



Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba

*EFECTO DEL ALMIDÓN DAÑADO
SOBRE LAS PROPIEDADES DE LAS
MASAS PANARIAS Y LA CALIDAD
DE LOS PANIFICADOS*

Tesista: Lic. Gabriela Noel Barrera

Director: Dr. Pablo D. Ribotta

Lugar de realización: ICYTAC-Conicet (CONICET-UNC)

Córdoba, 2014



Miembros de la comisión asesora de tesis

Dr. Alberto E. León

Dr. Julio Zygadlo

Evaluadores externos

Dra. Silvia del C. Rodriguez

Dra. Alicia E. Bevilacqua

Dra. Susana E. Zorrilla



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales

ACTA DE EXAMENES

Libro: 00001

Acta: 02302

Hoja 01/01

LLAMADO: 1

10/03/2014

CATEDRA - MESA:

DI002 TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

NUMERO	APELLIDO Y NOMBRE	DOCUMENTO	INGRESO	COND.	NOTA	FIRMA
28655629	BARRERA, Gabriela Noel	DNI: 28655629	2007	T	Aprobado	

BEVILACQUA, Alicia - RODRIGUEZ, Silvia - ZORRILLA, Susana - PENCI, María Cecilia -

Observaciones:

Córdoba, ___/___/___ -.

Certifico que la/s firma/s que ha/n sido puesta/s en la presente Acta pertenece/n a: _____

1				1
Inscriptos	Ausentes	Examinados	Reprobados	Aprobados
05/03/2014	08:19:05		(0-3)	(4-10)

Libro/Acta: 0000102302

Hoja: 01/01

A mi mamá y papá, por su amor
y en memoria de mi tío Roberto, por su cariño

Agradecimientos

Pensar en las personas que han sido testigos y participes de este logro me llena de emoción, sin duda de todas esas personas aprendí algo, y son todas ellas las que hoy me hacen ser quien soy, sin ellas esto no hubiera sido posible...

Mis queridos Gaby, Beto y Pablo, que puedo decir de ustedes, se me viene a la mente el primer día que los conocí. Que año fantástico el de mi practicanato junto a ustedes, aprendí tanto, recibí tanto cariño y dedicación. Sin lugar a duda son un modelo para a mí, por todo lo que representan profesionalmente y por la calidez humana que siempre los ha caracterizado. Gracias por creer en mí, por acompañarme y hacerme sentir en familia.

Pablo, mi director desde que tengo director, gracias por todo, por alentarme siempre, por exigirme siempre, por sacar lo mejor de mí, por hacer tuyas mis derrotas y compartir las alegrías juntos. Gracias por la confianza y la dedicación. Trabajar junto a vos a lo largo de todos estos años a sido un grato desafío para a mí, tu energía y pasión por lo que haces me han inspirado siempre...

Mi hermana del alma, tantos recuerdos, tantas risas, tantas cosas maravillosas compartidas. La vida cruzo nuestros caminos hace ya 13 largos años, y desde entonces sin programarlo hemos recorrido caminos a la par. Has sido mi fiel e incondicional compañera y testigo de mi vida, sos un ejemplo para a mí en miles de sentidos. Gracias por ser mi cable a tierra cuando todo parece que se derrumba y por hacer tuyo mi dolor y mis alegrías. Te quiero...

Euge querida, 13 años acompañándonos y creciendo juntas, cuantos momentos compartidos, de los buenos y de los no tanto, cuantos bellos recuerdos a lo largo de todos estos años. Gracias por dejarme ser parte de tu vida y por demostrarme tu cariño sincero siempre. Te quiero...

Mary, cuanto cariño expresado de maneras tan especiales, gracias por tu solidaridad, sinceridad y generosidad, y por hacerme sentir tan especial y querida con pequeños detalles. Estoy feliz de tenerte de vuelta.

Lolu, un referente para a mí de esfuerzo y dedicación, gracias por acompañarme y hacer parte de tus cosas las mías, por tus consejos en esos momentos difíciles y por tu sinceridad.

Pao, mi Rochita querida, cuantas alegrías compartidas, que divertido pasar tiempo con vos. Siempre recuerdo con una sonrisa el día en que nos conocimos, que charla que nos mandamos, sentí que te conocía de toda la vida. Gracias por acompañarme.

Cris, gracias por estar siempre para dar una mano y para demostrarme que nada es tan grave como parece. Gracias por tu generosidad y por dedicarme parte de tu tiempo.

Anita, una persona que se ha sumado a mi vida, y no pienso dejar pasar. Gracias por mostrarme una mirada diferente de las cosas, por ser sincera y fiel, por apoyarme y escucharme. Nos queda un largo camino por delante.

Belu, que personaje... siempre de aquí para allá, gracias por la buena onda, por tu espontaneidad y generosidad, por el tiempo compartido y por tu sinceridad para conmigo. Gracias por esos abrazos tiernos que me encantan y por tu cariño.

Ali, Rafa, Andrés, Sole, Emiliano, Tefy, Pablo, Pala y Renato, a pesar de que con algunos he compartido mas tiempo que con otros les agradezco por estar siempre dispuestos a darme una mano y por hacerme sentir querida.

Las chiquis del CEPRO, gracias por el apoyo de siempre.

Laura, que alegría ha sido para a mí conocerte y compartir momentos con vos, gracias por tu tiempo, por tus consejos, por esas largas charlas, por haberme hecho sentir en familia al abrirme las puerta de tu casa. Gracias por creer en mí y por tu confianza.

Por ultimo lo mas importante, mi familia, gracias Má y Pá por darme la posibilidad de estar hoy acá, por cuidarme siempre y por hacerme sentir tan pero tan querida. Gracias Má, por ser incondicional y por haber hecho lo que ha estado a tu alcance para darme lo mejor. Gracias Pá, por acompañarme en mis decisiones y por tu confianza. Gracias Bé y Kó, por contagiarme su espontaneidad y por mostrarme que no hay que pensar tantas veces las cosas, que hay cosas que solo se sienten y se viven.

Amor mío, te deje para el final...hemos caminado juntos desde hace ya 10 años, que podría decirte que ya no te haya dicho. Has sido uno de mis pilares más fuertes estos últimos años, gracias por creer en mí, por hacerme sentir tan amada, por ser mi amigo incondicional, por acompañarme sin esperar nada a cambio, por darme el espacio que necesito para crecer, por alentarme a más siempre y por cuidarme. Te amo...

”Para emprender un gran proyecto hace falta valentía, sin embargo nada se construye sin perseverancia, esfuerzo y dedicación”

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
RÉSUMÉ	6
INTRODUCCIÓN	7
GRANO DE TRIGO	10
HARINA DE TRIGO.....	11
PROTEÍNAS	12
ALMIDÓN.....	16
POLISACÁRIDOS NO ALMIDONOSOS	27
LÍPIDOS	28
COMPONENTES MINORITARIOS.....	28
PRODUCCIÓN DE PAN	29
PRODUCCIÓN DE GALLETITAS.....	30
GENERALIDADES DEL GRANO Y HARINA DE TRITICALE.....	31
ADITIVOS.....	32
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
CAPÍTULO 1	
ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DEL ALMIDÓN DAÑADO SOBRE LA CALIDAD DE LAS HARINAS Y LOS PANIFICADOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. OBTENCIÓN DE HARINAS CON DIFERENTE NIVEL DE ALMIDÓN DAÑADO	39
2. DETERMINACIÓN DE LA DUREZA DE LOS GRANOS (MÉTODO 55-30; AACC, 2000).....	39
3. COMPOSICIÓN Y CALIDAD DE LAS HARINAS	40
4. CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN.....	44
5. ELABORACIÓN Y CALIDAD DE LOS PRODUCTOS DE PANIFICACIÓN	46
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
1. TEXTURA DE LOS GRANOS DE CEREALES Y ALMIDÓN DAÑADO	50
2. COMPOSICIÓN DE LAS HARINAS.....	51
3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS HARINAS MEDIANTE MÉTODOS QUÍMICOS PREDICTIVOS DE CALIDAD	53
4. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALFA-AMILASA DE LAS HARINAS	57
5. COMPORTAMIENTO TÉRMICO DEL ALMIDÓN	58
6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS PANIFICADOS	63
7. CONCLUSIONES.....	68
CAPÍTULO 2	
ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DIFERENTES ENZIMAS PARA MITIGAR LOS PROBLEMAS DE CALIDAD DERIVADOS DEL USO DE HARINAS CON ELEVADOS NIVELES DE ALMIDÓN DAÑADO	70

MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1. MUESTRAS.....	72
2. ENZIMAS	72
3. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE LAS HARINAS.....	73
4. PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS MASAS.....	74
5. PROPIEDADES TÉRMICAS DEL ALMIDÓN	78
6. PERFIL DE AZÚCARES SOLUBLES.....	78
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
1. PERFIL DE VISCOSIDAD DE LAS HARINAS.....	82
2. COMPORTAMIENTO DE LA MASA DURANTE EL AMASADO.....	86
3. PERFIL DE AZÚCARES DE LAS MASAS.....	92
4. ADHESIVIDAD DE LAS MASAS.....	96
5. EXTENSIBILIDAD DE LAS MASAS.....	99
6. VISCOELASTICIDAD DE MASA.....	104
7. PROPIEDADES TÉRMICAS	108
8. CONCLUSIONES.....	115
CAPÍTULO 3	
EFFECTO DEL DAÑO MECÁNICO SOBRE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN.....	117
MATERIALES Y MÉTODOS.....	118
1. MUESTRAS.....	119
2. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA	119
3. PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS SUSPENSIONES DE ALMIDÓN	120
4. DETERMINACIÓN DE LA AMILOSA LIXIVIADA DE LOS GRÁNULOS	121
5. COMPORTAMIENTO TÉRMICO DEL ALMIDÓN	122
6. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN POLÍMERO-AGUA – MODELO DE FLORY-HUGGINS.....	123
7. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE RETROGRADACIÓN – ECUACIÓN DE AVRAMI	124
8. PROPIEDADES REOLÓGICAS DE GELES DE ALMIDÓN	125
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
1. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA	131
2. GELATINIZACIÓN ESPONTÁNEA DEL ALMIDÓN DAÑADO	134
3. PROPIEDADES DE FLUJO DE LAS SUSPENSIONES DE ALMIDÓN.....	136
4. EVALUACIÓN DE LA DEPENDENCIA EN EL TIEMPO	141
5. PERFIL DE VISCOSIDAD	142
6. CARACTERIZACIÓN TÉRMICA.....	143
7. PARÁMETROS DEL MODELO DE FLORY-HUGGINS	152
8. CINÉTICA DE RETROGRADACIÓN	154
9. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS GELES DE ALMIDÓN.....	158

10. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA DE LOS GELES DE ALMIDÓN	163
11. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA DE LOS GELES DE ALMIDÓN	165
12. CONCLUSIONES	167
CAPÍTULO 4	
EFFECTO DEL DAÑO MECÁNICO SOBRE LA MICROESTRUCTURA Y TOPOGRAFÍA DE LA SUPERFICIE DE LOS GRÁNULOS DE ALMIDÓN	169
MATERIALES Y MÉTODOS.....	170
1. MUESTRAS.....	171
2. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X	171
3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	172
4. MICROSCOPIA AMBIENTAL ELECTRÓNICA DE BARRIDO (ESEM)	173
5. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	173
6. ANÁLISIS DE TEXTURA DE LAS IMÁGENES DE MICROSCOPIA.....	174
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	177
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	178
1. CRISTALINIDAD	180
2. MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO.....	181
3. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	185
4. CONCLUSIONES.....	191
CAPÍTULO 5	
EFFECTO MITIGANTE DE LAS ENZIMAS SOBRE LOS PROBLEMAS DE CALIDAD DERIVADOS DEL USO DE HARINAS DE TRIGO CON DIFERENTES CONTENIDOS DE ALMIDÓN DAÑADO.....	192
MATERIALES Y MÉTODOS.....	193
1. MUESTRAS.....	194
2. ENZIMAS	195
3. CALIDAD DE LAS HARINAS	195
4. CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN.....	195
5. PRODUCTOS NO FERMENTADOS (GALLETITAS DULCES)	196
6. PRODUCTOS FERMENTADOS (PAN)	201
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	208
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	209
1. VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS HARINAS PARA ELABORAR PRODUCTOS PANIFICADOS	210
2. PROPIEDADES TÉRMICAS DEL ALMIDÓN	212
3. EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ENZIMAS SOBRE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS MASAS Y LOS PRODUCTOS DE PANIFICACIÓN.....	213
4. CONCLUSIONES.....	248
CONCLUSIONES GENERALES	250
BIBLIOGRAFÍA.....	255

Resumen

La harina de trigo es el principal componente de los productos panificados y por lo tanto, sus características fisicoquímicas y reológicas determinan la calidad final de los productos panaderos. La molienda de los granos de trigo en la obtención de harinas puede afectar la integridad del almidón produciendo lo que se denomina almidón dañado.

La presencia de almidón dañado en las harinas reduce la calidad de los productos panaderos, y se ha atribuido este efecto a la gran capacidad de absorción de agua que presentan los gránulos dañados de almidón.

Es bien conocido el hecho de que el desempeño de una harina en la producción de pan y galletitas se ve principalmente influenciado por la cantidad y la calidad de las proteínas. Sin embargo, a partir de este estudio ha quedado demostrado que el contenido de almidón dañado es otro componente que modifica significativamente las propiedades de la harina, ya que afecta fuertemente la absorción de agua de las mismas y altera significativamente las propiedades reológicas y fermentativas de las masas, lo que causa dificultades a lo largo de los procesos de producción y deriva en el deterioro de la calidad de los panificados.

El uso de α -amilasa, amilasa maltogénica y amiloglucosidasa, en la atenuación de los efectos negativos del uso de harinas con elevados niveles de almidón dañado, resultó beneficioso, ya que se produjeron mejoras en las características reológicas de las masas y de los atributos de calidad de los productos, lo que posibilita la utilización de estas enzimas y sus mezclas como aditivos correctores.

Los resultados de este estudio son el producto de un análisis que se llevó a cabo abordando la problemática desde diferentes aspectos. En el primer capítulo se detalla el efecto del contenido de almidón dañado en harinas, independientemente de la función de los demás componentes. En el segundo capítulo, a partir de un sistema modelo constituido por almidón y proteínas, se describe el efecto del almidón dañado sobre las propiedades reológicas y térmicas de las masas panarias, y el efecto del agregado de enzimas amilásicas sobre estas características. En el tercer y cuarto capítulo, a través de un sistema compuesto por almidón, se profundiza respecto a la influencia del contenido de almidón dañado sobre características reológicas y los procesos de gelatinización y retrogradación, y los efectos de la molienda sobre la estructura granular. Finalmente, como cierre de este estudio, a partir de harinas obtenidas industrialmente, en el quinto capítulo se analiza la contribución efectiva de las enzimas amilolíticas como aditivos para la corrección de harinas con elevados niveles de almidón dañado, sobre la producción de galletitas dulces y pan.

Abstract

Wheat flour is the main component of bakery products; therefore, its physicochemical and rheological characteristics determine the quality of this kind of products. The milling of wheat grains for flour production can affect the integrity of starch granules, producing the so-called damaged starch.

The presence of damaged starch in the flour reduces cookie- and bread-making quality and this effect has been attributed to the high water absorption capacity of the damaged starch granules.

It is well known that the performance of wheat flour in the production of bread and cookies is mainly influenced by the quantity and quality of proteins. However, this study demonstrates that damaged starch content is another component that significantly modifies the properties of the flour, and strongly affects the water absorption, the rheological and the fermentation properties of the dough, which, altogether, cause difficulties during production processes and result in the quality reduction of the bakery products.

The use of α -amylase, maltogenic amylase and amyloglucosidase to attenuate the negative effects of high damaged starch levels was beneficial, because it improves the rheological properties of dough and quality attributes of the products. Therefore, these enzymes and their mixtures could be used as additives correctors.

This study has been performed considering different aspects of the subject. The first chapter shows the effect of damaged starch content of flour, regardless of the function of the other components. The second chapter describes the effect of damaged starch on the rheological and thermal dough properties and the effect of the addition of enzymes on these characteristics, but considering a model system consisting of starch and protein. In the third and fourth chapter, a model system consisting of starch was used to explain the influence of damaged starch content on rheological properties and gelatinization and retrogradation processes, and the effect of milling on the granular structure. Finally, as a closing of this study, industrially produced flours were used in the fifth chapter to analyze the effective contribution of amylolytic enzymes as additives for correction of flour with high levels of starch damage on the production of cookies and bread.

Résumé

La farine de blé est le principal composant de produits de boulangerie et donc leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs propriétés rhéologiques déterminent la qualité finale des produits. Le broyage des grains de blé pour l'obtention de la farine peut affecter l'intégrité de l'amidon en formant la fraction d'amidon endommagé.

La présence d'amidon endommagé dans la farine diminue la qualité de produits de boulangerie, et cet effet a été attribué à la forte capacité d'absorption de l'eau par les granules d'amidon endommagé.

Il est bien connu que la performance d'une farine dans la fabrication du pain et des biscuits est principalement influencée par la quantité et la qualité de ces protéines. Cependant, cette étude a démontré que la présence d'amidon endommagé est un autre élément qui modifie considérablement les propriétés de la farine. Ceci affecte fortement la capacité d'absorption de l'eau par la farine et modifie énormément les propriétés rhéologiques et la fermentation de la pâte, ce qui provoque des difficultés au cours des procédés de production, et détériore la qualité du pain.

L'utilisation d' α -amylase, d'amylase maltogénique et d'amyloglycosidase pour atténuer les effets négatifs de l'utilisation de la farine avec des hauts niveaux de dégradation de l'amidon, a amélioré les caractéristiques rhéologiques de la pâte et des attributs de la qualité des produits, ce qui permet l'utilisation de ces enzymes, et leur mélanges, comme additifs et correcteurs.

Cette étude est le résultat d'une analyse qui a été effectuée pour résoudre le problème sous différents aspects. Dans le premier chapitre, l'effet de la teneur en amidon endommagé dans la farine a été analysé, quelle que soit la fonction des autres composants. Dans la deuxième partie, à partir d'un système modèle constitué d'amidon et de protéines, l'effet de la dégradation de l'amidon sur les propriétés rhéologiques et thermiques de la pâte à pain a été étudié, ainsi que l'effet de l'addition d'enzymes amylasiques sur ces caractéristiques. Dans la troisième et la quatrième section, grâce à un système constitué d'amidon, l'approfondissement de l'influence de la teneur en amidon sur les propriétés rhéologiques, sur gélatinisation et rétrogradation de l'amidon, ainsi que l'effet du meulage sur la structure granulaire, a été effectué. Enfin, le cinquième chapitre est dédié à la fin de cette étude, et concerne l'analyse de la contribution effective des enzymes amylolytiques comme additifs pour la correction de la farine avec de hauts niveaux de dégradation de l'amidon sur la production de biscuits et du pain à partir de la farine produite industriellement.

Introducción

La panificación es una de las tecnologías más antiguas conocidas en la humanidad (Matz, 1995). El pan a lo largo de los años se ha convertido en un alimento de consumo generalizado, ocupando una posición de gran importancia en la nutrición internacional (Cauvain, 2004; Barrett, 1975). Las proteínas procedentes del trigo poseen menor valor nutricional que las de origen animal debido a que son deficientes en lisina. Sin embargo, el consumo de cereales es recomendable desde el punto de vista nutricional, ya que proporciona a la dieta hidratos de carbono complejos, fibra dietética, minerales y vitaminas del complejo B, además de ser un producto bajo en grasa. Por lo tanto, debido a estos beneficios, los cereales y sus productos forman parte de base de la pirámide nutricional.

Argentina es un importante proveedor de granos a nivel mundial, y en particular de trigo, con suficiente capacidad instalada como para incrementar la oferta de harina a nivel nacional y satisfacer tanto al mercado interno como externo. En el periodo enero-noviembre del 2012, el sector molinero nacional molturó un volumen menor de trigo pan que en igual periodo en el 2011. Desde el año 2008, el sector ha sometido anualmente a la operación de molienda más de 6 millones de toneladas anuales de este cereal, aunque la producción anual promedio 2007/08 – 2008/09 fue de 12,3 millones de toneladas. La molienda de trigo pan acumulada durante enero-noviembre del 2012 fue de 6 millones de toneladas y la producción de harina de trigo acumulada durante el mismo periodo fue de 4,5 millones de toneladas. A lo largo de los años se registran fluctuaciones en la molienda de trigo pan, las cuales están asociadas básicamente con la disponibilidad del cereal en el mercado.

Argentina posee 178 molinos harineros, aglomerados en 155 empresas. La dispersión de estos molinos a lo largo del país es amplia, pero el mayor número de establecimientos se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. El producto principal de la molienda del trigo pan es la harina del tipo “000” y “0000”, mientras que las sémolas de trigo pan, harina “00”, harina “0” y “1/2 0” son de menor importancia. En promedio los molinos de harina de trigo obtienen cada 100 kg de trigo 50 kg de harina “000” y 25 kg de harina “0000”, esta última de mayor valor por contener menos cenizas que la primera. La harina de trigo “0000” resulta más adecuada para la elaboración de productos de pastelería fina, pastas frescas y discos de masa.

La cadena productiva del trigo se compone de tres eslabones sucesivos de industrias especializadas. El primer eslabón es la producción de trigo por parte de los agricultores, actividad que en Argentina se realiza en conjunto con otros cultivos dentro de un modelo agropecuario diversificado. Seguidamente, como segundo eslabón se encuentra la industria molinera, la cual realiza la primera transformación, convirtiendo los granos de trigo en harina. Finalmente, en el tercer eslabón surgen varias industrias, siendo las principales aquellas productoras de panes tradicionales, panes industriales, fideos y pastas tanto secas como frescas, y de otros productos de valor agregado como por ejemplo, las galletitas. La harina que se industrializa, se utiliza de diferentes maneras, el 71,3% se destina para la elaboración pan en panaderías artesanales, el 8,6 % para pastas, el 8,1% para consumo

como harina fraccionada, el 7,3% para galletitas y bizcochos y el 4,7% para pan industrial (Lezcano, 2006).

