,167	60,66

\*Valores de  $p \leq 0,05$  indican que hay diferencias significativas.

Por su parte, para las masas elaboradas con levadura, la altura máxima de desarrollo de masa (Hm) fue el único parámetro que presentó un  $p \leq 0,05$  con un

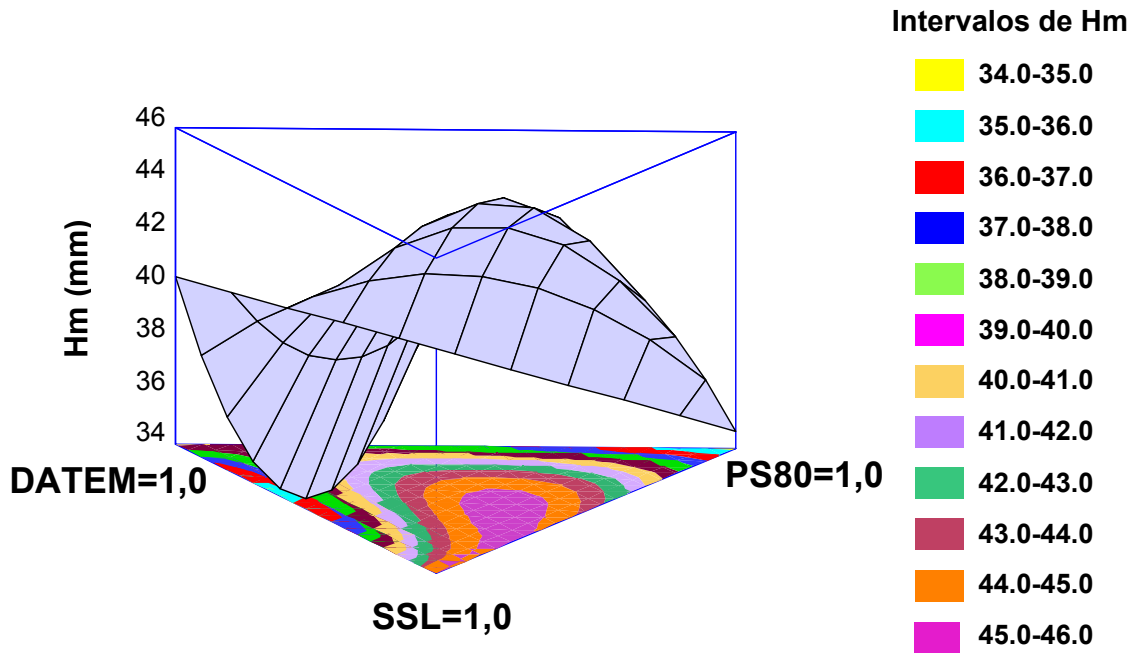
coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 99,60% (Tabla 4.5), lo que indica que dicho porcentaje de variabilidad en el parámetro Hm es explicado por el modelo planteado.

La consistencia es un parámetro importante en la evaluación de las propiedades texturales de una masa destinada para panificación. En este sentido, masas muy duras y consistentes darán panes duros que desarrollarán poco volumen, mientras que masas con una dureza y consistencia muy bajas generarán panes gomosos con volumen reducido. Con respecto a la altura máxima de desarrollo de masa (Hm), el mismo es uno de los parámetros más importantes a la hora de evaluar cómo se comportará la masa durante el proceso de fermentación. Así, cuanto mayor sea el valor de Hm, mayor será el volumen alcanzado por la masa durante la fermentación, y por lo tanto el volumen del pan obtenido luego de la cocción. Por este motivo, y de acuerdo a los resultados obtenidos en los modelos predictivos, se llevó a cabo la optimización del modelo considerando el parámetro Hm.

Una de las mejores maneras de visualizar el efecto de las variables independientes sobre las variables dependientes es a través de los gráficos de superficie de respuesta. La metodología de superficie de respuesta (SRM, Surface Response Methodology) permitió analizar el modelo de regresión planteado con el fin de maximizar la variable Hm influenciada por los distintos emulsificantes en sus distintas concentraciones. La Figura 4.7 muestra la superficie de respuesta obtenida para el proyecto de mezcla de tres emulsificantes (SSL, PS80, DATEM) para el parámetro Hm.

La Tabla 4.6 muestra los valores codificados y decodificados correspondientes a las concentraciones de cada uno de los emulsificantes en el punto óptimo (Hm 45,5 mm).

Los distintos parámetros de TPA, Extensión Uniaxial y Reofermentación fueron medidos en las masas elaboradas con las concentraciones óptimas de cada uno de los emulsificantes. La Tabla 4.7 muestra los valores experimentales y los calculados con el modelo, pudiéndose observar que los parámetros que menor error relativo porcentual presentaron fueron los correspondientes a los parámetros del ensayo de TPA. Con respecto a Hm, el error relativo porcentual fue de 5,6%, siendo el valor experimental superior al calculado matemáticamente.



**Figura 4.7.** Superficie de respuesta para el parámetro Hm correspondiente al modelo cúbico especial del proyecto de mezcla de 3 emulsificantes (SSL, PS80, DATEM).

**Tabla 4.6.** Valores codificados de la respuesta optimizada para el parámetro Hm.

Factor	Valor óptimo (codificado)	Valor óptimo (decodificado) (% p/p)
SSL	0,487663	0,24
PS80	0,36095	0,18
DATEM	0,151387	0,08

La masa preparada con las concentraciones óptimas de emulsificantes presentó una mayor altura de desarrollo de masa que la observada para todas las mezclas evaluadas hasta el momento (Tabla 4.7), por lo que el pan elaborado con esta formulación optimizada tendría las mejores características físicas y texturales.

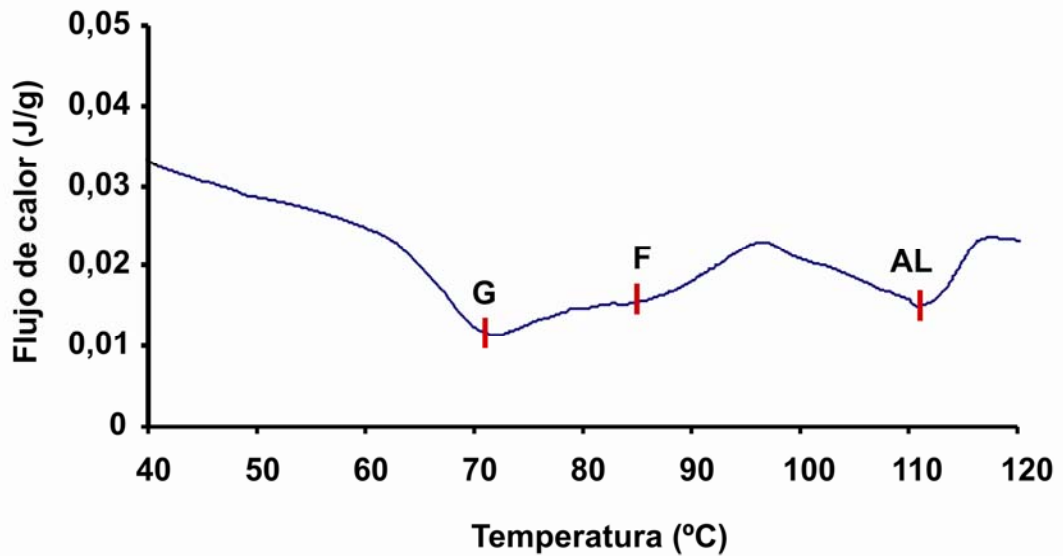
**Tabla 4.7.** Comparación de los valores experimentales de los parámetros de TPA, Extensión uniaxial y Reofermentación con los valores calculados con el modelo, para la mezcla optimizada.

Ensayo	Parámetro	Valor Calculado	Valor experimental	Error relativo (%)
TPA	Dureza (N)	3,11	3,24 ± 0,26	4,0
	Consistencia (N.s)	32,1	33,5 ± 3,1	3,3
	Adhesividad (N.s)	9,43	9,41 ± 0,66	-0,2
	Cohesividad (-)	0,74	0,73 ± 0,01	-1,3
	Elasticidad (-)	0,77	0,76 ± 0,01	-1,3
Extensión uniaxial	Fuerza (N)	0,37	0,34 ± 0,08	-8,8
	Distancia (mm)	15,2	14,7 ± 1,4	-3,4
	Area (N.mm)	1,81	1,66 ± 0,30	-9,0
Reofermentación	Hm (mm)	45,5	48,2 ± 0,1	5,6
	t1 (min)	164,6	173,3 ± 5,3	5,0
	H'm (mm)	63,5	65,8 ± 1,6	3,5
	t'1 (min)	133,7	111,7 ± 5,3	-19,7
	tx (min)	97,8	85,5 ± 4,2	-14,4

### 4.3 Comportamiento térmico de las masas durante la cocción y el almacenamiento

En la Figura 4.8 se muestra un termograma de gelatinización típico obtenido para todas las muestras ensayadas. Al igual que lo observado en el Capítulo 3 (Inciso 3.4), el proceso de gelatinización (como consecuencia de la restricción de agua) mostró dos endotermas: G asociada con la gelatinización del almidón y F correspondiente a la energía requerida para fundir las estructuras cristalinas más estables del almidón (Biliaderis, 1980; León y col, 1997; Ribotta y col., 2004). En este caso, también se observó el tercer pico endotérmico correspondiente a la

disociación del complejo amilosa-lípido (AL), ampliamente estudiado por Jovanovich y colaboradores (1992, 1999).



**Figura 4.8.** Termograma de DSC para la gelatinización de la masa control (M0). Endotermas: G, gelatinización del almidón. F, fusión de los cristales más estables. AL, disociación complejo amilosa-lípido.

La temperatura de gelatinización de la masa control (M0) fresca fue 70 °C para el pico G y 84 °C para el F. Los emulsificantes no modificaron la temperatura de G y F. En general la retrogradación del almidón durante el almacenamiento provocó una disminución de la temperatura de gelatinización de entre 2 y 4 °C para G, a excepción de la muestra con 0,5% de SSL (M1), en el que subió 10 °C. Para el caso de F se observó un aumento de entre 7 y 10 °C.

En la Tabla 4.8 se muestran los valores de entalpía de gelatinización y retrogradación de almidón. Durante la gelatinización todas las muestras que contenían emulsificantes mostraron una disminución en el valor de  $\Delta H$  con respecto a la muestra control (M0), siendo la mezcla optimizada (Mop.) la que menor valor arrojó. Como se mencionó en el Capítulo 3 (Inciso 3.4) esta reducción en la entalpía de gelatinización al agregar los emulsificantes a la masa estaría mediada por un lado por la interacción de la cola hidrofóbica de dichos aditivos con la hélice de amilosa, formando así el complejo amilosa-emulsificante; y por otro lado por la unión de la cabeza hidrofílica del aditivo a la amilopectina mediante enlaces puente hidrógeno. Así, los gránulos de almidón absorberían menos agua, con una consecuente

disminución de la gelatinización de los mismos. De esta manera habrá menos almidón gelatinizado que sea capaz de retrogradar durante el almacenamiento.

**Tabla 4.8.** Entalpías de gelatinización y retrogradación para las distintas muestras. M: mezcla. Números después de M: valor codificado de cada muestra.

	$\Delta H$ (J/g masa seca)		
	Gelatinización	1 día	7 días
<b>M0</b>	5,71	2,38	4,38
<b>M1</b>	4,88	2,17	3,81
<b>M2</b>	4,94	1,81	3,47
<b>M3</b>	4,90	2,00	4,27
<b>M4</b>	4,89	2,29	3,63
<b>M5</b>	4,85	2,24	3,73
<b>M6</b>	4,71	1,77	3,73
<b>M7a</b>	4,86	1,62	2,84
<b>M7b</b>	4,65	1,76	2,82
<b>M7c</b>	4,81	1,80	2,77
<b>Mop.</b>	4,08	1,59	2,57

Luego de almacenar las muestras se observó que en el caso de las mezclas, los emulsificantes disminuyeron la retrogradación del almidón ( $\Delta H_{MX} < \Delta H_{M0}$ ) (Tabla 4.8). Como se mencionó en el Capítulo 3 (Inciso 3.4) este fenómeno se debe principalmente a que al unirse la cabeza hidrofílica de los emulsificantes con la amilopectina impediría que se establezcan uniones entre las distintas moléculas de dicho polímero disminuyendo así la retrogradación de las mismas.