Las harinas obtenidas de los trigos cultivados en Argentina difieren notablemente en su calidad industrial, según la zona de procedencia del cereal. Estas diferencias de calidad se deben a cuestiones principalmente genéticas y ambientales. Por lo tanto, en Argentina, las harinas que se comercializan se obtienen por mezcla de diferentes variedades de trigos hasta que la harina finalmente obtenida presente parámetros de calidad adecuados a las necesidades del mercado (Cuniberti, 2004). Para evaluar la calidad industrial del trigo se tienen en cuenta las características del grano, el comportamiento en la molienda, distintos valores analíticos como el contenido de gluten, curvas alveográficas, farinográficas y cualidades panaderas, que en conjunto determinan la calidad de un trigo para su finalidad de uso. Las condiciones agronómicas y climáticas pueden afectar la calidad de este cereal, pudiendo tener calificación cuestionable aún las variedades destacadas. De allí que cualquier anomalía en la calidad debe observarse en distintos ambientes o años de cultivo, para certificar que el resultado es debido a la variedad.

El comportamiento en la molienda es otro aspecto de importancia dentro de los criterios de calidad. Los trigos de baja extracción de harina o alto contenido de cenizas generan dificultades desde el punto de vista molinero. Si bien ciertas regiones de cultivo favorecen la acumulación de una mayor cantidad de minerales en el grano, hay variedades que presentan un menor contenido de cenizas.

La cantidad y calidad de las proteínas es un parámetro de calidad panadera muy importante para la producción de panificados. Los análisis reológicos realizados mediante farinógrafos y alveógrafos determinan indirectamente la calidad de las proteínas proporcionando información para valorar la fuerza panadera, el tiempo de desarrollo de las masas, la absorción de agua y la estabilidad o comportamiento de la masa durante el amasado.

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, comúnmente se requiere del uso de diversos aditivos para mejorar el rendimiento de harinas de menor calidad, facilitar el procesamiento, homogeneizar la respuesta de los sistemas, extender el periodo de conservación y el valor nutritivo. Permanentemente los productores buscan alternativas tecnológicas y de formulación que permitan disminuir los costos de producción, además de producir transformaciones que deriven en la generación de productos con características novedosas debido a los cambios en los patrones de consumo que se producen año tras año. En este sentido, continuamente se lanzan al mercado nuevos aditivos que tienden a mejorar la calidad, y a aumentar el tiempo de conservación de los productos de panificación. La industria local, así como la de otras partes del mundo, se enfrenta con la necesidad de procesar trigos de diferente calidad, con variaciones en su composición, además de responder a un mercado cada vez más exigente en cuanto a las especificaciones nutricionales y tecnológicas. Para abordar esta problemática desde las industrias molinera y panificadora es indispensable la búsqueda

de nuevas alternativas de aditivos, al igual que la profundización del conocimiento respecto los mecanismos de acción de los aditivos que en forma continua se liberan al mercado.

GRANO DE TRIGO

Existen diversas variedades de trigos, sin embargo, son tres las más importantes comercialmente. El trigo común o pan (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *aestivum*) es extensamente cultivado y produce harinas de excelente calidad para la producción de productos leudados; el trigo club (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *compactum* (Host)) posee granos blandos y con bajo contenido de proteína en contraste con el trigo pan, por lo que produce harinas que son aptas para elaborar productos panificados en donde se necesita un gluten débil, como por ejemplo bizcochuelos y galletitas; y el trigo duro (*Triticum Turgidum* (L) Thell. conv. *durum* (Desf.)) (MacKey, 1975), que en nuestro país se denomina candeal, que se utiliza fundamentalmente para la producción de sémolas que se emplean en la elaboración de pastas.

El grano de trigo, como todos los cereales, está constituido por una cubierta externa o pericarpio que envuelve a la semilla denominado salvado, la cual en su interior contiene el germen o embrión y el endospermo (Figura 1). Las células que componen las capas más externas del grano, poseen un alto contenido de celulosa y hemicelulosa, el germen básicamente es rico en lípidos no saturados y proteínas, y las células del endospermo almacenan las proteínas de reserva y el almidón (Hoseney, 1994a).

La composición química del trigo puede variar según la variedad, la región de cultivo y el año de cosecha. En función de esto, la composición de los principales componentes en un grano de trigo resulta en: humedad 8,0-18,0%, proteínas 7,0-18,0%, lípidos 1,5-2,0%, almidón 60,0-68,0%, fibra cruda 2,0-2,5% y cenizas 1,5-2,0% (Matz, 1999). El contenido de proteínas es un indicador de gran importancia que depende de la relación entre la proporción de endospermo y salvado. Por ejemplo, un aumento en el llenado del grano mediado por factores ambientales causa un incremento en el contenido de almidón en el endospermo y altera la relación proteína/almidón, lo que promueve una disminución en el contenido de proteínas (Skovmand et al., 1984).

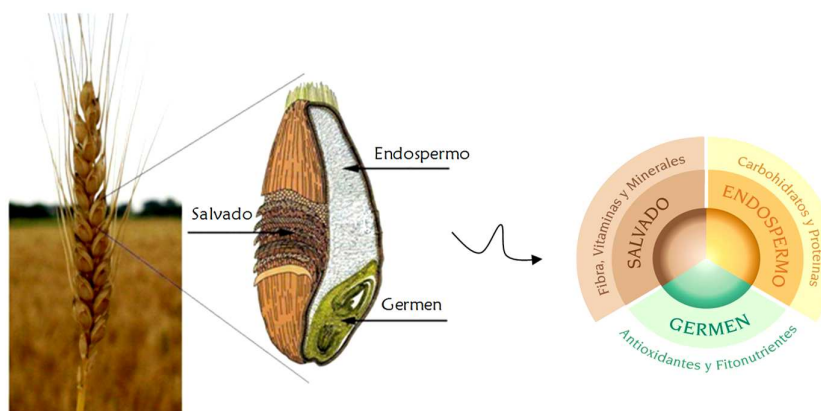


Figura 1: Representación gráfica del grano de trigo y sus partes principales.

HARINA DE TRIGO

La harina de trigo es el producto obtenido por la molienda gradual y sistemática de los granos de trigo, previa separación de las impurezas hasta un grado de extracción determinado. La molturación y separación generalmente implica la eliminación completa del salvado y el germen, este último con el fin de evitar la rancidez de la harina debido a su elevada concentración lípidos. A partir de esto, la harina obtenida como producto de la molienda se encuentra principalmente compuesta por las células rotas del endospermo, las cuales poseen gránulos de almidón incluidos en una matriz proteica constituida principalmente por las proteínas de reserva del trigo (Hoseney, 1994a).

La composición química de la harina de trigo blanca varía respecto del grano entero debido al proceso de molienda, siendo la modificación más relevante por efecto de la molienda la que se produce sobre la proporción de proteínas y almidón (Hoseney, 1994d). La composición en base seca de una harina es aproximadamente un 70% de almidón, 9-18% de proteínas, 2% de lípidos y 2,5% de polisacáridos no almidonosos.

Las harinas de trigo, y en menor grado las de centeno, son las únicas que resultan panificables debido a que tienen la capacidad de formar gluten. El gluten es definido como un gel formado por las proteínas de almacenamiento de los granos cuando se trabaja mecánicamente una mezcla de harina y agua. Las proteínas que integran el gluten se encuentran localizadas en cuerpos proteicos en las células del endospermo. Durante el amasado se produce una hidratación y ruptura de estos cuerpos proteicos, lo que da lugar a la formación de una red tridimensional y continua en la cual los gránulos de almidón se encuentran inmersos (Gómez Pallarés et al., 2006).

Las propiedades únicas de la harina de trigo que le permite formar una masa viscoelástica al ser mezclada con agua se deben a las características de las proteínas presentes, gliadinas y gluteninas (Shewry et al., 2001; Lindsay y Skerritt, 1999). Estas fracciones de proteínas tienen una gran capacidad de absorber agua, hasta prácticamente dos veces su peso, y la habilidad de constituir una red deformable, elástica y extensible (gluten) capaz de retener dióxido de carbono durante la

fermentación y posterior cocción en la producción de productos panificados. Es por esto que la calidad de una harina está fuertemente determinada por las características moleculares de las proteínas presentes, ya que de ellas dependen las interacciones que se establecen durante las diferentes etapas del proceso de panificación. Es importante destacar que las interacciones entre las proteínas no son las únicas de relevancia en la obtención de un producto panificado, además de esto, las proteínas establecen interacciones con otros componentes presentes en la harina, tales como el almidón, los polisacáridos no almidonosos (arabinoxilanos, arabinogalactanos) y los lípidos neutros y polares (fosfo y glicolípidos) (Lee et al., 2001; Bettge y Morris, 2000; Carr et al., 1992).

Proteínas

Las proteínas que forman parte de la composición de los granos de trigo se pueden dividir en dos grupos, las proteínas capaces de formar el gluten y aquellas que no lo forman. Las primeras son proteínas de almacenamiento y representan aproximadamente el 75-80% del total de las proteínas, sin embargo, las proteínas que no son capaces de formar gluten representan entre un 20-25% del contenido total de las proteínas, y la mayoría posee actividad enzimática (Pomeranz, 1988).

Las proteínas de trigo se clasifican según su solubilidad en cuatro fracciones: albúminas, proteínas solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas; gliadinas, solubles en alcohol; y glutelinas, solubles en soluciones ácidas o básicas diluidas (Osborne, 1907). Chen y Bushuk (1970) revelaron que sólo una parte de las gluteninas son solubles en ácido acético diluido, y así diferenciaron dos fracciones proteicas: una soluble y una insoluble. Posteriormente, Orth y Bushuk (1972) encontraron una correlación positiva entre la cantidad de gluteninas insolubles en ácido acético y el volumen de pan, por lo que ésta fracción se transformó en la clave para explicar diferencias en la fuerza de la masa y en la calidad panadera (Khan y Bushuk, 1979). El uso de detergentes (Graveland et al., 1980) y solventes orgánicos permitió una mejor separación, a partir de lo cual se concluyó que la insolubilidad de las proteínas estaba determinada por el tamaño y el alto grado de polimerización de los agregados proteicos.

Inicialmente, Finney y Barmore (1948) observaron una correlación positiva entre el contenido de proteínas de la harina de trigo y el volumen de pan. Sin embargo, posteriormente se observó que el volumen de pan dependía mayormente de la calidad de las proteínas de la harina más que de la cantidad propiamente. Por lo tanto, la calidad proteica se refiere no sólo al tipo de proteínas identificadas según Osborne, sino también a la influencia de cada fracción en la funcionalidad de la masa, y consecuentemente, en la calidad del pan. En base a estos hechos, comúnmente se clasifica a las proteínas de la harina de trigo en proteínas que no forman gluten y proteínas formadoras de gluten.

Las proteínas que no forman gluten son solubles en soluciones salinas diluidas y por lo tanto corresponden a las albúminas y globulinas del fraccionamiento de Osborne. Son proteínas

monoméricas, metabólicamente activas o estructurales que se ubican en las capas más externas del grano de trigo. Su función en la panificación no está clara aún (Veraverbeke y Delcour, 2002). Estas proteínas poseen un buen balance de aminoácidos, contienen proporciones relativamente altas de lisina, triptófano y metionina; tres aminoácidos que se encuentran en baja proporción en la mayoría de los cereales. La fracción de albúminas y globulinas incluye las proteínas solubles en cloroformo - metanol, las cuales poseen una composición de aminoácidos única con altos valores de lisina y aminoácidos no polares, enzimas, albúminas de alta masa molecular (HMW-albúminas), proteínas “triples”, que son proteínas menores del endospermo depositadas en cuerpos proteicos, y otras proteínas que no son de almacenamiento. La mayoría de estas proteínas pueden dividirse en dos grupos: HMW-albúminas, y LMW-albúminas (albúminas de baja masa molecular) con una masa molecular aproximada de 60000 y de 14000 a 16000, respectivamente (Pogna et al., 1994).

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

Gliadinas

Las gliadinas constituyen un tercio de las proteínas de la harina (Lindahl, 1990) y son clasificadas en α -, β -, γ - y ω -gliadinas (Shewry et al., 1986). Estas proteínas poseen una masa molecular entre 30000-80000 y están formadas por un dominio no repetitivo rico en estructura secundaria α -hélice y por un dominio repetitivo heterogéneo rico en estructura β -turn (Tatham y Shewry, 1985). Las α - y γ -gliadinas son ricas en residuos de prolina y glutamina, y un dominio C-terminal no repetitivo que posee residuos de cisteínas (Shewry y Tatham, 1990). Las ω -gliadinas no contienen residuos de cisteína, por lo que están limitadas para formar interacciones covalentes (Tatham, 1995). Las γ -gliadinas poseen ocho residuos de cisteínas que se encuentran localizados en el dominio C-terminal y forman cuatro enlaces disulfuro intramoleculares, por lo que no son capaces de formar nuevos enlaces covalentes con otras proteínas del gluten. Las α -gliadinas poseen seis residuos de cisteínas igualmente ubicados como en las γ -gliadinas, que forman tres enlaces disulfuro también intramolecularmente. Sin embargo, estos enlaces disulfuro son importantes para retener el plegado de la estructura de las

gliadinas que determina la naturaleza de las interacciones no covalentes con la red de gluteninas (Wrigley et al., 1998). Algunos investigadores proponen que las gliadinas son las responsables de la cohesividad de las masas (Hoseney, 1994b), aunque otros sugieren que controlan el potencial de volumen de pan (Khatkar et al., 2002).

Gluteninas

Las gluteninas se encuentran formando agregados proteicos unidos por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes intermoleculares. Su masa molecular varía desde 500000 a más de 10 millones (Wieser, 2006). Luego de la reducción de los puentes disulfuros las subunidades de gluteninas resultantes pueden ser divididas en dos tipos: las subunidades de alta masa molecular (HMW-GS) y las subunidades de baja masa molecular (LMW-GS) (Shewry et al., 1992). Las HMW-GS con masas moleculares entre 95000-136000, y las LMW-GS con masas moleculares entre 42000-51000 y 31500-35500 (Payne y Corfield, 1979).

Las subunidades de gluten de baja masa molecular (LMW-GS) son un grupo complejo de proteínas que poseen la habilidad de formar enlaces disulfuro que permiten su incorporación dentro de los polímeros de gluteninas. La mayoría de las LMW-GS contienen entre siete y ocho residuos de cisteínas (Wieser, 2003; Grosch y Wieser, 1999), seis residuos están en una posición homóloga a las gliadinas, y por lo tanto tienden a formar puentes disulfuro intramoleculares. Los residuos de cisteínas adicionales no son capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares, probablemente por impedimento estérico, por lo que forman puentes disulfuro intermoleculares formando agregados proteicos entre ellas y con las HMW-GS (Pogna et al., 1994). Se conoce muy poco sobre la estructura de LMW-GS. Tatham et al. (1987) propusieron que en el dominio N-terminal se encuentran distribuidas irregularmente estructuras secundarias β -turn, mientras que, en el dominio C-terminal predomina la estructura α -hélice. Aunque HMW-GS son el grupo principal de proteínas del gluten que determinan las características panaderas de la masa, LMW-GS también cumplen un rol importante. En general, LMW-GS se relacionan con la resistencia y la extensibilidad de la masa (Cornish et al., 2001; Andrews et al., 1994; Metakovskii et al., 1990) e incluso algunas formas alélicas causan mayores efectos sobre las propiedades de la masa que las HMW-GS (Gupta et al., 1994, 1989; Payne et al., 1987).

Las subunidades de gluteninas de alta masa molecular (HMW-GS) presentan fuertes similitudes estructurales entre ellas, pero también diferencias características. Una de las diferencias es el comportamiento en la polimerización y se relaciona con el número de grupos sulfhidrilo. En base a esta diferenciación, HMW-GS son clasificadas en dos subgrupos: subunidades tipo-x y tipo-y. El dominio N-terminal de las subunidades tipo-x contienen cuatro residuos de cisteínas y el dominio N-terminal de las subunidades tipo-y contienen cinco residuos de cisteínas (Tatham, 1995). Los estudios muestran a las subunidades de gluteninas de alto peso molecular, como moléculas alargadas que posee una estructura β -espiral en la región central repetitiva. Mientras que los dominios N- y C-terminal poseen una estructura similar a las proteínas globulares, presentado α -hélices y estructura

desordenada. En los dominios terminales se encuentran la mayoría de los residuos de cisteínas que proveen de los sitios para la formación de puentes disulfuro intermoleculares.

Parte de las gluteninas poliméricas pueden ser separadas como un gel, el cual se denomina macropolímero de gluteninas (GMP). El GMP está compuesto de agregados proteicos de gran tamaño formados por gluteninas de alto y bajo peso molecular (HMW-GS y LMW-GS) (Don et al., 2003). Weegels et al. (1997a,b, 1996) analizaron esta fracción en detalle, y presentaron firme evidencia de una alta correlación positiva entre la cantidad de GMP de la harina y el volumen de pan.

Estructura del gluten

El gluten es una red tridimensional de proteínas entrecruzadas, con una estructura continua y compacta, la cual se mantiene mediante interacciones covalentes, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Las proteínas que integran esta red se encuentran localizadas en el endospermo de la harina en forma de cuerpos proteicos. Para que la red de gluten pueda consolidarse es necesario que estos cuerpos proteicos se rompan, en este sentido, la hidratación de una harina promueve el hinchamiento e hidratación de estas proteínas debilitando así las uniones que las mantienen inicialmente adheridas (Vernière y Feillet, 1999).

El gluten es una mezcla compleja de proteínas que varían en su proporción, estructura y propiedades. A pesar de los numerosos estudios realizados sobre la estructura de las proteínas del gluten y la base molecular existente, su rol en el procesamiento del pan aún no es totalmente comprendido (Shewry et al., 2001). Como se mencionó anteriormente, las subunidades de glutenina de alta masa molecular están presentes en forma de polímeros (macropolímero de gluteninas). La importancia de tales polímeros en la viscoelasticidad del gluten ha sido evaluada durante muchos años, aunque su tamaño, complejidad y baja solubilidad limitan su estudio. La importancia de los puentes disulfuro en estabilizar estos polímeros ha sido extensamente demostrada. Hay evidencia de la formación de estos enlaces intermoleculares entre HMW-gluteninas, y de estas con LMW-GS (Kasarda, 1999; Shewry y Thatham, 1997). Los enlaces disulfuro son entonces considerados esenciales para la viscoelasticidad del gluten. La composición de aminoácidos de las proteínas del gluten muestra que aproximadamente la mitad de los constituyentes son glutamina y prolina, por lo que se supone que hay gran cantidad de puentes de hidrógeno en el sistema. Otro aporte importante son las interacciones hidrofóbicas, ya que aproximadamente el 35% de los aminoácidos poseen cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica (Hoseney, 1994c). Las gliadinas, contribuyen a la viscosidad del gluten, interactúan principalmente con los polímeros de gluteninas mediante interacciones no covalentes, y las gluteninas, además participan con una gran cantidad de interacciones del tipo puentes de hidrógeno (Figura 2). Todas las interacciones que se establecen en este complejo sistema son muy importantes ya que contribuyen a la viscoelasticidad de la masa (Belton, 1999; Jeffrey y Saenger, 1994; Ewart, 1989).

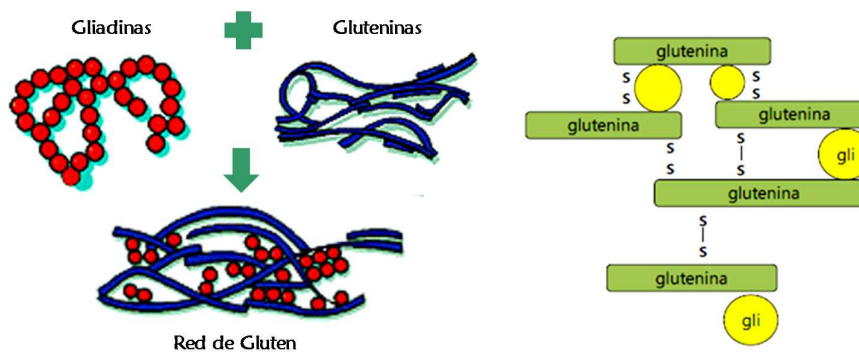


Figura 2: Esquema general de la estructura de la red de gluten (S-S: puente de disulfuro, gli: gliadinas).

Almidón

Las semillas de los cereales necesitan almacenar energía y reservar carbono para el desarrollo posterior del embrión, y su principal molécula de reserva es el almidón. El almidón es el componente y el carbohidrato mayoritario de las harinas de trigo, ya que representa aproximadamente un 70% de su composición en base seca. En los cereales el almidón se acumula en forma de gránulos, los cuales se desarrollan en organelas de doble membrana llamadas amiloplastos. Un amiloplasto puede contener uno o varios gránulos de almidón, dependiendo de la especie de plantas o mutante genética. Cuando sólo un gránulo se produce en un amiloplasto, como lo es en el caso del endospermo de trigo, se denominan gránulos simples. Sin embargo, cuando dos o más gránulos se producen en un amiloplasto y estos forman las partes de un gránulo se denominan gránulos compuestos, y un ejemplo de este tipo es el arroz. Los gránulos de los gránulos compuestos están separados por una estrecha capa de estroma (Shannon et al., 2009).

En el trigo se producen dos tipos de gránulos. Los primeros gránulos producidos en las células del endospermo son grandes y lenticulares (Tipo A). Sin embargo, aproximadamente dos semanas después de la iniciación de los primeros gránulos, se producen otros pequeños adicionales a partir de evaginaciones de los amiloplastos originales, los cuales se separan de estos por constricción. A diferencia de los gránulos primarios, los gránulos secundarios son generalmente más pequeños y esféricos (Tipo B) (Shannon et al., 2009). Los gránulos de almidón desarrollados dentro de los amiloplastos en la madurez pierden la membrana plastidial, aunque algunas proteínas permanecen asociadas a la superficie de los gránulos (Edwards et al., 2008).

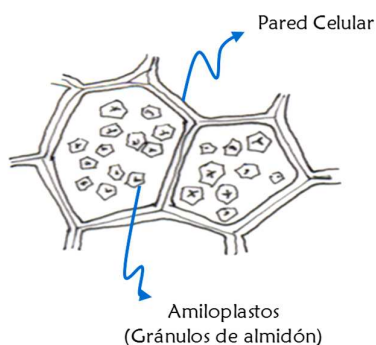


Figura 3: Representación esquemática de las células que contienen los amiloplastos donde se sintetizan los gránulos de almidón de trigo.