A las 24 h (1 día) de almacenamiento la mezcla optimizada (Mop.) fue la que dio el valor más bajo de entalpía de retrogradación, seguida de la muestra triple (M7a, b y c) con un valor promedio de  $1,72 \pm 0,10$  J/g masa seca. Al cabo de 7 días de almacenamiento se observó la misma tendencia que a las 24 h, siendo nuevamente la muestra optimizada la que menor valor presentó seguida de la mezcla triple (M7a, b y c) (Tabla 4.8). De esta manera, la combinación de los tres emulsificantes SSL, PS80 y DATEM resultó ser más efectiva que los emulsificantes puros o en mezclas



binarias. La mezcla optimizada resultaría la combinación óptima a la hora de retrasar el envejecimiento del pan, ya que sería la que prolongaría más la vida útil de los panes elaborados.

Los valores obtenidos para el pan fresco para las entalpías de disociación del complejo amilosa-lípido muestran que todos los emulsificantes (a excepción de la mezcla M3) provocaron un aumento en el  $\Delta H$  (Tabla 4.9). Como se mencionó en el Capítulo 3 (Inciso 3.4), este incremento se correspondió con la formación del complejo amilosa-emulsificante por parte de estos aditivos. La mezcla optimizada (Mop.) fue la que mayor valor presentó (1,85 J/g masa seca), indicando que dicha combinación de emulsificantes favorecería la formación del complejo amilosa-emulsificante.

**Tabla 4.9.** Entalpías de disociación del complejo amilosa-lípido para las distintas muestras. M: mezcla. Número después de M: valor codificado de cada muestra.

	$\Delta H$ (J/g masa seca)		
	Día 0	Día 1	Día 7
<b>M0</b>	1,20	0,25	0,62
<b>M1</b>	1,58	0,66	0,69
<b>M2</b>	1,31	0,27	0,65
<b>M3</b>	1,19	0,40	0,56
<b>M4</b>	1,25	0,42	0,46
<b>M5</b>	1,61	0,78	0,99
<b>M6</b>	1,43	0,44	0,64
<b>M7a</b>	1,50	0,36	0,52
<b>M7b</b>	1,49	0,51	0,66
<b>M7c</b>	1,62	0,52	0,61
<b>Mop.</b>	1,85	0,47	0,60

De igual manera a lo sucedido en el Capítulo 3 (Inciso 3.4), durante el período de almacenamiento se observó una disminución de la entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido (Tabla 4.9). Como se mencionó en dicho Capítulo, en el

proceso de gelatinización del almidón (Día 0) la amilosa se disocia del lípido durante la fusión del complejo. Durante los primeros días de almacenamiento, parte de estas moléculas de amilosa recrystalizaron quedando disponibles para volver a formar el complejo. Luego de 7 días de almacenamiento, habrá mayor cantidad de moléculas de amilosa recrystalizadas y por lo tanto, mayor será la cantidad de complejo formado.

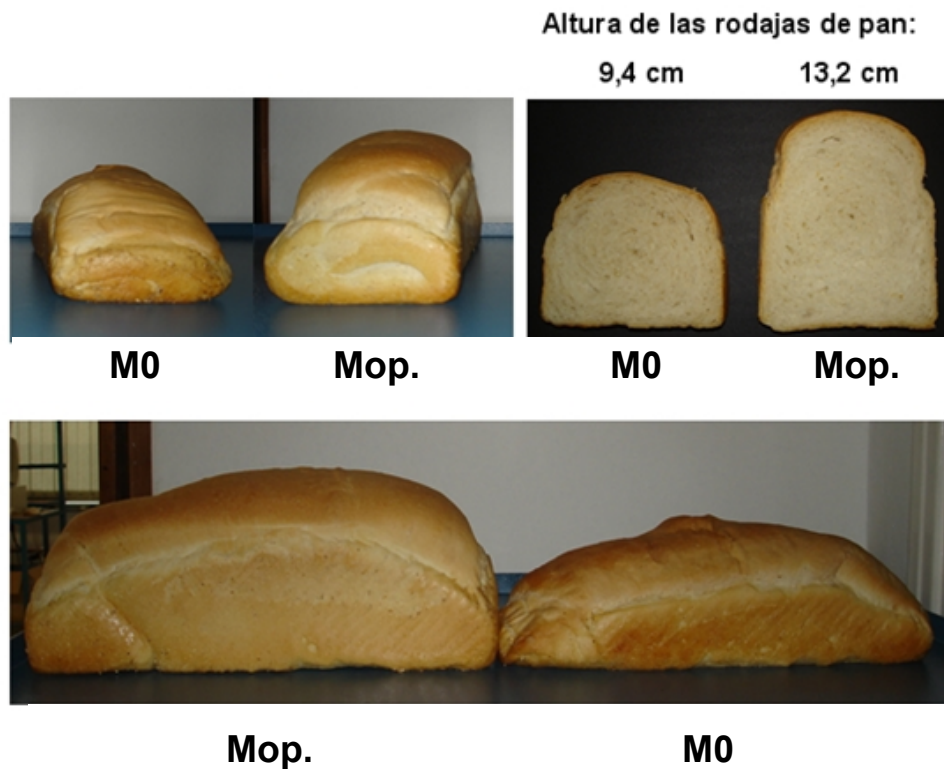
#### 4.4 Determinación de la calidad panadera

La evaluación de calidad de los panes fue realizada a través de las determinaciones de volumen específico del pan, y humedad y firmeza de la miga. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.10. El volumen específico del pan de la mezcla optimizada (Mop.) resultó un 68,7% mayor que el volumen del pan elaborado con la masa control (M0). La mezcla optimizada presentó valores de humedad levemente inferiores a los de M0. A su vez, los valores hallados para la firmeza de la miga mostraron una disminución importante para Mop., con un valor 72,8% menor que el hallado para la masa control (M0). Esta disminución puede atribuirse a que los emulsificantes ejercieron un efecto mejorador sobre la miga del pan elaborado con la mezcla optimizada, la cual presentó una textura más blanda y esponjosa que la del pan M0 (Tabla 4.10).

**Tabla 4.10.** Resultados de humedad y firmeza de la miga y volumen, peso y volumen específico de los panes elaborados con la Mezcla control (M0) y la Mezcla optimizada (Mop.).

	<b>M0</b>	<b>Mop.</b>
<b>Volumen de pan (cm<sup>3</sup>)</b>	1916	3112
<b>Peso de pan (g)</b>	526,8	507,1
<b>Volumen específico de pan (cm<sup>3</sup>/g)</b>	3,64	6,14
<b>Humedad de la miga (%)</b>	46,4	46,1
<b>Firmeza (N)</b>	2,65	0,72

La Figura 4.9 muestra imágenes de los panes elaborados con la masa control (M0) y con la mezcla optimizada (Mop.). En dichas imágenes se puede observar el incremento en el volumen de pan que produjo el agregado de los emulsificantes SSL, PS80 y DATEM, así como también la altura de las rodajas de ambos panes, siendo la del pan elaborado con la mezcla optimizada superior a la del control.



**Figura 4.9.** Imágenes de los panes elaborados con la mezcla control (M0) y la mezcla optimizada (Mop.).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta última sección, se comprobó que la combinación de emulsificantes hallada mediante el análisis de optimización mostró ser la indicada para formular una mezcla de la que se obtengan panes de buena calidad.

#### 4.5 Conclusiones parciales

El agregado de almidón resistente a la masa produjo un aumento en la absorción de agua del 5%, así como también un incremento en el Índice de Tolerancia al

Mezclado (ITM) con la consecuente disminución en la estabilidad de la masa. Estos resultados eran esperables, ya que la sustitución de las proteínas de la harina de trigo por fibra dietaria da como resultado masas menos estables con menor tolerancia al amasado y un mayor ablandamiento. Este comportamiento se debe a que al agregar almidón resistente la red de gluten que se formará durante el amasado de la masa será más débil, por esta razón se hace necesario el uso de emulsificantes como mejoradores.

La extensibilidad (L) y el trabajo de deformación (W) de todas las muestras fue inferior a la masa preparada sin almidón resistente, mientras que la tenacidad (P) fue superior. Como consecuencia de la dilución de las proteínas de la harina por efecto del almidón resistente, las masas fueron menos extensibles y más tenaces. Sólo las muestras que contenían DATEM en su formulación mostraron una recuperación en la extensibilidad.

El agregado de 0,5% de PS80 produjo masas menos duras y consistentes, las cuales fueron más elásticas y cohesivas, lo cual conllevará a la obtención de panes menos duros pero que se desgranarán con menos facilidad. La incorporación de SSL, DATEM y SSL-DATEM dio masas más duras y consistentes, con una mayor resistencia a la extensión. Las mismas fueron menos cohesivas y extensibles. Por lo que los panes elaborados con dichos emulsificantes serán más desgranables con una textura más consistente.

El ensayo de reofermentación da idea de cómo se comportará la masa en la fermentadora durante la elaboración de pan. Se pudo comprobar que al agregar a la formulación PS80 y SSL-DATEM las masas desarrollaron menos y la mezcla PS80-DATEM generó una masa con poca capacidad de retención de CO<sub>2</sub>.

La optimización de los valores de los diferentes parámetros mediante el modelado de los parámetros reológicos permitió encontrar la concentración adecuada de cada emulsificante para formular un pan con características texturales mejoradas. La masa preparada con la mezcla optimizada de emulsificantes experimentó una mayor altura de desarrollo de masa. A su vez, esta masa, al someterla a un calentamiento progresivo que simula la cocción de la misma durante el proceso de panificación, necesitó menor cantidad de energía para la gelatinización del almidón. Asimismo, mitigó la retrogradación del almidón durante el almacenamiento, retrasando el envejecimiento y por lo tanto prolongando la vida útil del pan.

La utilización de la técnica de superficie de respuesta, es una herramienta muy útil a la hora de analizar los datos, ya que posibilita el análisis y modelado de sistemas donde la finalidad es optimizar una variable respuesta influenciada por diversos factores. Este análisis permitió la obtención de un pan que contenía la proporción óptima de los emulsificantes SSL, PS80 y DATEM, el cual presentó un volumen específico un 70% mayor que el pan sin estos aditivos. También mostró un peso de hogaza inferior al del pan control, por lo cual tendrá una miga más aireada y esponjosa. Este hecho fue comprobado mediante el análisis de firmeza de la miga, el cual arrojó para el pan optimizado un valor del 72,8% inferior al del pan control.