El almidón es un biopolímero constituido esencialmente por dos fracciones poliméricas de glucosa, amilosa y amilopectina (Jobling, 2004). La amilosa, que comprende alrededor del 20-30% del almidón, es un polímero esencialmente lineal en el que los residuos de glucosa están unidos por enlaces α -(1-4), con escasos puntos de ramificación formados por enlaces α -(1-6) (Shibanuma et al., 1994) (Figura 4). Las cadenas de amilosa pueden formar hélices simples o dobles (Takeda et al., 1989), poseen un grado de polimerización (GP) entre 500-6000 unidades de glucosa (Shibanuma et al., 1994).

La amilopectina es una de las moléculas más grandes de la naturaleza con una masa molecular que varía desde $50-500 \times 10^6$, y a diferencia de la amilosa es un polímero altamente ramificado. Posee una cadena central formada por 3×10^5 a 3×10^6 unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1-4), y ramificaciones formadas por glucosas unidas por enlaces α -(1-6) que aparecen cada 20-25 unidades (Manners, 1989; Gilliard y Bowler, 1987) (Figura 4). Las cadenas de amilopectina pueden clasificarse como cadenas externas no ramificadas (A) o cadenas internas ramificadas (B) (French, 1984). La estructura de la amilopectina se representa comúnmente por un modelo de *cluster*, en el que las cadenas A de GP 12-16, que pueden formar doble hélices, están organizadas en *clusters* (Thompson, 2000). Los *clusters* comprenden el 80-90% de las cadenas y están unidos a las cadenas B (que conforman el restante 10-20%) (Hizukuri, 1986).

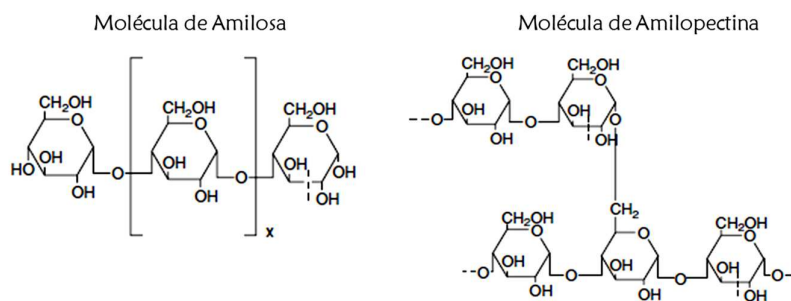


Figura 4: Estructura química simplificada del polímero de amilosa y amilopectina.

La amilosa y amilopectina se encuentran formando gránulos que se caracterizan por ser semicristalinos e insolubles en agua (Copeland et al., 2009). Contrariamente a la mayoría de otras plantas, los gránulos del almidón de trigo muestran una distribución de tamaño bimodal. Los gránulos más pequeños (tipo-B) son esféricos con un diámetro menor a 10 μm , en tanto que los grandes (tipo-A) son lenticulares con un diámetro cercano a 20 μm (Karlsson et al., 1983; Moon y Giddings, 1993). Los gránulos contienen agua y pequeñas cantidades de lípidos y proteínas, y la proporción de estos componentes depende del origen botánico del almidón (Hoover, 2001). Además de esto, es importante destacar que los gránulos de almidón pueden variar con respecto al contenido, estructura y organización de la amilosa y amilopectina (Lindeboom, 2004).

Los gránulos de almidón nativos presentan una estructura semicristalina con un grado de cristalinidad de 20 a 40% (Hizukuri, 1986), la cual es atribuida principalmente a la estructura de la amilopectina. La anisotropía (birrefringencia) que presentan los gránulos de almidón debido al ordenamiento molecular que poseen queda evidenciada por la aparición de la cruz de malta cuando son sometidos a luz polarizada. El fenómeno de anisotropía se debe al ordenamiento espacial de los átomos en la red cristalina, y como consecuencia de que la unidad cristalina en los gránulos de almidón es hexagonal, este material es anisotrópico. Teóricamente, la birrefringencia positiva indica una orientación radial del eje principal de los cristales. Sin embargo, la birrefringencia se mantiene sin cambios en ambas secciones polares y ecuatoriales de gránulos de almidón, lo que indica que los cristales son muy pequeños y presentan múltiples orientaciones (Pérez et al., 2009).

La organización de los gránulos de almidón es radial (Figura 5). El gránulo de almidón está formado por anillos de crecimiento amorfos alternados con anillos de crecimiento semicristalinos con un espesor radial de 120-400 nm (Buléon et al., 1998). La amilosa y las regiones de ramificación de la amilopectina forman las regiones amorfas, mientras que, las capas semicristalinas están constituidas por cadenas externas lineales de amilopectina, las cuales conforman doble hélices cristalinas (Perry y Donald, 2000; Jenkins et al., 1993) (Figura 6).

A partir de patrones de difracción obtenidos mediante rayos X, se han identificado distintos tipos de cristales en el almidón, los cuales se conocen como tipo A, B, C o V (Sarko y Wu, 1978). El tipo de cristal está determinado por la relación amilosa/amilopectina, la distribución de la masa molecular, el grado de ramificación y la longitud de las cadenas externas de amilopectina (Gérard et al, 2001; Zobel, 1988). En general, los almidones tipo A se encuentran en los cereales, mientras que los almidones tipo B se obtienen de tubérculos. La estructura tipo C (que es una estructura intermedia entre la A y la B) es menos común. Los cristales tipo V corresponden a los complejos que se forman entre la estructura de hélice simple de la amilosa y los lípidos u otros agentes formadores de complejos (Lebail et al., 2000).

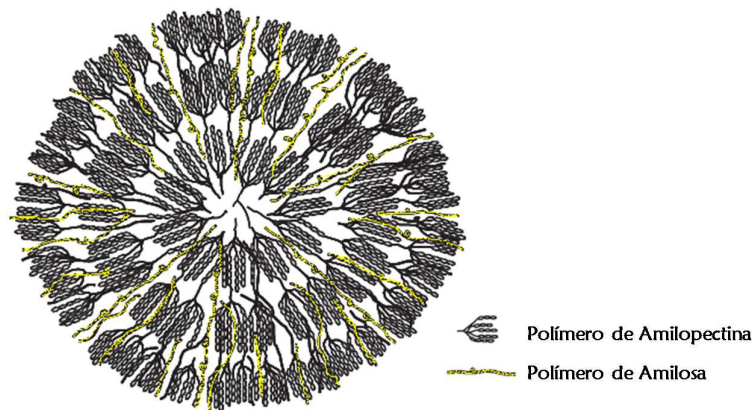


Figura 5: Esquema de la organización radial de anillos de los gránulos de almidón.

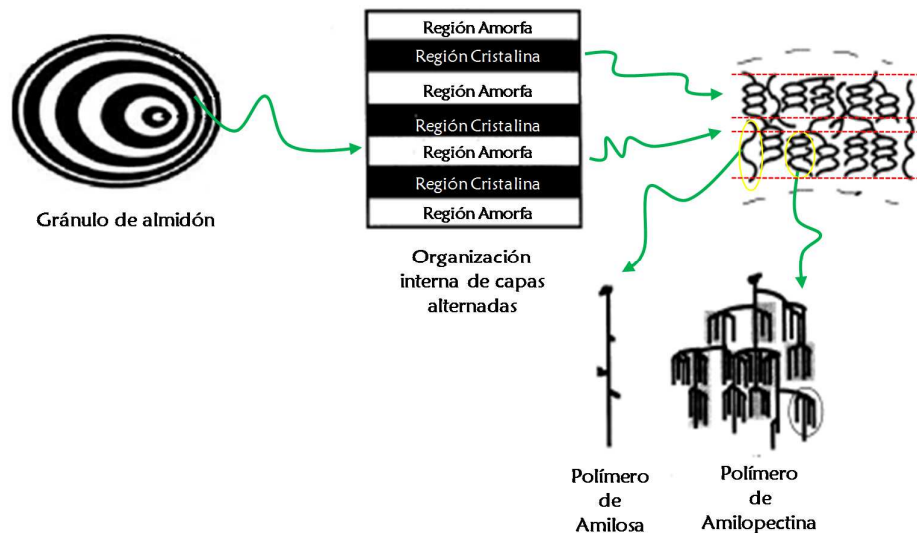


Figura 6: Representación de la estructura en capas de los gránulos de almidón.

Propiedades funcionales del almidón

En la mayoría de los procesos de la industria alimentaria los almidones son calentados en presencia de agua y sometidos a fuerzas de cizalla, y luego enfriados (Copeland et al., 2009). Durante estos tratamientos térmicos se alcanzan temperaturas tales que provocan la pérdida de cristalinidad y organización estructural de los gránulos de almidón.

Las transformaciones que sufren los gránulos de almidón nativos bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad se las conoce como gelatinización (Atwell et al., 1988). Debido a que este proceso es endotérmico, ha sido extensamente investigado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Hongsheng et al., 2009; Baks et al., 2007; Liu et al., 2006; Jenkins y Donald, 1998; Shogren, 1992; Biliaderis et al., 1986; Evans y Haisman, 1982; Donovan, 1979; Stevens y Elton, 1971). En función de las observaciones experimentales realizadas se han propuesto varios

modelos para describir el proceso de gelatinización; sin embargo, a pesar de que en la actualidad existen diferentes enfoques, los cuales difieren en algunas características particulares, el primer modelo propuesto por Donovan (1979) ha sido y continúa siendo en estos días el más popular y aceptado. Numerosos autores, tales como Ratnayake y Jackson (2007), Waigh et al. (2000) y Jenkins y Donald (1998), han utilizado este modelo para explicar diferentes aspectos del proceso de gelatinización, por lo que cada uno de estos estudios ha proporcionado pruebas para la descripción del proceso de gelatinización propuesto por Donovan (1979).

El modelo formulado propone que el proceso de gelatinización se produce en dos etapas, en donde inicialmente las regiones amorfas de los gránulos comienzan a absorber agua e hincharse, para finalmente producir la disrupción de la organización radial cristalina. Según este modelo, la hidratación de las regiones amorfas facilita la movilidad molecular y produce tensiones de ruptura que son transmitidas a través de las moléculas desde las regiones amorfas hasta las cristalinas, lo que provoca la disociación de las dobles hélices de las cadenas de amilopectina y la ruptura irreversible de la estructura cristalina (Tester y Debon, 2000). La gelatinización es un proceso que depende de la cantidad de agua disponible, siendo necesario un nivel mínimo para que se produzca este fenómeno. En condiciones limitantes de agua (menores a ~60% p/p de agua para mezclas almidón/agua) el proceso de gelatinización requiere de mayor temperatura que en condiciones de exceso de agua, ya que la energía se utiliza para fundir a las regiones cristalinas que no alcanzaron a ser desorganizadas por efecto de la hidratación de las regiones amorfas (Biliaderis et al., 1980; Donovan, 1979). Estos procesos fisicoquímicos han sido asociados a eventos endotérmicos. En la Figura 7 se muestra el perfil térmico característico de un almidón obtenido por calorimetría diferencial de barrido, en donde la primera y segunda endoterma (M1 y M2), comúnmente registradas a temperaturas menores a 100 °C, representan las transiciones asociadas con la fusión de los dominios cristalinos de amilopectina, mientras que, el pico registrado a mayores temperaturas (M3) (100-130 °C) constituye la fusión del complejo amilosa-lípido.

La temperatura de gelatinización, determinada por calorimetría diferencial de barrido, de la mayoría de los almidones varía entre 60 °C y 80 °C, en condiciones no limitantes de agua. Las temperaturas elevadas están relacionadas con un alto grado de cristalinidad, lo que indica estabilidad estructural y resistencia de los gránulos a la gelatinización (Barichelo et al., 1990). Asimismo, la entalpía de gelatinización es generalmente interpretada como la cantidad de estructura de doble hélice que es desorganizada durante el calentamiento en presencia de agua (Xie et al., 2008). Sin embargo, debido a que la gelatinización es un proceso cooperativo, la energía absorbida por los gránulos no solamente es utilizada para fundir las estructuras cristalinas, sino que también facilita re-arreglos o formación de nuevos enlaces entre las moléculas que forman la estructura amorfa (Ratnayake y Jackson, 2007).

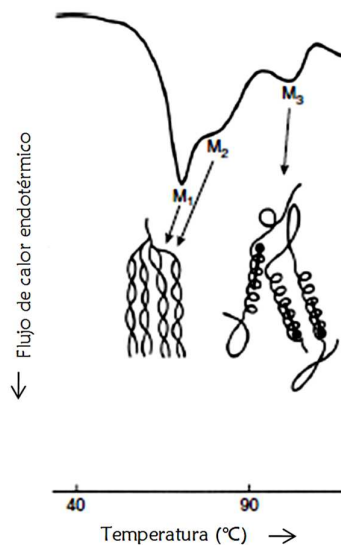


Figura 7: Representación esquemática del perfil térmico del almidón con sus múltiples transiciones de estado y los respectivos dominios estructurales asociados a los cambios de fase. M1 y M2: Transiciones endotérmicas que representan principalmente la fusión del dominio cristalino de amilopectina. M3: Fusión del complejo amilosa-lípido.

Paralelamente a la absorción de agua y al hinchamiento de los gránulos que ocurre durante el calentamiento en presencia de agua, las moléculas de amilosa comienzan a migrar hacia la solución (Figura 8). Como consecuencia de estos procesos, la viscosidad incrementa hasta alcanzar un valor máximo, en donde el número de gránulos hinchados e intactos es el mayor que puede alcanzarse bajo las condiciones de trabajo (Hoseney y Zeleznak, 1986). Si el proceso de calentamiento continúa, se produce una reducción de la viscosidad, debido a que los gránulos tienden a romperse parcial o totalmente y las moléculas de almidón se dispersan en la fase acuosa.

Luego de que el fenómeno de gelatinización tiene lugar y los gránulos de almidón pierden completamente su estructura cristalina, el almidón mantiene aún una estructura granular diferente a la nativa. Esta estructura granular remanente sin orden de los polisacáridos se conoce como gránulos fantasma. Los gránulos fantasmas son la porción no solubilizada de gránulos gelatinizados, los cuales retienen su carácter particulado después de la pérdida del contenido granular. Estos gránulos remanentes tienen características microscópicas típicas dependiendo del origen botánico y genético del almidón, sin embargo, no presentan la organización estructural de los polímeros propia de los gránulos nativos (Obanni y BeMiller, 1996a,b; Prentice et al., 1992; Stark et al., 1983). Hasta el momento los factores estructurales que contribuyen a la integridad de los gránulos fantasma no están claros, y en este sentido se han propuesto algunas hipótesis al respecto (Debet y Gidley, 2007).

Los gránulos de almidón fantasma representan los restos de la envoltura después del colapso de la estructura, donde la mayoría de los polímeros de almidón han sido liberados. Los residuos de

gránulos y estructuras fantasmas han sido analizados mediante difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido, y a partir de esto se ha demostrado que las envolturas fantasmas, presentan una estructura molecular desorganizada con un mayor contenido de proteína que las moléculas internas de almidón en el gránulo (Derek et al., 1992). Atkin et al. (1998) han demostrado que las envolturas fantasmas están compuestas principalmente por amilopectina, y que la amilopectina que forma la superficie posee una estructura y propiedades distintas en comparación con la amilopectina interna.

La dispersión de los fragmentos granulares de almidón y las moléculas dispersas derivan en una suspensión viscosa de almidón, conocida como pasta de almidón. Las propiedades de las pastas dependen de numerosos factores, como el volumen y la rigidez de los gránulos, las propiedades reológicas de la fase continua (formada principalmente por las moléculas de amilosa liberadas del gránulo) y las interacciones entre esta fase y la fase dispersa (gránulos fantasmas). A pesar de esto, diversos estudios muestran que tanto el hinchamiento como la ruptura de los gránulos constituyen los factores más importantes que influyen en las propiedades de las pastas de almidón (Takahashi y Seib, 1988; Eliasson, 1986; Cheer y Lelievre, 1983; Bagley y Christianson, 1982; Wong y Lelievre, 1982). Por otro lado, además de estas características intrínsecas, las propiedades de las pastas son afectadas por factores extrínsecos relacionados con las condiciones de procesamiento, como el pH, la velocidad de calentamiento, etc. (Ross et al., 1987; Voisey et al., 1977). De acuerdo a Doublier (1981), estos efectos pueden dominar a los factores intrínsecos, los cuales están fundamentalmente relacionados con el origen botánico del almidón.

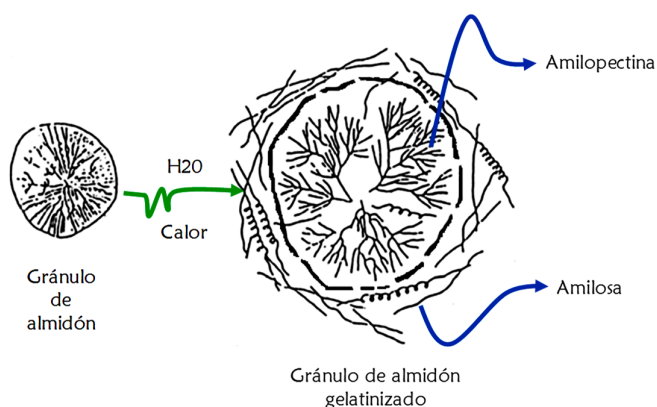


Figura 8: Representación del proceso de gelatinización de los gránulos de almidón.

Cuando una suspensión de almidón gelatinizada es enfriada, la viscosidad del sistema incrementa debido a las interacciones intermoleculares entre amilosa y amilopectina, aunque también entre gránulos y amilosa y entre gránulos (Figura 9). Este proceso que va desde el estado soluble o disperso a otro insoluble, no hinchado y microcristalino se conoce como retrogradación (Waigh et al., 2000; BeMiller y Whistler, 1996; Biliaderis et al., 1986). Cuando la concentración de almidón es

mayor al 6% se forma un gel, que consiste en gránulos gelatinizados enriquecidos en amilopectina (gránulos fantasmas) alojados en una matriz continua de amilosa (Goesaert et al., 2005).

Durante el proceso de gelificación, inicialmente se forman dobles hélices entre las moléculas de amilosa (solubilizadas durante la gelatinización) y se desarrolla una red continua. Luego de algunas horas, las dobles hélices forman una estructura cristalina muy estable. La recristalización de las cadenas laterales cortas de amilopectina es un proceso mucho más lento (varios días o semanas) y ocurre en los gránulos gelatinizados (Miles et al., 1985).

La retrogradación del almidón es influenciada por diferentes condiciones y componentes, como el pH y el contenido acuoso, así como también, por la presencia de lípidos, proteínas, azúcares y ácidos (Eliasson y Gudmundsson, 1996). La retrogradación de amilosa en alimentos procesados es considerada importante debido a su influencia sobre propiedades relacionadas con la adhesividad, la capacidad de absorber agua y la digestibilidad, mientras que, la retrogradación de amilopectina es un proceso más importante en el envejecimiento de productos ricos en almidón, como los panificados (Copeland et al., 2009).

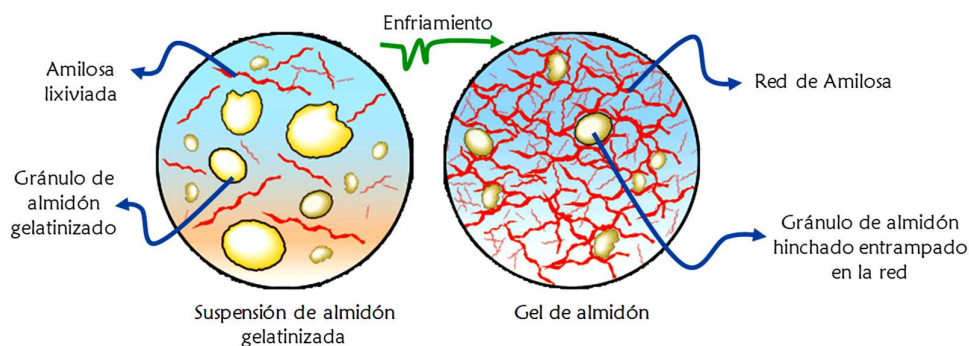


Figura 9: Representación del proceso de gelificación de las suspensiones gelatinizadas de almidón.

Funcionalidad en productos panificados

Tanto la gelatinización como la gelificación del almidón son considerados procesos básicos en la obtención de productos elaborados a partir de matrices ricas en este biopolímero; y las condiciones en las que ocurren estos procesos determinan la calidad del producto final (Rojas et al., 1999).

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

Durante el enfriamiento y el almacenamiento del pan las moléculas de almidón se reasocian dando lugar a la retrogradación (Atwell et al., 1988). La estructura y la firmeza del pan durante las

primeras horas después del horneado están dadas por la retrogradación o gelificación de la amilosa solubilizada. La retrogradación de la amilopeptina ocurre a una velocidad mucho menor que la de amilosa, por lo cual es postulada como uno de los fenómenos responsables del envejecimiento del pan durante su almacenamiento.

El envejecimiento de los productos panificados está definido como la disminución de la aceptación por parte del consumidor causada por cambios que no resultan de la acción de microorganismos dañinos (Betcher, 1955). Durante el almacenamiento, el pan pierde gradualmente su frescura, las alteraciones más notorias son: la pérdida de la crujibilidad de la corteza, el aumento de la firmeza y la disminución de la elasticidad de la miga y los cambios en el aroma y el sabor (Cauvain, 1998). La corteza pierde su textura crocante por la transferencia de humedad desde la miga y el sabor y el aroma se debilitan por la merma en las sustancias volátiles. El desarrollo de la dureza de la miga con el tiempo es un fenómeno en el que influyen diversos factores. La pérdida de humedad de la miga junto con la recristalización de la amilopeptina son los dos mecanismos admitidos como válidos (Gray y BeMiller, 2003; Kulp y Ponte, 1981).

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

Almidón dañado

La molienda del trigo es un proceso mecánico que implica la separación del salvado y el germen del endosperma, y además consiste en la trituración del endosperma con objeto de obtener un tamaño de partícula apto para las distintas aplicaciones industriales y culinarias (Hoseney, 1994a).