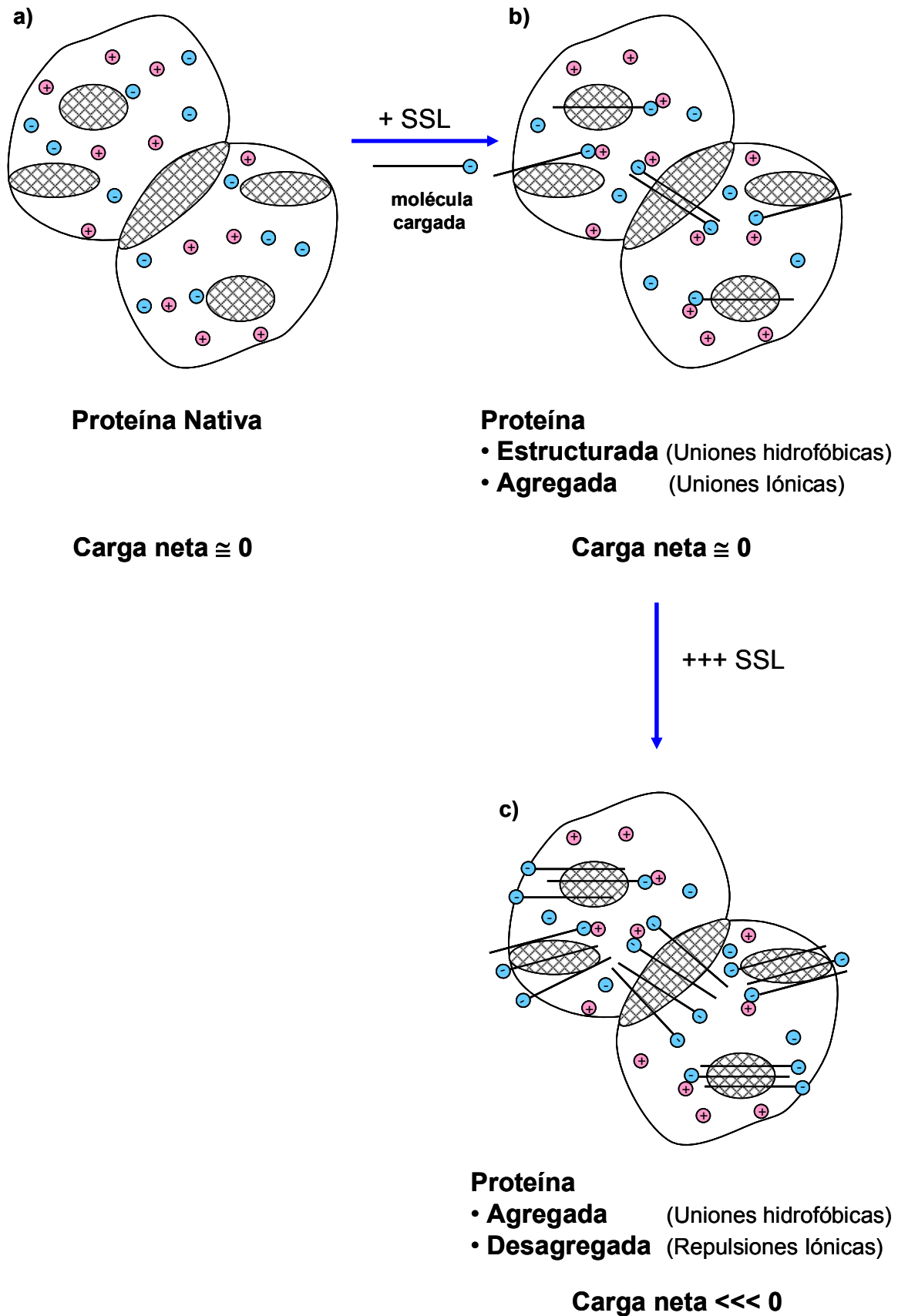
## **CONCLUSIONES GENERALES**

---

En este trabajo de tesis se intentó profundizar el conocimiento del mecanismo de acción de los emulsificantes SSL y DATEM en el proceso de panificación mediante el análisis de las interacciones que establecen con las proteínas de gluten y el almidón.

Se encontró que bajas concentraciones de SSL indujeron un plegamiento en la estructura proteica del gluten, mientras que altas concentraciones provocaron un desplegamiento de las proteínas generando una matriz más desagregada. Una posible explicación de este fenómeno se ha esquematizado a través de un modelo propuesto en la Figura 1. Las proteínas de gluten poseen una baja densidad de carga debido a una proporción aproximadamente igual entre aminoácidos catiónicos y aniónicos. Algunos de los aminoácidos que componen la red de gluten son hidrofóbicos los cuales podrían generar regiones hidrofóbicas (Figura 1 a, zona cuadrículada) en la superficie de la matriz. Al incorporar bajas concentraciones de SSL a la masa, la cola lipofílica del emulsificante se unirá a estas regiones hidrofóbicas, incorporando la carga negativa de su cabeza polar a la matriz. Este fenómeno promoverá la agregación de la proteína en la masa, a causa de la interacción entre la cabeza polar del emulsificante y los aminoácidos con carga positiva de la proteína (Figura 1 b). La incorporación de mayores cantidades de SSL a la masa causará por un lado el desplegamiento de la proteína de gluten debido a la repulsión que generará el exceso de carga negativa incorporada por el emulsificante a la matriz, y por otro una agregación de la proteína mediada por las interacciones hidrofóbicas como consecuencia del exceso de emulsificante (Figura 1 c).

La incorporación de SSL no sólo mejoró la calidad de los panes frescos (textura, volumen, miga más blanda y esponjosa, menor grado de gelatinización, etc.) sino que también retardó el envejecimiento de las piezas almacenadas a 20 °C durante 3 días (disminución de la entalpía de retrogradación). La capacidad del emulsificante de formar complejos amilosa-lípido, en donde la cola lipofílica del aditivo se intercala dentro de la hélice no polar de amilosa, se vio reflejada en la información obtenida de la gelatinización y la retrogradación de los panes durante el almacenamiento.



**Figura 1.** Interacción del SSL con las proteínas de gluten. Zonas cuadrículadas: regiones hidrofóbicas. **a)** Gluten sin SSL, **b)** Gluten + SSL (baja concentración), **c)** Gluten + SSL (alta concentración).

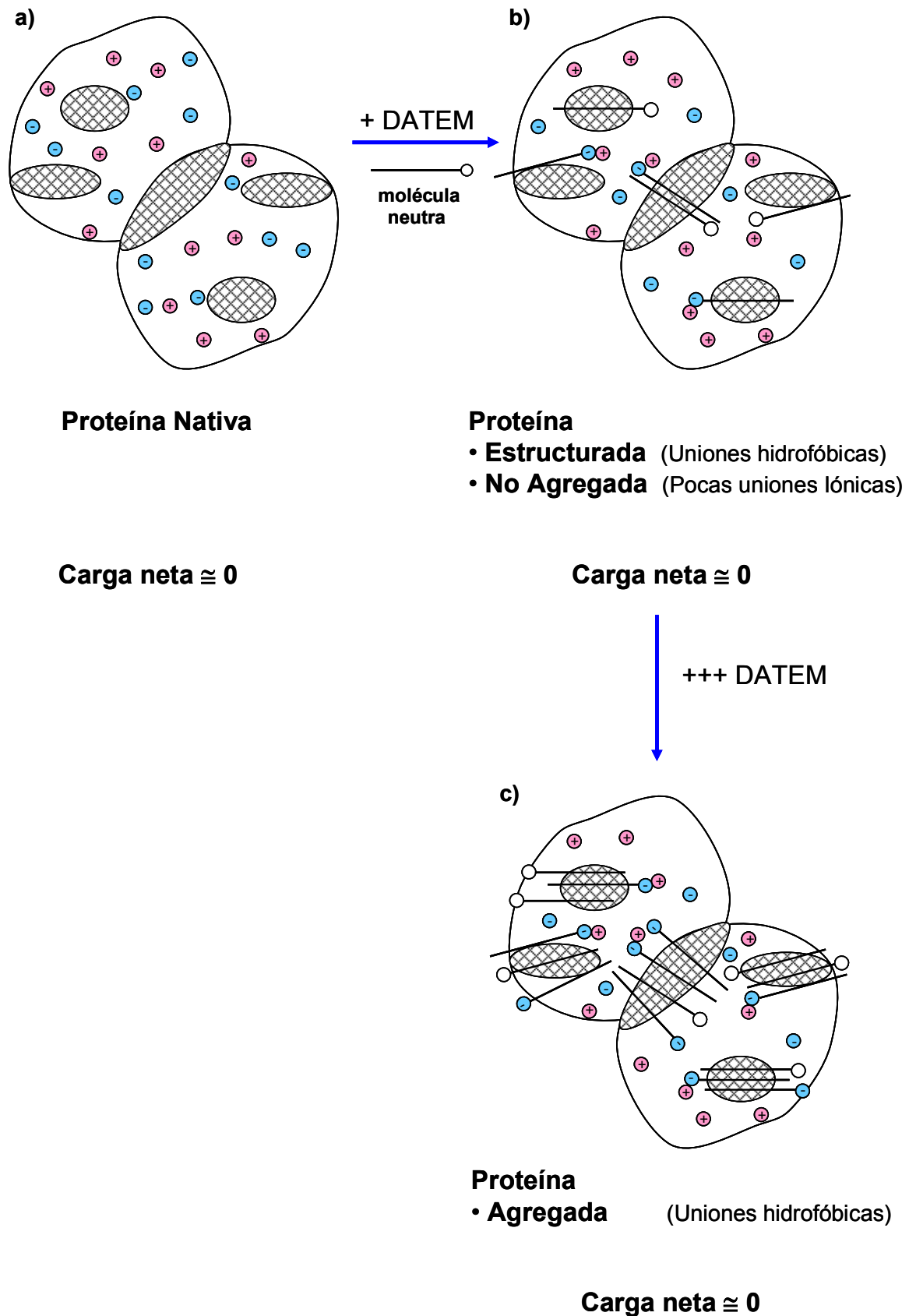


La amilopectina no forma complejos tan fácilmente como lo hace la amilosa debido a que no posee tantas conformaciones helicoidales, razón por la cual la interacción amilopectina-emulsificante ocurriría en la superficie de los gránulos de almidón mediante uniones puente hidrógeno. De esta forma el SSL, un emulsificante con alto carácter hidrofílico, se uniría con su cabeza polar a través de uniones puente hidrogeno a las moléculas de amilopectina, con mayor facilidad que el DATEM. Este efecto podría también contribuir a minimizar la retrogradación del almidón. En este aspecto, la interacción del emulsificante con el almidón jugó un papel fundamental.

El DATEM generó una red de gluten tipo laminar con una estructura más replegada con menor tendencia a la depolimerización (menor proporción de agregados solubles en ausencia de SDS), que en el caso del SSL. Estas diferencias estarían asociadas a los diferentes cambios conformacionales de las proteínas producidos por cada emulsificante en la matriz del gluten (mayor proporción de estructura  $\alpha$ -hélice y bajo grado de exposición de tirosina para el DATEM).

La manera en que el DATEM se une a las proteínas de gluten se representa en el modelo propuesto en la Figura 2. Las uniones hidrofóbicas que se establecen entre los aminoácidos de la red proteica se muestran en la Figura 2 a. Bajas concentraciones de DATEM, al igual que en el caso del SSL, favorecieron la formación de uniones hidrofóbicas; mientras que la interacción entre la cabeza hidrofílica del DATEM y los aminoácidos cargados de las proteínas del gluten sería menos efectiva por comportarse esa porción de la molécula como un ácido débil parcialmente ionizado. Las interacciones hidrofóbicas provocaron la formación de una matriz de gluten estructurada, aunque no agregada como consecuencia de la baja proporción de interacciones iónicas.

La incorporación a la masa de mayores cantidades de DATEM causó una agregación de las proteínas de gluten debido a la mayor cantidad de uniones hidrofóbicas generadas. Simultáneamente, no provocó un desplegamiento de la red de gluten, como en el caso del SSL, como consecuencia de una menor repulsión de cargas (Figura 2 c).



**Figura 2.** Interacción del DATEM con las proteínas de gluten. Zonas cuadrículadas: regiones hidrofóbicas. **a)** Gluten sin DATEM, **b)** Gluten + DATEM (baja concentración), **c)** Gluten + DATEM (alta concentración).

El DATEM si bien formó complejos con las moléculas de amilosa y estableció uniones puente hidrógeno con la amilopectina, lo hizo en menor proporción que el SSL. Estos resultados se vieron reflejados en los menores valores de entalpías de gelatinización y retrogradación obtenidos para los panes con SSL.