El proceso gradual de ruptura del grano de trigo, la recuperación de endospermo adherido inicialmente al salvado y finalmente, la reducción del endospermo a harina, generan innumerables fracciones de productos en un diagrama de molienda industrial. Esto se debe a que posteriormente a cada etapa de reducción de tamaño del grano, el material es tamizado con el propósito de separar las distintas fracciones, primero según su tamaño y luego, de acuerdo a su densidad (Webb y Owens, 2003; Hoseney, 1994d).

La industria molinera debe producir una amplia variedad de harinas adaptadas a las necesidades de sus clientes. Las harinas se definen por distintas características dependiendo de su uso final y del país en el que se produzcan. Los parámetros más comunes son el contenido de proteína,

gluten y de cenizas y la actividad amilásica, mientras que, los atributos relacionados con las masas elaboradas a partir de esas harinas son la absorción de agua, la tenacidad y la extensibilidad. Para alcanzar estas especificaciones se deben seleccionar lotes de trigo que se ajusten a las características adecuadas; y posteriormente se realizan las mezclas de lotes de granos, y en algunos casos de harinas, para conseguir el producto que mejor se adapte a las necesidades de los clientes (Gómez Pallarés et al., 2006).

La molturación se divide en dos fases, trituration y compresión. En la fase de trituration el trigo pasa a través de parejas de cilindros estriados. Uno de los rodillos va más rápido (2,5 veces) que el otro, por lo que mientras el segundo retiene al grano el primero lo cizalla. Esta fase consta de 4 ó 5 parejas de rodillos y en ella se busca separar el endospermo del salvado mediante un raspado progresivo. Tras cada paso por parejas de rodillos el producto obtenido pasa por una batería de cribas y sadores para separar las distintas fracciones. Las fracciones más gruesas (salvado con endospermo adherido) se dirigirán hacia la siguiente pareja de rodillos de trituration. Las fracciones intermedias (sémolas) se dirigirán hacia los molinos de compresión para reducir el tamaño de partícula, y las fracciones que tengan la granulometría de la harina se dirigirán al silo de producto final correspondiente (Gómez Pallarés et al., 2006; Hosney, 1994d).

La composición y calidad de la harina producida a través del proceso de molienda depende de la secuencia de operaciones llevadas a cabo y del grado de separación logrado. En el grano de trigo, los componentes mayoritarios no se encuentran distribuidos uniformemente, lo que da lugar a variaciones en la composición y funcionalidad de las distintas fracciones de harina (Dewettinck et al., 2008).

La integridad de los gránulos de almidón en el endospermo del trigo puede ser afectada por las operaciones mecánicas como la molienda. Durante este proceso una fracción de los gránulos de almidón es dañada, produciendo así lo que se denomina almidón dañado. El nivel de almidón dañado depende de factores genéticos y ha demostrado tener muy poca variación entre trigos de la misma variedad (Baevre et al., 1999). El nivel de daño que sufren los gránulos está relacionado directamente con la dureza del trigo y con las condiciones y tipo de molienda; cuanto mayor sea la resistencia que ofrezcan los granos a la molturación, mayor será el contenido de almidón dañado presente en la harina (Hosney, 1994d). En el endospermo de los granos de trigo maduros, los gránulos de almidón se encuentran incluidos en una matriz proteica (Gillian et al., 1981). Se ha postulado que las diferencias en la dureza de los granos podrían estar relacionadas con la fuerza con que están físicamente atrapados los gránulos de almidón en esta matriz (Barlow et al., 1973). Un grano de textura blanda ofrece una menor resistencia durante la molienda, y la cantidad de almidón dañado es reducida, sin embargo, una dureza mayor ofrece un incremento de la resistencia, y por consiguiente un aumento en la cantidad de almidón dañado (Giroux y Morris, 1997). Bajo condiciones estandarizadas de

molienda, el porcentaje de almidón dañado puede ser utilizado como un indicador para diferenciar entre trigos duros y blandos (Wade, 1988).

El contenido de almidón dañado que regularmente presentan las harinas de trigo ronda alrededor del 5-13%, dependiendo de las características del trigo y de las condiciones de molienda. En relación a esto, Duyvejonck et al. (2007) informaron un rango de almidón dañado entre 5-8% para harinas europeas comerciales, Rehman et al. (2007) entre un 7-13% para 8 harinas de trigos británicos, Colombo et al. (2008) entre un 7-13% para harinas de trigos argentinos y Barrera et al. (2012) entre un 8,5-13% para harinas de trigo obtenidas por molienda industrial.

Los gránulos de almidón dañado presentan pérdida parcial de la birefringencia, alta absorción de agua y son más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Hoseney, 1994d). Los gránulos dañados absorben entre 200 y 430% de su peso en agua a temperatura ambiente, mientras que los gránulos sanos absorben entre un 39 y 87%, lo que deriva en un incremento en la capacidad de absorción de agua de las harinas (Berton et al., 2002). Los gránulos nativos poseen fuertes interacciones entre las cadenas poliméricas en las regiones cristalinas de los gránulos, estructura que impide la penetración del agua, la que puede acceder sólo a las zonas amorfas. Tras la interrupción parcial del orden cristalino a causa del daño mecánico, el acceso del agua resulta menos restringido a estas regiones del gránulo, resultando en un incremento de la capacidad de absorción de agua (Multon et al., 1980). Esta condición, permite que los gránulos dañados de almidón sean más accesibles al ataque de las amilasas propias de la harina, en relación a los sanos, lo que deriva en la producción de dextrinas (Bettge et al., 1995).

Como consecuencia de estos cambios, la presencia de almidón dañado causa alteraciones sobre el comportamiento fisicoquímico y las características reológicas de las harinas y de las masas producidas. El incremento en el contenido de almidón dañado fundamentalmente provoca un aumento en la capacidad de absorción de agua de las harinas (Bushuk, 1998; Tara et al., 1972), lo cual deriva en masas de difícil manipulación. Otro aspecto importante es que debido a su vulnerabilidad enzimática, la presencia de almidón dañado promueve la presencia de glúcidos de bajo peso molecular los cuales afectan la capacidad de retención de agua y la porosidad de las masas, al igual que la textura de los productos terminados (Drapron y Godon, 1987).

En la producción de galletitas el almidón dañado afecta los tiempos de cocción del producto debido a que se deben eliminar excedentes de agua. También, se ha demostrado que los incrementos en el nivel de almidón dañado ocasionan aumentos en la dureza de las masas con la que se elaboran dichos productos (Gaines et al., 1998). Por el contrario, en productos leudados con mayor contenido de agua, como el pan, los incrementos en el contenido de almidón dañado tienden a disminuir la consistencia de las masas y además, afectan el volumen de las piezas de pan y la terneza de las migas. La actividad de las levaduras en la producción de productos fermentados también es afectada por la presencia de almidón dañado, ya que la producción de oligosacáridos a partir de la degradación

enzimática de los gránulos dañados altera la producción de dióxido de carbono durante la fermentación (Bettge et al., 1995; Lin y Czuchajowska, 1996; Pomeranz, 1988). Además de estas modificaciones, Kihlberg et al. (2004) han sugerido que el almidón dañado, junto a otros factores, tiene influencia en diferentes parámetros de la calidad sensorial.

Polisacáridos no almidonosos

Los polisacáridos no almidonosos, en el grano de trigo, incluyen distintas moléculas construidas a partir de hexosas y pentosas (pentosanós). Los pentosanós son carbohidratos complejos altamente ramificados y de alto peso molecular que incluyen los arabinóxilanos y arabinogalactanos. Aunque estos componentes constituyen sólo el 1,5-2,5% de la harina de trigo, influyen fuertemente en su funcionalidad durante el proceso de panificación.

Los pentosanós se clasifican en solubles (PS) o insolubles en agua (PI), y comprenden, respectivamente, el 25 y 75% del total de estas sustancias presentes en la harina de trigo (Wang et al., 2003; Meuser y Suckow, 1986). Su estructura y su aspecto resultan en propiedades físicoquímicas únicas que afectan fuertemente su funcionalidad en la producción de panificados. La habilidad de los pentosanós para retener agua y formar soluciones viscosas o geles por uniones covalentes probablemente afecta la distribución de la humedad entre los constituyentes de una masa panaria, alterando la formación del gluten y las propiedades reológicas del sistema (Kim y D'Appolonia, 1977a). Se ha estimado que durante la preparación de una masa, un cuarto (1/4) del agua agregada es retenida por estos compuestos (Atwell, 1998). Los pentosanós insolubles en agua causan un impacto negativo debido a que actúan limitando la agregación del gluten, como consecuencia de impedimentos estéricos (van Oort et al., 1995), absorben una gran cantidad de agua, limitando su disponibilidad para el desarrollo del gluten, y causan la coalescencia de las celdas de gas, lo que resulta en un deterioro de la calidad del pan (Courtin y Delcour, 2002; Courtin et al., 1999). Por el contrario los pentosanós solubles en agua, causan un impacto positivo debido a que actúan disminuyendo la velocidad de difusión del dióxido de carbono en la masa estabilizando las celdas de gas. Además, incrementan la viscosidad de la fase acuosa de la masa aumentando su estabilidad e incluso mejoran las características del pan: como el volumen de pan y la firmeza y estructura de la miga (Gan et al., 1995; Hoseneý, 1984).

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

Lípidos

El grano de trigo contiene una cantidad relativamente pequeña de lípidos entre 1,5 y 2%. Los lípidos de la harina de trigo constituyen un grupo heterogéneo de compuestos con diferentes estructuras químicas y composición. En el patrón de ácidos grasos de los lípidos de una harina de trigo se encuentran el ácido linoléico y en menor cantidad el ácido palmítico y el ácido oleico (Eliasson y Larsson, 1993b).

Los lípidos se pueden encontrar libres o unidos a otro constituyente de la harina, como almidón y proteínas. Los lípidos asociados al almidón comprenden en gran parte lisofosfolípidos que forman complejos de inclusión con la amilosa durante la gelatinización del almidón, sin embargo, estos complejos también se encuentran en el almidón nativo del cereal (Morrison et al., 1993). Esta fracción de lípidos se encuentra dentro de los gránulos de almidón y sólo queda disponible cuando se alcanzan las condiciones de gelatinización, por lo que no afectan significativamente los productos de panificación. La fracción de lípidos que no está asociada al almidón está constituida por cantidades similares de lípidos polares y no polares. Estos lípidos se encuentran libres o unidos principalmente a proteínas. Los lípidos que se encuentran libres son polares, principalmente glico y fosfolípidos, mientras que los lípidos no polares, mayormente triglicéridos, son los que se encuentran asociados a las proteínas (Eliasson y Larsson, 1993b; Chung, 1986). Los lípidos no polares de la harina de trigo tienen un efecto negativo sobre el proceso de panificación (Macritchie, 1981), mientras que los lípidos polares ejercen un efecto positivo principalmente sobre las propiedades reológicas de la masa (Graybosch et al., 1993), volumen de pan (Eliasson y Larsson, 1993b), firmeza y uniformidad de la miga. Probablemente la funcionalidad de los lípidos está relacionada con su efecto sobre la estabilización de las celdas de gas. La influencia positiva de los lípidos polares está atribuida a su habilidad en formar monocapas lipídicas en las interfaces gas / líquido de las celdas de gas en la masa de pan, y así incrementar la retención de dióxido de carbono durante la fermentación en la elaboración de productos leudados (Gan et al., 1995). Se conoce también que los mono y diglicéridos actúan retardando la velocidad de endurecimiento del pan, ya que forman complejos de inclusión con la amilosa disminuyendo su retrogradación (Olesen et al., 1994; Johnson y Welch, 1968).