Las distintas formas de interacción entre los emulsificantes y las proteínas condicionarán la formación de redes de gluten diferentes, las cuales conllevarán a la obtención de masas con características estructurales y texturales diferentes. Como consecuencia del cambio estructural producido al agregar altas concentraciones de emulsificantes, las masas elaboradas con SSL necesitaron mucho tiempo de amasado para poder desarrollarse, presentaron una consistencia y una dureza excesivas y sus matrices fueron poco elásticas y cohesivas. Por su parte, el DATEM generó masas muy poco estables. Debido a este comportamiento se llegó a la conclusión que la incorporación de altas concentraciones de emulsificantes no sería recomendable en la elaboración de pan, ya que generarían una desestabilización en la matriz de la masa que impediría el adecuado desarrollo de la misma y se obtendrían panes de características texturales no deseables. Por el contrario, el agregado de dichos aditivos en bajas concentraciones ( $\leq 1\%$ ) generó masas menos duras, consistentes y adhesivas, provocando un ablandamiento que mejoró sus características texturales. Estos efectos se vieron reflejados al momento de elaborar los panes. La incorporación de bajas concentraciones de SSL y DATEM a la formulación generó panes con mayor volumen específico, miga menos dura, más homogénea y esponjosa, con mayor número de alvéolos; resultando el SSL más efectivo que el DATEM.

Como última instancia de esta tesis surgió la inquietud de agregar almidón resistente de maíz (ARM) a la formulación para obtener un pan de molde nutricional adicionado con fibra que sea saludable. El inconveniente que presenta esta fibra alimentaria es que tecnológicamente, la sustitución de harina de trigo por ARM afecta a la calidad del pan, por la dilución de las proteínas del gluten. Por lo tanto, con el fin de obtener un producto de alta calidad, se ajustó la formulación de las masas mediante el agregado de emulsificantes. El agregado de DATEM provocó una recuperación en la extensibilidad de las masas, mientras que la incorporación de SSL y la mezcla SSL-DATEM a las formulaciones mejoró la dureza y consistencia de

las mismas, con mayor resistencia a la extensión. Por su parte, el PS80 generó masas más blandas, elásticas y cohesivas, condiciones desfavorables para la elaboración de pan, hecho que se comprobó en los ensayos de reofermentación al observarse que las masas elaboradas con este emulsificante desarrollaron menos y tuvieron poca capacidad de retención de CO<sub>2</sub>.

El pan obtenido con la concentración optimizada de los tres emulsificantes (con un predominio en el nivel de SSL con respecto al DATEM y PS80) presentó, en comparación al pan sin aditivo, un volumen específico considerablemente mayor con una miga mucho más blanda y esponjosa.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis resaltan la relevancia del uso de ciertos emulsificantes en determinados niveles para panificación. Los mismos evidencian la necesidad de la incorporación de emulsificantes a formulaciones con ingredientes nutricionales que bajan la calidad panadera, como en este caso fue el almidón resistente de maíz. Mediante los ensayos realizados en panes con ARM pudo comprobarse que se pueden elaborar panes enriquecidos en fibra alimentaria que presenten buen volumen y textura utilizando emulsificantes como mejoradores de la formulación y así obtener productos de panificación que sean aceptados por los consumidores y que proporcionen un aporte benéfico a la salud.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- AACC International. 2000/2001.** Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. The Association: St. Paul, MN.
- Aamodt A., Magnus E.M., Færgestad, E.M. 2003.** Effect of flour quality, ascorbic acid and DATEM on dough rheological parameters and hearth loaves characteristics. *Journal of Food Science*, 68: 2201-2210.
- Aamodt A., Magnus E.M., Færgestad, E.M. 2004.** Effect of protein quality, protein content, bran addition, DATEM, proving time, and their interaction on hearth bread. *Cereal Chemistry*, 81(6): 722-734.
- Aamodt A., Magnus E.M., Færgestad E.M. 2005a.** Hearth bread characteristic: Effect of protein Quality, protein content, whole meal flour, DATEM, proving time, and their interactions. *Cereal Chemistry*, 82(3): 290-301.
- Aamodt A., Magnus E.M., Hollung K., Uhlen A.K., Færgestad E.M. 2005b.** Dough and hearth bread characteristics influenced by protein composition, protein content, DATEM, and their interactions. *Journal of Food Science*, 70: 214-221.
- Abdel-Aal E.S.M., Hucl P., Chibbar R.N., Han H.L., Demeke T. 2002.** Physicochemical and structural characteristics of flours and starches from waxy and nonwaxy wheats. *Cereal Chemistry*, 79(3): 458-464.
- Ahmed S., Jones F.R.1990.** A review of particulate reinforcement theories for polymer composites. *Journal of Materials Science*, 25: 4933-4942.
- Åkerberg A., Liljeberg H., Björck I. 1998.** Effect of amylose/amylopectin ratio and baking conditions on resistant starch formation and glycaemic indices. *Journal of Cereal Science*, 28: 71-80.
- Almutawah A., Barker S.A., Belton P.S. 2007.** Hydration of Gluten: A Dielectric, Calorimetric, and Fourier Transform Infrared Study. *Biomacromolecules*, 8: 1601-1606.
- American Association of Cereal Chemists. 2001.** AACC report: the definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46: 112-129.
- Angioloni A., Dalla Rosa M. 2005.** Dough thermo-mechanical properties: influence of sodium chloride, mixing time and equipment. *Journal of Cereal Science*, 41: 327-331.
- Armero E., Collar C. 1996.** Antistaling additive effects on fresh wheat bread quality. *Food Science and Technology Internacional*, 2(5): 323-333.
- Armero E., Collar C. 1998.** Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives. *Journal of Cereal Science*, 28(2): 165-174.

- Arntfield S., Murray E. 1981.** The influence of processing parameters on food protein functionality. 1. Differential scanning calorimetry as indicator of proteins denaturation. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 14: 289-294.
- Arntfield S., Ismond M., Murray E. 1990.** Thermal analysis of food proteins in relation to processing effects. En: *Thermal Analysis of Food*. Eds. Harwalkar V.R., Ma C.Y. Elsevier Science Publishing Co. (NY, EUA), pp. 51-91.
- ASP N.G. 1992.** Preface: Resistant Starch. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: 51.
- Atwell W.A., Hood L.F., Lineback D.R., Varriano-Marston E., Zobel H.F. 1988.** The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Food World*, 33: 306-311.
- 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.
- Azizi M.H., Rao G.V. 2004.** Effect of surfactant gel and gum combinations on dough rheological characteristics and quality of bread. *Journal of Food Quality*, 27: 320-336.
- Baik M.Y., Chinachoti P. 2000.** Moisture redistribution and phase transition during bread staling. *Cereal Chemistry*, 77: 484-488.
- Baks T., Ngene I.S., van Soest J.J.G. 2007.** Comparison of methods to determine the degree of gelatinization for both high and low starch concentrations. *Carbohydrate polymers*, 67: 481-490.
- Bárcenas M.E., Haros M., Rosell C.M. 2003.** An approach to studying the effect of different bread improvers on the staling of pre-baked frozen bread. *European Food Research and Technology*, 218(1): 56-61.
- Bárcenas M.E., Benedito C., Rosell C.M. 2004.** Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage. *Food Hydrocolloids*, 18(5): 769-774.
- Barichelo V., Yada R.I., Coffin R.H., Stanley D.W. 1990.** Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: Starch structure and composition. *Journal of Food Science*, 55(4): 1054-1059.
- Basaran A., Gocmen D. 2003.** The effects of low mixing temperature on dough rheology and bread properties. *European Food Research and Technology*, 217: 138-142.

- Basman A., Koksel H., Ng P.K.W. 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.
- Batres L.R., White P.J. 1986.** Interaction of amylopectin with monoglycerides in model systems. *J.A.O.C.S.*, 63: 1537-1540.
- Belton P.S., Colquhoun I.J., Grant A., Wellner N. 1995.** FTIR and NMR studies on the hydration of a high-M<sub>r</sub> subunit of glutenin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(2): 74-80.
- Belton P.S. 1999.** On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 29:103-107.
- Belton P.S. 2005.** New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 41: 203-211.
- Beveridge T., Toma S.J., Nakai S. 1974.** Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. *Journal of Food Science*, 39: 49-51.
- 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.A., Wall J.S. 1972.** Wheat gluten subunits: molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 49: 416-430.
- Bietz J.A., Huebner F.R., Sanderson J.E., Wall J.S. 1977.** Wheat gliadin homology revealed through N-terminal amino acid sequence analysis. *Cereal Chemistry*. 54:1070-1083.
- Bietz J.A., Wall J.S. 1980.** Identity of high molecular weight gliadin and ethanol-soluble glutenin subunits of wheat: relation to gluten structure. *Cereal Chemistry*, 57(6): 415-421.
- Bietz J.A. 1983.** Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 255: 219-238.
- Biliaderis C., Maurice T., Vose J. 1980.** Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science*, 45: 1669-1674.
- Biliaderis C.G., Izydorczyk M.S., Rattan O. 1995.** Effect of arabinoxylans on bread-making quality of wheat flours. *Food Chemistry*, 99: 165-171.
- Bloksma, A.H. 1990.** Dough structure, dough rheology, and baking quality. *Cereal Foods World*, 35: 237-244.



- Bollain C., Collar C. 2004.** Dough viscoelastic response of hydrocolloid/enzyme/surfactant blends assessed by uni- and bi-axial extension measurements. *Food Hydrocolloids*, 18: 499-507.
- Bourne M.C. 2002.** Principles of Objective Texture Measurement. En: *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Ed. Bourne M.C. Academic Press (NY, EUA), pp. 107-188.
- Boutte T., Skogerson L. 2004.** Stearoyl-2-lactilates and oleoyl lactilates. En: *Emulsifiers in Food Technology*. Ed. Whitehurst R.J. Blackwell Publishing Ltd. (Londres, Inglaterra), pp. 206-225.
- Bowles L.K. 1996.** Amylolytic enzymes. En: *Baked goods freshness: Technology, evaluation and inhibition of staling*. Eds. Hebeda R.E., Zobel H.F. Marcel Dekker (NY, EUA), pp. 105-129.
- Branland G., Dardevet M. 1985a.** Diversity of grain proteins and bread wheat quality. I. Correlation between gliadins bands and flour quality characteristics. *Journal of Cereal Science*, 3:329-343.
- Branlard G., Dardevet M. 1985b.** Diversity of grain protein and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular subunits of glutenin and flour quality characteristics. *Journal of Cereal Science*, 3:345-354.
- Brandt L. 1996.** Emulsifiers in Baked Goods - Applications. Disponible en: <http://www.foodproductdesign.com/archive/1996/0296AP.html>
- Breyer L.M., Walker C.E. 1983.** Comparative effects of various sucrose fatty acid esters upon bread and cookies. *Journal of Food Science*, 48(3): 955-958.
- CAA. Código Alimentario Argentino. 2004.** Capítulo IX. Alimentos farináceos - Cereales, harinas y derivados. Artículo 661, pág. 10.
- Calderon-Dominguez G., Vera-Dominguez M., Farrera-Rebollo R., Arana-Errasquin R., Mora-Escobedo R. 2004.** Rheological changes of dough and bread quality prepared from a sweet dough: Effect of temperature and mixing time. *International Journal of Food Properties*, 7: 165.174.
- Campbell M.K., Farrell S.O. 2009.** The three-dimensional structure of proteins. En: *Biochemistry*. Eds. Campbell M.K., Farrell S.O. Thomson Brooks/Cole (NY, EUA), pp. 87-122.
- Campbell G.M., Herrero-Sanchez R., Payo-Rodriguez R., Merchan M.L. 2001.** Measurement of dynamic dough density and effect of surfactants and flour type on

- aeration during mixing and gas retention during proofing. *Cereal Chemistry*, 78(3): 272-277.
- Campos D.T., Steffe J.F., NG P.K.W. 1997.** Rheological Behavior of Undeveloped and Developed Wheat Dough. *Cereal Chemistry*, 74(4): 489-494.
- Carey P.R. 1982.** Protein conformation from Raman and Resonance Raman Spectra. En: *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. Eds. Carey P.R. Academic Press (NY, EUA), pp. 71-98.
- Cauvain S.P. 1998.** Improving the control of staling in frozen bakery products. *Trends in Food Science and Technology*, 9(2): 56-61.
- Cauvain S.P. 2003. Bread making. Improving quality.** Ed. Cauvain S.P. CR Press (NY, EUA).
- Champenois Y., Colonna P., Buléon A., Della Valle G., Renault A. 1995.** Starch gelatinization and retrogradation in white pan bread. *Sci. Aliments*, 15: 593-614.
- Cheftel J.C., Cheftel H. 1992.** Los principales sistemas bioquímicos alimentarios - Comportamiento durante los tratamientos. En: *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos*. Eds. Cheftel J.C., Cheftel H. Editorial Acribia (Zaragoza, España), pp. 104-116.
- Choi S.M., Ma C.Y. 2007.** Structural characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) using circular dichroism and Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 102: 150-160.
- Collar C., Armero E., Martínez J. 1998.** Lipid binding of formula bread dough: Relationships with dough and bread technological performance. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 207: 110-121.
- Collar C., Andreu P., Martínez J.C., Armero E. 1999.** Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: A response surface methodology study. *Food Hydrocolloids*, 13: 467-475.
- Cooke D., Gidley M.J. 1992.** Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization – Origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, 227: 103-112.
- Cottrell T., van Peij J. 2004.** Sorbitan esters and polysorbates. En: *Emulsifiers in Food Technology*. Ed. Whitehurst R.J. Blackwell Publishing Ltd. (Londres, Inglaterra), pp. 162-185.

- Courtin C.W., Delcour J.A. 2001.** Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-noextractable arabinoxylan. *Journal of Cereal Science*, 35:301-312.
- Courtin C.W., Gelders G.G., Delcour J.A. 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.
- Cuniberti M., Riberi L. 2003.** Calidad del trigo de la campaña 2003/2004 en la región central del país. [www.inta.gov.ar](http://www.inta.gov.ar)
- Cuniberti M. 2004.** Propuesta de clasificación del trigo argentino. *Ideia XXI*, 6: 16-20.
- Cuniberti M., Riberi L. 2004.** Calidad del trigo de la campaña 2004/2005 en la región central del país. [www.inta.gov.ar](http://www.inta.gov.ar)
- Czuchajowska Z., Pomeranz Y. 1989.** Differential scanning calorimetry, water activity, and moisture content in crumb center and near-crust zones of bread during storage. *Cereal Chemistry*, 66: 305-309.
- D'Ovidio R., Masci S. 2004.** The low molecular weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 39: 321-339.
- Davidou S., LeMeste M., Debever E., Bekaert D. 1996.** A contribution to the study of staling of white bread: Effects of water and hydrocolloid. *Food Hydrocolloids*, 10(4): 375-383.
- De Barros Neto B., Spacino Scarminio I., Bruns R.E. 2007.** Como fazer experimentos. Eds. De Barros Neto B., Spacino Scarminio I., Bruns R.E. Editora Unicamp (Campinas, Brasil), 480 páginas.
- De Stefanis V.A., Ponte J.G., Chung F.H., Ruzza N.A. 1977.** Binding of crumb softeners and dough strengtheners during breadmaking. *Cereal Chemistry*, 54(1): 13-24.
- Defloor I., Delcour J.A. 1999.** Impact of maltodextrins and antistaling enzymes on the differential scanning calorimetry staling endotherm of baked bread dough. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 737-741.
- Dobraszczyk B.J., Morgenstern M.P. 2003.** Rheology and the breadmaking process. *Journal of Cereal Science*, 38: 229-245.
- Dong W., Hosney R.C. 1995.** Effects of certain breadmaking oxidants and reducing agents on dough rheological properties. *Cereal Chemistry*, 72(1): 58-64.
- Donovan J.W. 1969.** Ultraviolet absorption. En: *Physical Principle and Techniques of Proteins Chemistry*. Ed. Donovan J.W. Academic Press (NY, EUA), pp. 101-170.

- Drapron R., Gordon B. 1987.** Role of enzymes in baking. En: *Enzymes and their role in cereal technology*. Eds. Kruger J.E., Lineback D., Stauffer C.E. American Association of Cereal Chemists (MN, EUA), pp. 281-324.
- Dziezak I.D. 1991.** A focus on gums. *Food Technology*, 45(3): 116-129.
- Eerlingen R.C., Delcour J.A. 1995.** Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *Journal of Cereal Science*, 22: 129-138.
- El-Hady E.A.A., El-Samahy S. K., Brümmer J.M. 1999.** Effect of oxidants, Sodium-Stearoyl-2-Lactylate and their mixtures on rheological and baking properties of nonprefermented frozen dough. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32: 446-454.
- Eliasson A.C. 1983.** Differential scanning calorimetry studies on wheat starch-gluten mixtures. II. Effect of gluten and sodium stearoyl lactylate on starch crystallization during ageing of wheat starch gels. *Journal of Cereal Science*, 1: 207-213.
- Eliasson A., Gudmundsson M. 1996.** Starch: Physicochemical and functional aspects. En: *Carbohydrates in Food*. Ed. Eliasson A. Marcel Dekker (NY, EUA), pp.: 431-503.
- Elkassabany M., Hoseney R.C. 1980a.** Ascorbic acid as an oxidant in wheat flour dough. I. Conversion to dehydroascorbic acid. *Cereal Chemistry*, 57: 85-87.
- Elkassabany M., Hoseney R.C. 1980b.** Ascorbic acid as an oxidant in wheat flour dough. II. Rheological effects. *Cereal Chemistry*, 57: 88-91.
- Evans I.D. 1986.** An investigation of starch/surfactant interactions using viscometry and differential scanning calorimetry. *Starch*, 38: 227-235.
- Ewart J.A.D. 1973.** Sodium dodecyl sulfate electrophoresis of wheat gliadins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24: 685-689.
- Farahnaky A., Hill S.E. 2007.** The effect of salt, water and temperature on wheat dough rheology. *Journal of Texture Studies*, 38: 499-510.
- Farvili N., Walker C.E., Qarooni J. 1995.** The effects of protein content of flour and emulsifiers on Tanoor bread quality. *Journal of Cereal Science*, 26: 137-143.
- Ferrari C., Johari G.P. 1997.** Thermodynamic behaviour of gliadins mixture and the glass-softening transition of its dried state. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21: 231-241.
- Ferrer E., Gómez A.V., Añon M.C., Puppo M.C. 2011.** Structural changes in gluten protein structure after addition of emulsifiers. A Raman spectroscopy study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. En prensa, ISSN: 1386-1425.

- Field J.M., Shewry P.R., Mifflin B.J. 1983.** Solubilization and characterization of wheat gluten proteins: correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(4): 370-377.
- Fleury F., Ianoul A., Berjot M., Feofanov A., Alix A.J.P., Nabiev I. 1997.** Camphotecin-binding site in human serum albumin and protein transformations induced by drug binding. *FEBS Letters*, 411: 215-220.
- Gan Z., Ellis P.R., Schofield J.D. 1995.** Mini review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, 21: 215-230.
- Gaupp R., Adams W. 2004.** Di-acetyltartaric esters of monoglycerides (DATEM) and associated emulsifiers in bread making. En: *Emulsifiers in Food Technology*. Ed. Whitehurst R.J. Blackwell Publishing Ltd. (Londres, Inglaterra), pp. 86-109.
- Georget D.M.R., Belton P.S. 2006.** Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 7: 469-475.
- Gerrard J.A., Fayle S.E., Wilson A.J., Newberry M.P., Ross M., Kavale S. 1998.** Dough properties and crumb strength as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63: 472-475.
- Ghiasi K., Hoseney R.C., Varriano-Marston E. 1982.** Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. *Cereal Chemistry*, 60(1): 58-61.
- Gianibelli M.C., Larroque O.R., Macritchie F., Wrigley C.W. 2001.** Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat endosperm proteins. AACC, Inc. Disponible en <http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/freearticle/gianibelli.pdf>
- Gilbert S.M., Wellner N., Belton P.S., Greenfield J.A., Siligardi G., Shewry P.R., Tatham A.S. 2000.** Expression and characterisation of a highly repetitive peptide derived from a wheat seed storage protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1479: 135-146.
- Goldsbrough A.P., Bulleid N.J., Freedman R.B., Flavell R.B. 1989.** Conformational differences between two wheat HMW-glutenin subunits are due to a short region containing six amino acid differences. *Biochemical Journal*, 263: 837-842.
- Gómez M., Del Real S., Rossell C.M., Ronda F., Blanco C.A., Caballero C.A. 2004.** Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread quality. *European Food Research and Technology*, 219(2): 145-150.
- Gómez-Pallarés M., León A.E. y Rosell C.M. 2007.** Trigo. En: *De tales harinas, tales panes*. Eds. León A.E., Rosell C.M. (Córdoba, Argentina), pp. 17-72.

- Goñi I., García-Alonso A., Saura-Calixto F. 1997.** A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17: 427-437.
- Gray J.A., Bemiller J.N. 2003.** Bread Staling: Molecular Basis and Control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:1-21.
- Greenwood C.T. 1976.** Starch. En: *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol I. Ed. Pomeranz Y. The American Association of Cereal Chemists (MN, EUA), pp. 119-151.
- Guan X., Yao H. 2008.** Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106: 345-351.
- Guarda A., Rosell C.M., Benedito C., Galotto M.J. 2004.** Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. *Food Hydrocolloids*, 18: 241-247.
- Gupta R.B., Shepherd K.W., MacRitchie F. 1991.** Genetic control and biochemical properties of some high molecular weight albumins in bread wheat. *Journal of Cereal Science*, 13: 221-235.
- Gupta R.B., Masci S., Lafiandra D., Bariana H.S., MacRitchie F. 1996.** Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheat. *Journal of Experimental Botany*, 47: 1377-1385.
- Gupta R., Gigras P., Mohaparta H., Goswami V.K., Chauhan B. 2003.** Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 0: 1-18.
- Halford N.G., Field J.M., Blair H., Urwin P., Moore K., Robert L., Thompson R., Flavell R.B., Tatham A.S., Shewry P.R. 2002.** Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome-1 A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(3): 373-378.
- Hamauzu Z., Toyomazu T., Yonezawa D. 1974.** Molecular weight determination of gliadin fractions in gel filtration by SDS-PAGE and sedimentation equilibrium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38: 2445-2450.
- Hanft F., Koehler P. 2006.** Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(11): 1699-1704.
- Haros M., Rosell C.M., Benedito de Barber C. 2002.** Improvement of flour quality through carbohydrases treatment during wheat tempering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4126-4130.
- Hassan B.H., Alhamdan A.M., Elansari A.M. 2005.** Stress relaxation of dates at khalal and rutab stages of maturity. *Journal of Food Engineering*, 66: 439-445.

- Hassan A.G., Azizi M.H., Barzegar M., Ameri M.A. 2006.** Effect of selected hydrocolloids on bread staling as evaluated by DSC and XRD. *Journal of Food Technology*, 4(3): 185-188.
- Hay R.L. 1993.** Effect of flour quality characteristics on puff pastry baking performance. *Cereal Chemistry*, 70: 392-396.
- Hayakawa K., Tanaka K., Nakamura T., Endo S., Hoshino T. 1997.** Quality characteristics of waxy hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): Properties of starch gelatinization and retrogradation. *Cereal Chemistry*, 74(5): 576-580.
- He H., Hoseney R.C. 1990.** Changes in bread firmness and moisture during long term storage. *Cereal Chemistry*, 67: 603-605.
- Hoseney R.C. 1984.** Functional properties of pentosans in baked foods. *Food Technology*, 38: 114-117.
- Howel N.K., Arteaga G., Nakai S., Li-Chan E.C.Y. 1999.** Raman spectral analysis in the C-H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 924-933.
- Huang D.Y., Khan K. 1997.** Characterization and quantification of native glutenin aggregates by multistacking sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedures. *Cereal Chemistry*, 74: 229-234.
- Huebner F.R., Wall J.S. 1976.** Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. *Cereal Chemistry*, 53: 258-269.
- Huebner F.R., Kaczkowski J., Bietz J.A. 1990.** Quantitative variation of wheat proteins from grain at different stages of maturity and from different spike locations. *Cereal Chemistry*, 67: 464-470.
- Huebner F.R., Gaines C.S. 1992.** Relationship between wheat kernel hardness, environment, and gliadin composition. *Cereal Chemistry*, 69: 148-151.
- Huebner F.R., Nelsen T.C., Bietz J.A. 1995.** Differences among gliadins from Spring and Winter wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 72: 341-343.
- Hug-Iten S., Handschin S., Conde-Petit B., Escher F. 1999.** Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 5: 255-260.
- Hung P.V., Morita N. 2004.** Dough properties and bread quality of flour supplemented with cross-linked cornstarches. *Food Research International*, 37: 461-467.

- Hung P.V., Yamamori M., Morita N. 2005.** Formation of enzyme-resistant starch in bread as affected by high-amylose wheat flour substitutions. *Cereal Chemistry*, 82(6): 690-694.
- Imberty A., Buleon A. Tran V., Pérez S. 1991.** Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch*, 43(10): 375-384.
- Indrani D., Rao G.V. 2003.** Influence of surfactants on rheological characteristics of dough and quality of parotta. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 47-54.
- Indrani D., Rao G.V. 2007.** Rheological characteristics of wheat flour dough as influenced by ingredients of parotta. *Journal of Food Engineering*, 79: 100-105.
- Indrani D., Manohar R.S., Rajiv J., Rao G.V. 2007.** Alveograph as a tool to assess the quality characteristics of wheat flour for parotta making. *Journal of Food Engineering*, 78: 1202-1206.
- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. 2001.** Método 15851.
- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. 2000.** Método 15855.
- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. 1995.** Métodos 15857 y 15864.
- Internacional Standard Organization. 1991.** Method 5530-4.
- Jackel S.S. 1969. Fermentation flavours of white bread. *Bakers' Dig*, 43(5):
- Jackson E.A., Holt L.M., Payne P.I. 1983.** Characterization of high molecular weight gliadin and low molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two dimensional electrophoresis and chromosomal localization of their controlling genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 66: 29-37.
- Jane J. 2004.** Starch: Structure and Properties. En: *Chemical and functional properties of food saccharides*. Ed. Tomasik P. CRC Press (FL, EUA), pp. 81-101.
- Jeffrey G.A., Saenger W. 1994.** Hydrogen bonding in biological structures. Springer-Verlag (Berlin, Alemania), pp. 111-116.
- Jeffries T.W. 1996.** Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Current Opinions in Biotechnology*, 7: 337-342.
- Joensson T., Toernaes H. 1987.** The effect of selected surfactants on bread crumb softness and its measurements. *Cereal Foods World*, 32: 482-485.
- Joshi R., Brimelow, C.J.B. 2002.** Colour measurement of foods by colour reflectance. En: *Colour in Food; Improving Quality*. Ed. MacDougall D.B. CRC Press (Boca Raton, EUA), pp. 82-114.



- Jovanovich G. 1997.** Estudio de las interacciones entre almidón y lípidos en harina de trigo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Kalichevsky M.T., Jaroszkiewicz E.M., Blanshard J.M.V. 1992.** Glass transition of gluten. 2: The effect of lipids and emulsifiers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14: 267-273.
- Kamel B., Ponte J. 1993.** Emulsifiers in backing. En: *Advances in Baking Technology*. Eds. Kamel B.S., Stauffer C.E. Blackie Academic & Professional (NY, EUA), pp. 179-222.
- Karim A.A., Norziah M.H., Seow C.C. 2000.** Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chemistry*, 71: 9-36.
- Kasarda D.D., Autran J.C., Lew E.J., Nimmo C.C., Shewry P.R. 1983.** N-terminal aminoacid sequences of w-gliadins and w-secalins. Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 747: 138-150.
- Kawka A., Ng P.K.W., Bushuk W. 1992.** Equivalence of High Molecular Weight Glutenin subunits prepared by Reversed-Phase-High-Performance Liquid Chromatography and Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel Electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 69(1): 92-96.
- Kenny S., Wehrle K., Dennehy T., Arendt E.K. 1999.** Correlations between empirical and fundamental rheology measurements and baking performance of frozen bread dough. *Cereal Chemistry*, 76: 421-425.
- Kent N. L. 1975.** Technology of cereals: with special reference to wheat. Pergamon Press (Oxford, Inglaterra), 306 páginas.
- Keetels C.J.A.M., van Vliet T., Jurgens A., Walstra P. 1996.** Effects of lipid surfactants on the structure and mechanics of concentrated starch gels and starch bread. *Journal of Cereal Science*, 24: 33-45.
- Khatkar B.S., Fido R.J., Tatham A.S., Schofield J.D. 2002a.** Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. *Journal of Cereal Science*, 35(3): 299-306.
- Khatkar B.S., Fido R.J., Tatham A.S., Schofield J.D. 2002b.** Functional properties of wheat gliadins. II. Effects on dynamic rheological properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 35(3): 307-313.
- Kim S.K., D' Appolonia B.L. 1977.** Bread staling studies. III. Effects of pentosans on dough, bread and bread staling rate. *Cereal Chemistry*, 54: 225-229.

- Kitagawa T., Azuma T., Hamaguchi K. 1979.** The Raman spectra of Bence-Jones proteins. Disulfide stretching frequencies and dependence of Raman intensity of tryptophan residues on their environments. *Biopolymers*, 18: 451-465.
- Knightly W.H. 1996.** Surfactants. En: *Baked goods freshness: Technology, evaluation and inhibition of staling*. Eds. Hebeda R.E., Zobel H.F. Marcel Dekker (NY, EUA), pp. 65-103.
- Koehler P. 2003.** Concentrations of Low and High Molecular Weight Thiols in Wheat Dough As Affected by Different Concentrations of Ascorbic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17): 4948-4953.
- Köhler P. 2001.** Study of the effects of DATEM. 3: Synthesis and characterization of DATEM components. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 34: 359-366.
- Koocheki A., Mortazavi S.A., Mahalati M.N., Karimi M. 2009.** Effect of emulsifiers and fungal  $\alpha$ -amylase on rheological characteristics of wheat dough and quality of flat bread. *Journal of Food Process Engineering*, 32(2): 187-205.
- Krog N. 1981.** Theoretical aspects of surfactants in relation to their use in breadmaking. *Cereal Chemistry*, 58: 158-164.
- Krog N., Olesen S.K., Toernaes H., Joensson T. 1989.** Retrogradation of the starch fraction in wheat bread. *Cereal Foods World*, 34: 281-285.
- Krueger B.R., Knutson C.A., Inglett G.E., Walker C.E. 1987.** A differential scanning calorimetry study on the effects of annealing on gelatinization behaviour of corn starch. *Journal of Food Science*, 52: 715-718.
- Kruger J.E., Marchylo B.A., Hatcher D. 1988.** Preliminary assessment of a sequential extraction scheme for evaluating quality by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography and electrophoretic analysis of gliadins and glutenins. *Cereal Chemistry*, 65: 208-214.
- Kruger J.E., Marchylo B.A. 1990.** Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography of changes in high molecular weight subunit composition of wheat storage proteins during germination. *Cereal Chemistry*, 67(2): 141-147.
- Kugimiya M., Donovan J.W., Wong R.Y. 1980.** Phase transition of amylose-lipid complexes in starches: a calorimetric study. *Starch*, 32: 265-270.
- Lafiandra D., D'Ovidio R., Porceddu E., Margiotta B., Colaprico G. 1993.** New data supporting high Mr glutenin subunit 5 as the determinant of quality differences among the pairs 5 + 10 vs 2 + 12. *Journal of Cereal Science*, 18: 197-205.

- Lakshminarayan S.M., Rathinam V., KrishnaRau L. 2006.** Effect of maltodextrin and emulsifiers on the viscosity of cake batter and on the quality of cakes. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 86(5): 706-712.
- 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., Desserme C., Lefebvre J. 2000.** Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 77: 121-127.
- Launay B. 1990.** A simplified nonlinear model for describing the viscoelastic properties of wheat flour dough at high shear strain. *Cereal Chemistry*, 67(1): 25-31.
- Lazaridou A., Duta D., Papageorgiou M., Belc N., Biliaderis C.G. 2007.** Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79: 1033-1047.
- Leblanc N., Saiah R., Beucher E., Gattin R., Castandet M., Saiter J.M. 2008.** Structural investigation and thermal stability of new extruded wheat flour based polymeric materials. *Carbohydrate Polymers*, 73: 548-557.
- LeMeste M., Huang V.T., Panama J., Anderson G., Lentz R. 1992.** Glass transition of bread. *Cereal Foods World*, 37:264-267.
- León A.E., Duran E., Benedito de Barber C. 1997.** A new approach to study starch changes occurring in the dough-baking process and during bread storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 204: 316-320.
- León A., Ribotta P., Ausar S., Fernandez C., Landa C., Beltramo D. 2000.** Interactions of different carrageenan isoforms and flour components in breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2634-2638.
- Leonhardt G.F. 1999.** Fabricação de pães. Escola de Engenharia Mauá (Brasil).
- Létang C., Piau M., Verdier C. 1999.** Characterization of wheat flour-water dough. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 41: 121-132.
- Levine H., Slade L. 1987.** Water as a plasticizer: Physicochemical aspects of low-moisture polymeric systems. En: *Water Science Reviews*. Cambridge University Press (Cambridge, Inglaterra), pp. 79-185.
- Li-Chan E.C.Y., Nakai S., Hirotsuka M. 1994.** Raman spectroscopy as a probe of protein structure in foods systems. En: *Protein Structure-Function Relationships in Food*. Eds. Yada R.Y., Jackson R.L., Smith L.L. Blackie Academic London (Londres, Inglaterra), pp. 163-197.

- Li W., Dobraszczyk B.J., Schofield J.D. 2003.** Stress relaxation behaviour of wheat dough, gluten, and gluten protein fractions. *Cereal Chemistry*, 80(3): 333-338.
- Lima I., Singh R.P. 2001.** Viscoelastic behaviour of fried potato crust. *Journal of Texture Studies*, 32: 131-141.
- Linlaud N.E., Puppo M.C., Ferrero C. 2009.** Effect of hydrocolloids on water absorption of wheat flour and farinograph and textural characteristics of dough. *Cereal Chemistry*, 86(4): 376-382.
- Lookhart G.L., Albers L.D. 1988.** Correlation between reversed-phase high-performance liquid chromatography and acid- and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic data on prolamins from wheat sister lines differing widely in baking quality. *Cereal Chemistry*, 65: 222-227.
- Lookhart G.L., Bean S.R., Bietz J.A. 2003.** HPLC of Gluten Monomeric Proteins. En: *Wheat gluten protein analysis*. Eds. Shewry P.R., Lookhart G.L. American Association of Cereal Chemists (MN, EUA), pp. 61-90.
- Lundqvist H., Eliasson A.C., Olofsson G. 2002a.** Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) to starch polysaccharides. Part I. Surface tension measurements. *Carbohydrate Polymers*, 49: 43-55.
- Lundqvist H., Eliasson A.C., Olofsson G. 2002b.** Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part II. Calorimetric study. *Carbohydrate Polymers*, 49: 109-120.
- Ma C.Y. 1990.** Thermal analysis of vegetable proteins and vegetable proteins-based food products. En: *Thermal analysis of food*. Eds. Harwalkar V.R., Ma C.Y. Elsevier Science (NY, EUA), pp 149-167.
- Ma C.Y., Manoj K.R., Wing-Man C., Phillips D.L. 2000.** Raman spectroscopic study of oat globulin conformation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 1542-1547.
- Ma C.Y., Phillips D.L. 2002.** FT-Raman spectroscopy and its applications in cereal science. *Cereal Chemistry*, 79(2): 171-177.
- Maier H., Anderson M., Karl C., Magnuson K. 1993.** Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. En: *Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives*. Eds. Whistler R.L., BeMiller J.N. Academic Press (NY, EUA), pp. 187-205.
- Malakei M., Vetter J.L., Hoover W.J. 1981.** The effect of emulsifiers, sugar, shortening, and soya flour on the staling of barbari flat bread. *Journal of Science Food and Agriculture*, 32: 1209-1211.

- Maloney D.H., Foy J.J. 2003.** Yeast fermentations. En: *Handbook of dough fermentations*. Eds. Kulp K., Lorenz K. Marcel Dekker Inc. (NY, EUA), capítulo 3.
- Mandala I., Karabela E., Kostaropoulos A. 2007.** Physical properties of breads containing hydrocolloids stored at low temperature. I. Effect of chilling. *Food Hydrocolloids*, 21: 1397-1406.
- Manohar R.S., Rao P.H. 1999.** Effect of emulsifiers, fat level and type on the rheological characteristics of biscuit Dough and quality of biscuits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(10): 1223-1231.
- Masci S., Lafiandra D., Porceddu E., Lew E.J.L., Tao H.P., Kasarda D.D. 1993.** D glutenin subunits: N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. *Cereal Chemistry*, 70: 581-585.
- Masci S., Egorov T.A., Ronchi C., Kuzmicky D.D., Kasarda D.D., Lafiandra D. 1999.** Evidence for the presence of only one cysteine residue in the D-type low molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 29: 17-25.
- Matsuda L.Y. 2007.** Concentração de amido resistente em pão francês pré-assado congelado: aspectos tecnológicos. Tesis Maestria. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (SP, Brasil), 111 páginas.
- McCarthy D.F., Gallagher E., Gormley T.R., Schober T.J., Arendt E.K. 2005.** Application of response surface methodology in the development of gluten-free bread. *Cereal Chemistry*, 82: 609-615.
- Mackenzie J.K. 1950.** The elastic constants of a solid containing spherical holes. *Proceedings of the Physical Society*, 63B: 2-11.
- Micard V., Gilbert S. 2000.** Thermal behavior of native and hydrolysed wheat gluten, gliadin, and glutenin-rich fractions by modulated DSC. *International Journal of Macromolecules*, 27: 229-236.
- Michniewicz J., Biliaderis C.G., Bushuk W. 1991.** Effect of added pentosans on some properties of wheat bread. *Food Chemistry*, 43: 251-257.
- Miles M.J., Morris V.J., Orford P.D., Ring S.G. 1985.** The roles of amylose and amylopectin in the gelatinization and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135: 271-281.
- Min B.C., Yoon S.H., Kim J.W., Lee Y.W., Kim Y.B., Park K.H. 1998.** Cloning of novel maltooligosaccharide-producing amylases as antistaling agents for bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 779-782.

- Moore W.R., Hoseney R.C. 1985.** The leavening of bread dough. *Cereal of Foods Words*, 30(11): 791-792.
- Morad M.M., D'Appolonia B.L. 1980.** Effect of surfactants and baking procedure on total water-soluble starch in bread crumb. *Cereal Chemistry*, 57: 141-144.
- Morita N., Maeda T., Miyazaki M., Yamamori M., Miura H., Ohtsuka I. 2002.** Dough and baking properties of high-amylose and waxy wheat flours. *Cereal Chemistry*, 79(4): 491-495.
- Müller S., Vensel W.H., Kasarda D.D., Köhler P., Wieser H. 1998.** Disulphide bonds of adjacent cysteine residues in low molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 27: 109-116.
- Murayama K., Tomida M. 2004.** Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 43: 11526-11532.
- National Starch. 2005.** Natural Hi-maize, the 5-in-1 Fiber: 5 key health benefits in 1 easy-to-use ingredient. Material técnico suministrado por la empresa.
- Nemeth T.H., Paulley F.G., Preston K.R. 1996.** Effects of ingredients and processing conditions on the frozen dough bread quality of a Canada Western Red Spring wheat flour during prolonged storage. *Food Research International*, 29(7): 609-616.
- Neukom H., Kuendig W. 1962.** Effect of chlorine dioxide treatment on the water-soluble pentosans in wheat flour. *Chemistry and Industry*, 28: 779-780.
- Nielson P.M. 1995.** Reaction and potential industrial applications of transglutaminase – review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9: 119-156.
- Noel T.R., Parker R., Ring S.G., Tatham A.S. 1995.** The glass-transition behaviour of wheat gluten proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(2): 81-85.
- Nugent A.P. 2005.** Health properties of resistant starch. British Nutrition Foundation. *Nutrition Bulletin*, 30: 27-54.
- Osborne T.B. 1907.** The proteins of the wheat kernel. Carnegie Inst. Washington (Washington D.C., EUA), 84: 1-119.
- Ottenhof M.A., Farhat I.A. 2004.** The effect of gluten on retrogradation of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 40: 269-274.
- Payne P.I., Corfield K.G. 1979.** Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta*, 145: 83-88.

- Payne P.I., Law C.N., Mudd E.E. 1980.** Control of homoelogenous group 1 chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, 58: 113-120.
- Payne P.I. 1986.** Endosperm proteins. En: *Plant Gene Research: a Genetic approach to Plant Biochemistry*. Eds. Blenstein A.D., King P.J. Springer (NY, EUA), pp. 207-301.
- Piazza L., Masi P. 1995.** Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chemistry*, 72:320-325.
- Phillips D.L., Xing J., Liu H.J., Pan D.H., Corke H. 1999.** Potential use of Raman spectroscopy for determination of amylose content in maize starch. *Cereal Chemistry*, 76: 821-823.
- Piazza L., Masi P. 1995.** Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chemistry*, 72(3): 320-325.
- Pisesookbunterng W., D' Appolonia B.L. 1983.** Bread Staling Studies I. Effect of surfactants on moisture migration from crumb to crust and firmness values of bread crumb. *Cereal Chemistry*, 60(4): 298-300.
- Pommet M., Redl A., Morel M.H., Guilbert S. 2003.** Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44: 115-122.
- Ponzio N.R., Puppo M.C., Ferrero C. 2008.** Mixtures of two Argentinian wheat cultivars of different quality: A study on breadmaking performance. *Cereal Chemistry*, 85(5): 579-585.
- 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.
- Prabhasankar P., Indrani D., Rajiv J., Rao G.V. 2003.** Scanning electron microscopy and electrophoretic studies of the baking process of south Indian parotta - an unleavened flat bread. *Food Chemistry*, 82: 603-609.
- Primo-Martin C., van Nieuwenhuijzen N.H., Hamer R.J., van Vliet T. 2007.** Crystallinity changes in wheat starch during the bread making process: Starch crystallinity in the bread crust. *Journal of Cereal Science*, 45: 219-226.
- Puppo M.C., Calvelo A., Añón M.C. 2005.** Physicochemical and rheological characterization of wheat flour dough. *Cereal Chemistry*, 82(2): 173-181.

- Queiroz-Monici K.S., Costa G.E.A., Silva N., Reis S.M.P.M., Oliveira A.C. 2005.** Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*, 21: 602-608.
- Rabilloud T., Chevallet M. 2000.** Solubilization of proteins in 2D electrophoresis. En: *Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Ed. Rabilloud T. Springer (NY, EUA), pp. 9-30.
- Rao P.A., Nussinovitch A., Chinachoti P. 1992.** Effects of selected surfactants on amylopectin recrystallization and on recoverability of bread crumb during storage. *Cereal Chemistry*, 69(6): 613-618.
- Ratnayake W.S., Jackson D.S. 2007.** A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers*, 67: 511-529.
- Ravi R., Sai Manohar R., Haridas Rao. 2000.** Influence of additives on the rheological characteristics and baking quality of wheat flours. *European Food Research and Technology*, 210 :202–208.
- Ribotta P., León A., Añón M.C. 2001.** Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 913-918.
- Ribotta P., Pérez G.T., León A., Añón M.C. 2004.** Effect of emulsifier and guar gum on micro structural, rheological and baking performance of frozen bread dough. *Food Hydrocolloids*, 18: 305-313.
- Rodríguez-Sandoval E., Fernández-Quintero A., Alaya-Aponte A. 2005.** Reología y textura de masas: aplicaciones en trigo y maíz. *Ingeniería e Investigación*, 57: 72-78.
- Rodríguez-Sandoval E., Fernández-Quintero A., Cuvelier G. 2009.** Stress relaxation of reconstituted cassava dough. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 202-206.
- Rogers D.E., Zeleznak K.J., Lai C.S., Hosney R.C. 1988.** Effect of native lipids, shortening, and bread moisture on bread firming. *Cereal Chemistry*, 65: 398-401.
- Rojas J.A., Rosell C.M., Benedito de Barber C., Pérez-Munuera I., Lluch M.A. 2000.** The baking process of wheat rolls followed by cryo scanning electron microscopy. *European Food Research and Technology*, 212: 57–63.
- Romeu C.C., Tadini C.C. y Matuda T.G. 2006.** Influência do congelamento na estrutura da massa do pão francês. *PIC-EPUSP*, 3: 1816-1845.
- Rosell C.M., Haros M., Escrivá C., Benedito de Barber C. 2001a.** Experimental approach to optimize the use of  $\alpha$ -amylases in breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2973-2977.



- Rosell C.M., Rojas J.A., Benedito de Barber C. 2001b.** Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 15: 75-81.
- Rosell C.M., Wang J., Aja S., Bean S., lookhart G. 2003.** Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chemistry*, 80: 52-55.
- Rosin P.M., Lajolo F.M., Menezes E.W. 2002.** Measurement and characterization of dietary starches. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 367-377.
- Rusch D.T. 1981.** Emulsifiers: uses in cereal and bakery foods. *Cereal Foods World*, 26: 111-115.
- Russell P.L. 1983.** A kinetic study of bread staling by differential scanning calorimetry and compressibility measurements. The effect of added monoglyceride. *Journal of Cereal Science*, 1: 297-303.
- Safari-Ardi M., Phan-Thien N. 1998.** Stress relaxation and oscillatory tests to distinguish between doughs prepared from wheat flours of different varietal origin. *Cereal Chemistry*, 75(1): 80-84.
- SAGPyA. 2008.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. [www.alimentosargentinos.gov.ar](http://www.alimentosargentinos.gov.ar)
- Sajilata M.G., Singhal R.S., Kulkari P.R. 2006.** Resistant Starch – A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 1-17.
- Sapirstein H., Roller R., Bushuk W. 1994.** Instrumental measurement of bread crum grain by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 71: 383-391.
- Sartor G., Johari G.P. 1996.** Polymerization of a vegetable protein, wheat gluten, and the glass softening transition of its dry and reacted state. *Journal of Physical Chemistry*, 100: 19692-19701.
- Schiraldi A., Piazza L., Riva M. 1996.** Bread staling: A calorimetric approach. *Cereal Chemistry*, 73(1): 32-39.
- Schiraldi A., Fessas D. 2001.** Mechanism of staling: An overview. En: *Bread staling*. Eds. Chinachoti P., Vodovotz Y. CRC Press (FL, EUA), pp. 1-17.
- Schofield J.D., Booth M.R. 1983.** Wheat proteins and their technological significance. En: *Developments in Food Proteins*. Vol. 2. Applied Science Publishers (Londres, Inglaterra), pp. 1-65.
- Schrader B., Hoffman A., Simon A., Sawatzki J. 1991.** Can a Raman renaissance be expected via the near-infrared Fourier transform technique? *Vibrational Spectroscopy*, 1: 239-250.

- 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.
- Seilmeier W., Wieser H. 2003.** Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. *European Food Research and Technology*, 217: 360-364.
- Selomulyo V.O., Zhou W. 2007.** Frozen bread dough: Effect of freezing storage and dough improvers. *Journal of Cereal Science*, 45(1): 1-17.
- Sgarbieri V.C. y Pacheco M.T.B. 1999.** Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2: 7-19.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M., Mifflin B.J. 1986.** The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of the Cereal Science*, 4: 97-106.
- Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. 1992.** High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 15(5): 105-120.
- Shewry P.R., Tatham A.S. 1997a.** Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, 25: 207-227.
- Shewry P.R., Tatham A.S. 1997b.** Biotechnology of wheat quality. *Journal of Science and Food Agriculture*, 73: 397-406.
- Shewry P.R., Popineau Y., Lafiandra D., Belton P. 2001.** Wheat glutenin subunits and dough elasticity: finding of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 433-441.
- Shewry P.R., Halford N.G., Belton P.S., Tatham A.S. 2002.** The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 357: 133-142.
- Shewry P.R., Lookhart G.L. 2003.** Electrophoresis of wheat gluten proteins. En: *Wheat gluten protein analysis*. Eds. Shewry P.R., Lookhart G.L. American Association of Cereal Chemists (MI, EUA), pp. 31-60.
- Shiau S.Y. 2004.** Effects of emulsifiers on dough rheological properties and the texture of extruded noodles. *Journal of Texture Studies*, 35: 93-110.
- Shibanuma Y., Takeda Y., Hizukuri S. 1994.** Molecular structures of some wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, 25(2): 111-116.
- Shiu S.Y., Yeh A.I. 2001.** Effects of alkali and acid on dough rheological properties and characteristics of extruded noodles. *Journal of Cereal Science*, 33: 27-37.

- Singh N.K., Donovan G.R., Batey I.L., MacRitchie F. 1990.** Use of sonication and size-exclusion High-Performance Liquid Chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Distribution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chemistry*, 67(2): 150-161.
- Singh N.K., MacRitchie F. 2001.** Use of sonication to probe wheat gluten structure. *Cereal Chemistry*, 78(5): 526-529.
- SMS, Stable Micro Systems. 1995.** TA-XT2i application study, extensibility of dough and measure of gluten quality. Texture expert guide contents.
- Spies, R. 1990.** Application of rheology in the bread industry. En: *Dough Rheology and Baked Product Texture*. Eds. Faridi H., Faubion J.M. AVI-Van Nostrand Reinhold (NY, EUA), pp. 343-361.
- Stampfli L., Nersten B. 1995.** Emulsifiers in breadmaking. *Food Chemistry*, 52(4): 353-360.
- Stauffer C.E. 1990.** Emulsifiers and Dough Strengtheners. En: *Functional Additives for Bakery Foods*. Ed. Stauffer C.E. AVI-Van Nostrand Reinhold (NY, EUA), pp. 69-124.
- Steffe J.F. 1996 a.** Introduction to rheology. En: *Rheological methods in food process engineering*. Ed. Steffe J.F. Freeman Press (MI, EUA), pp. 1-93.
- Steffe J.F. 1996 b.** Viscoelasticity. En: *Rheological methods in food process engineering*. Ed. Steffe J.F. Freeman Press (MI, EUA), pp. 294-349.
- Tamstorf S., Jonsson T., Krog N. 1986.** The role of fats and emulsifiers in baked products En: *Chemistry and physics of baking*. Eds: Blanshard J., Galliard T. The Royal Society of Chemistry (Bristol, Inglaterra), pp. 75-88.
- Tan J., Zhang H., Gao X. 1997.** SEM image processing for food structure analysis. *Journal of Texture Studies*, 28: 657-672.
- Tatham A.S., Shewry P.R. 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 A.S., Shewry P.R., Belton P.S. 1990.** Structural studies of cereal prolamins, including wheat gluten. En: *Advances in cereal science and technology*. Vol. X. Ed. Pomeranz Y. AACC (MN, EUA), pp. 1-78.
- Tatham A.S., Shewry P.R. 1995.** Mini Review. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *Journal of Cereal Science*, 22: 1-16.
- Tenney R.J. 1978.** Dough conditioners/bread softeners-the surfactants used in breadmaking. *Bakers´ Dig.*, 52: 24-27.

- Thomson N.H., Miles M.J., Popineau Y., Harries J., Shewry P., Tatham A.S. 1999.** Small angle X-ray scattering of wheat seed storage proteins:  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -gliadins and the high molecular weight (HMW) subunits of glutenins. *Biochimica et Biophysica 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.
- Toufeili I., Habbal Y., Shadarevian S., Olabi A. 1999.** Substitution of wheat starch with nonwheat starches and cross-linked waxy barley starch affects sensory properties and staling of Arabic bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1855-1860.
- Toufeili I., Lambert I. A., Kokini J. L. 2002.** Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of gluten: development of a preliminary state diagram. *Cereal Chemistry*, 79(1): 138-142.
- Toufeili I., Kokini J. L. 2004.** Glass transition behavior and rheological properties of surfactants and gluten-surfactant mixtures. *Cereal Chemistry*, 81(5): 5832-588.
- Tsen C.C. 1963.** The reaction mechanisms of azodicarboxamide in dough. *Cereal Chemistry*, 40: 638-647.
- Tsen C.C. 1964.** Comparative study of reactions of iodate, azodicarboxamide, and acetone peroxides in simple chemical systems and in dough. *Cereal Chemistry*, 41: 22-31.
- Tsen C.C. 1965.** The improving mechanism of ascorbic acid. *Cereal Chemistry*, 42: 86-97.
- Tsen C.C. 1969.** Effects of oxidizing and reducing agents on changes of flour proteins during mixing. *Cereal Chemistry*, 46: 435-442.
- Tsen C.C., Weber J. 1981.** Dough properties and proof times of yeasted doughs affected by surfactants. *Cereal Chemistry*, 58(3): 180-181.
- Tu A.T. 1982.** Proteins. En: *Raman Spectroscopy in Biology; Principles and Applications*. Ed. Tu A.T. John Wiley and Sons Eds. Inc. (NY, EUA), pp. 65-116.
- Tu A.T. 1986.** Peptide backbone conformation and microenvironment of protein side chains. En: *Spectroscopy of biological systems*. Ed. Tu A.T. Wiley-Interscience (NY, EUA), pp. 47-112.

- VanDijk A.A., VanWijk L.L., VanVliet A., Haris P., VanSwieten E., Tesser G.I., Robillard G.T. 1997a.** Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins. 1. Model studies using cyclic and linear peptides. *Protein Science*, 6(3): 637-648.
- VanDijk A.A., VanWijk L.L., VanVliet A., Haris P., VanSwieten E., Tesser G.I., Robillard G.T. 1997b.** Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins. 2. Characterization in solution and in the dry state. *Protein Science*, 6(3): 649-656.
- Vodovotz Y., Hallberg L., Chinachoti P. 1996.** Effect of aging and drying on thermomechanical properties of white bread as characterized by Dynamic Mechanical Analysis (DMA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). *Cereal Chemistry*, 73: 264-270.
- Wang F.C., Sun X.S. 2002.** Frequency dependence of viscoelastic properties of bread crumb and relation to bread staling. *Cereal Chemistry*, 79(1): 108-114.
- Wang J., Rosell C.M., Benedito de Barber C. 2002.** Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*, 79: 221-226.
- Warren W.E., Kraynik A.M. 1997.** Linear elastic behavior of a low-density Kelvin foam with open cells. *Journal of Applied Mechanics*, 64: 787-794.
- Waszczyński N., Wille G.M.F.C., Protzek E.C., De Freitas R.J.S. y Penteado P.T.P.S. 2001.** Tecnologia para obtenção de fibras alimentares a partir de matérias primas regionais. Experiência do Brasil. En: *Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos*. Varela (SP, Brasil), pp. 237-243.
- Wellner N., Mills E.N.C., Brownsey G., Wilson R.H., Brown N., Freeman J., Halford N.G., Shewry P.R., Belton P.S. 2005.** Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by Dynamic Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6: 255-261.
- Whistler R.L., Daniel J.R. 1984.** Molecular structure of starch. En: *Starch: Chemistry and Technology*. Eds. Whistler R.L., Bemiller J.N., Paschal E.F. Academic Press (NY, EUA), pp. 153-182.
- Whistler R.L. y Daniel J.R. 1993.** Carbohidratos. En: *Química de los Alimentos*. Ed. Fennema O.R. Editorial Acribia (Zaragoza, España), pp.: 81-156.
- Whitehurst R.J. 2004.** Emulsifiers in Food Technology. Ed. Whitehurst R.J. Blackwell Publishing Ltd. (Londres, Inglaterra), 247 páginas.

- Wieser H. 2007.** Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24: 115-119.
- Wikström K., Eliasson A.C. 1998.** Effects of enzymes and oxidizing agents on shear stress relaxation of wheat flour dough: addition of protease, glucose oxidase, ascorbic acid, and potassium bromate. *Cereal Chemistry*, 75(3): 331-337.
- Woychik J.H., Boundy J.A., Dimler R.J. 1961.** Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 94: 477-482.
- Wrigley C.W., Bekes F. 2002.** Grain-protein composition as a document of wheat-quality type: new approaches to varietal identification. En: *Wheat quality elucidation. The Bushuk legacy*. Eds. Ng P.K.W., Wrigley C.W. AACC (MI, EUA), pp. 65-86.
- Xiujin Z., Jinquan S., Zaigui L. 2007.** Effects of DATEM on dough rheological characteristics and qualities of CSB and bread. *Cereal Chemistry*, 84(2): 181-185.
- Xu A., Chung O.K., Ponte J.G. 1992.** Bread crumb amylograph studies. I. Effects of storage time, shortening, flour lipids, and surfactants. *Cereal Chemistry*, 69(5):495-501.
- Yadav N., Roopa B.S., Bhattacharya S. 2006.** Viscoelasticity of a simulated polymer and comparison with chickpea flour doughs. *Journal of Food Process Engineering*, 29: 234-252.
- Yamada Y., Hosoya S., Nishimura S., Tanaka T., Kajimoto Y., Nishimura A., Kajimoto O. 2005.** Effect of bread resistant starch on postprandial blood glucose levels in humans. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(3): 559-566.
- Yoo S., Jane J. 2002.** Structural and physicals of waxy and others wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, 49(3): 297-305.
- Yu N.T., Lui C.S., Culver J., O'Shea D.C. 1972.** A preliminary Raman spectroscopic study of native zinc-insulin crystals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 263: 1-6.
- Yu N.T., Jo B.H., O'Shea D.C. 1973.** Laser Raman scattering of cobramine B, a basic protein from cobra venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 156(1): 71-76.
- Yu N.T., Jo B.H., Chang R.C., Huber J.D. 1974.** Single-crystal Raman spectra of native insulin. Structures of insulin fibrils, glucagons fibrils, and intact calf lens. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 160: 614-622.
- Zaidel D.N.A., Chin N.L., Yusof Y.A., Rahman R.A. 2009.** Analysis and correlation studies on gluten quantity and quality during production. *Journal of Applied Sciences* 9(9): 1686-1694.

- Zhang P., He Z., Chen D., Zhang Y., Larroque O.R., Xia X. 2007.** Contribution of common wheat protein fractions to dough properties and quality of northern-style Chinese steamed bread. *Journal of Cereal Science*, 46: 1-10.
- Zghal M.C., Scanlon M.G., Sapirstein H.D. 1999.** Prediction of bread crumb density by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 76(5): 734-742.
- Zobel H.F. 1988.** Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch*, 40(2): 44-50.
- Zobel H.F., Young S.N., Rocca L.A. 1988.** Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. *Cereal Chemistry*, 65(6): 443-446.
- Zobel H.F., Kulp K. 1996.** The staling mechanism. En: *Baked Goods Freshness: Technology, evaluation, and inhibition of staling*. Eds. Hebeda R.H., Zobel H.F. Marcel Dekker (NY, EUA), pp. 1-64.