Componentes minoritarios

Los minerales también están en muy pequeña proporción en el grano de trigo y su presencia es aún menor en el endospermo (< 1%). Los componentes mayoritarios de esta fracción son los fosfatos y sulfatos de potasio, magnesio y calcio. También se encuentran cantidades significativas de hierro, magnesio, zinc y cobre (Matz, 1999).

Entre las enzimas, las que han recibido mayor atención son las amilolíticas, o enzimas que digieren el almidón, debido a que los efectos de estos catalizadores biológicos son muy importantes durante la producción de productos panificados. Las principales enzimas hidrolíticas que actúan sobre

los carbohidratos presentes en los cereales son α - y β -amilasas, enzimas desramificantes, celulasas, β -gluconasas y glucosidasas. En general, en la producción de panificados la α -amilasa provee fragmentos de oligosacáridos al medio, los cuales pueden ser utilizados por la β -amilasa, favoreciendo así la producción de maltosa y glucosa, y por consiguiente, la actividad de las levaduras en productos fermentados. El trigo contiene también un gran número de enzimas proteolíticas. Otro grupo importante son las lipasas, estearasas y fosfatasa, fitasas, lipooxigenasas y polifenoloxidasas, entre otras (Matz, 1999; Hosenev, 1994c).

PRODUCCIÓN DE PAN

El pan es un producto leudado, que se obtiene por la fermentación de monosacáridos o disacáridos de la harina de trigo, los que son productos de la hidrólisis del almidón por la acción de las enzimas α - y β -amilasas propias de la harina. El proceso de elaboración de pan involucra importantes procesos físicos, físico-químicos y bioquímicos que transforman la masa viscoelástica, en una miga esponjosa y una corteza crujiente. Los productos de panificación de este tipo han ido evolucionando a diferentes formas y características distintivas de la zona de producción. Cada región ha desarrollado su método de panificación tradicional de acuerdo a la calidad de la materia prima disponible y a las características exigidas por los consumidores.

Para la obtención de este tipo de producto es necesario utilizar una harina de alta calidad panadera, es decir harinas fuertes con una suficiente cantidad y calidad de proteínas, a partir de la cual es posible obtener una buena estructura de la red de gluten, responsable de la textura ligera y la miga aireada características de esta clase de panificado.

El proceso de elaboración de pan generalmente involucra una etapa de formación de la masa, un periodo de fermentación y finalmente la cocción. Durante el mezclado y amasado, los componentes de las harinas se hidratan y posteriormente la mezcla se transforma en una masa viscoelástica homogénea. El aire incorporado durante el amasado forma los núcleos de las celdas de gas que serán expandidos durante la fermentación y el horneado. La presencia de aire, y específicamente oxígeno molecular, es esencial para un óptimo desarrollo del gluten con buenas características reológicas. Durante la fermentación, las levaduras producen principalmente dióxido de carbono y etanol como resultado de una serie compleja de reacciones controladas por enzimas. Ambas sustancias se disuelven en la fase acuosa de la masa por lo que su pH disminuye. Cuando esta fase se encuentra saturada de dióxido de carbono, se produce su liberación hacia las celdas de aire creadas durante el proceso de amasado y, consecuentemente, su expansión y el aumento de volumen de la pieza. En la etapa de la cocción, a medida que la temperatura de la pieza de masa aumenta, hasta temperaturas cercanas a 100 °C en el interior, y a temperaturas superiores en la superficie; la masa se expande hasta un 50% en la primer etapa del horneado debido a un aumento en la producción de dióxido de carbono (hasta que las células de levaduras son inactivadas) y un aumento en la

vaporización de otras sustancias como etanol y mezclas de etanol-agua. A medida que la matriz interna se cocina, la estructura de la masa cambia a una estructura tipo esponja con celdas de gas interconectadas. La viscosidad incrementa rápidamente por arriba de 60 °C debido a la gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas del gluten, produciéndose así la fijación de la estructura. En las etapas posteriores del horneado se producen las reacciones de oscurecimiento de la corteza (Hoseney, 1994e).

PRODUCCIÓN DE GALLETITAS

La producción de galletitas representa una fracción muy importante de la industria de alimentos en la mayoría de países del mundo, ya que presentan una vida útil relativamente larga y en general poseen una buena relación calidad-precio, a lo que se suma el gusto y la debilidad de los consumidores por el azúcar. Existen diferentes tipos de galletitas dulces, dependiendo de la región donde se produzcan y de las demandas de los consumidores y distintas tecnologías de producción.

En la elaboración de galletitas por moldeo se requiere altos contenidos de grasa y azúcar y no se requiere desarrollo de la estructura de gluten, por lo tanto, es deseable una harina de trigo con un menor contenido y calidad de proteínas que la empleada para elaborar pan, si se pretende conseguir un producto de buenas características. En Argentina, la industria galletitera, utiliza harinas poco adecuadas obtenidas a partir de trigo pan para la producción de esta clase de productos, ya que en nuestro país no está desarrollado el cultivo de trigos blandos, propicios para la elaboración de esta clase de panificado. Frente a la imposibilidad de contar con variedades más apropiadas para la elaboración de galletitas, se emplean harinas provenientes de trigo pan de baja calidad, a las que se le incorporan aditivos específicos, y se producen modificaciones en los procesos de elaboración para minimizar la formación de gluten (Moiraghi et al., 2005).

Las formulaciones de galletitas dulces son diversas, pero en general las proporciones de agua en las masas de este tipo de producto son muy bajas, mientras que las de azúcar y grasa son elevadas. El proceso de producción de galletitas de estas características involucra la formación de la masa, el moldeo y la cocción. Para la obtención de la masa, es necesario preparar una crema con el azúcar, materia grasa y agua, la cual llevará disuelto el leudante químico, bicarbonato de sodio. Estos ingredientes son mezclados, y durante este procedimiento el aire se incorpora en el sistema. Posteriormente la harina es incorporada a la crema, y mediante un mezclado muy corto se obtiene una masa con características plásticas y cohesivas. Debido a las limitadas proporciones de agua y a las altas concentraciones de azúcar y grasa, las proteínas y el almidón se hidratan escasamente, y sumado al corto tiempo de amasado, el desarrollo del gluten es muy limitado. Durante la cocción de este tipo de masas, en los primeros minutos de calentamiento la masa comienza a ablandarse ya que la grasa funde, al mismo tiempo el azúcar se disuelve, lo que contribuye a la extensión de la pieza. El dióxido de carbono producido por el leudante químico, difunde dentro de las burbujas de aire incorporadas

a la masa incrementando su tamaño y finalmente escapa al ambiente. Con el continuo calentamiento del sistema, las proteínas dispersas en la masa, forman una estructura continua la cual se expande por el incremento del tamaño de las burbujas de aire. La expansión de la masa se detiene debido al aumento de la viscosidad y al colapso repentino de la estructura, y posteriormente se producen las reacciones de oscurecimiento y coagulación de las proteínas, sellándose finalmente la estructura (Manley, 2000).

GENERALIDADES DEL GRANO Y HARINA DE TRITICALE

El triticale es un híbrido resultante del cruzamiento entre el trigo (*Triticum* sp.) y el centeno (*Secale* sp.). Los granos son de mayor tamaño que los granos de trigo y su estructura granular es similar a la de sus progenitores (Amaya y Peña, 1991). El triticale posee la rusticidad y la tolerancia a las condiciones climáticas adversas del centeno, además de algunas características propias de los granos de trigo. La composición química del grano de triticale guarda similitudes con la de trigo y centeno, con valores intermedios en mucho de los parámetros, además de poseer numerosas virtudes a nivel nutricional, herencia proveniente del centeno. Pese a que la calidad nutricional y la cantidad de proteínas de los mejores triticales son en algunos casos superiores a algunas variedades de trigo, este cultivo no está muy difundido debido a la falta de oportunidades para elaborar productos industriales (Cooper, 1985). En nuestro país no es un cultivo popular, aunque en 1985 su cultivo se extendió a 25000 ha, siendo la mayor superficie sembrada la región Oeste de la provincia de Buenos Aires y Este de la provincia de La Pampa. Este cultivo en Argentina se utiliza comúnmente como forraje, aunque podría ser empleado para la elaboración de productos no fermentados como las galletitas, productos que deberían producirse a partir de harinas de trigo blandos. Existe evidencia de que las harinas derivadas del triticale podrían ser utilizadas en la elaboración de productos que no requieran un desarrollo de gluten tenaz, tales como las galletitas, tortas y bizcochos, ya que la mayoría de la harinas de este cereal presentan una buena aptitud para elaborar este tipo de productos (Pérez et al., 2003; Ramírez et al., 2003; Aguirre et al., 2002; Rubiolo et al., 1998; León et al., 1996; Peña y Amaya, 1980; Tsen, 1974). Esto se debe a la presencia de determinadas fracciones de proteínas, contenido de pentosanos y porcentaje de almidón dañado, componentes asociados con la capacidad de retener agua de una harina (Roccia et al., 2006; Torri et al., 2003; León et al., 1996). En función de esto, generalmente las harinas de triticale producen masas blandas y con propiedades diferentes a las masas de trigo, lo que está directamente relacionado con el mayor contenido de proteínas hidrosolubles en las harinas de triticale, que resulta en una menor proporción de proteínas de gluten (León et al., 1996). A pesar de esto, se han obtenido panes de buena calidad con mezclas de partes iguales de harina de trigo y triticale (Naeem et al., 2002; Peña y Amaya, 1992). También se ha demostrado que la incorporación de hasta un 10% de harina de triticale en una formulación de pan basada en harina de

trigo produce un incremento en el volumen de la piezas obtenidas respecto a los panes elaborados con 100% de harina de trigo (Doxastakis et al., 2002).

Con estas condiciones, este cereal se muestra como una posible alternativa de cultivo para regiones semiáridas debido a su gran capacidad de adaptación bajo estas condiciones climáticas, lo que permite extender la producción de los granos a regiones consideradas marginales para el trigo (Moita Brites et al., 2006; Lelley, 1992).

ADITIVOS

A pesar de que diversos aditivos son aplicados en las formulaciones de productos panificados, el uso de enzimas se encuentra ampliamente extendido en relación a los demás. Las enzimas son catalizadores biológicos específicos capaces de actuar bajo condiciones moderadas de pH y temperatura. Actúan en pequeñas cantidades, acelerando la velocidad de una determinada reacción sin consumirse, son muy específicas ya que pueden modificar un único sustrato de una mezcla de moléculas similares; y muy selectivas porque pueden modificar un único enlace.

La industria de panificados consume una gran variedad de enzimas, el uso de este tipo de aditivo es un recurso muy utilizado ya que mejoran la calidad de las harinas y promueven la conservación de los productos panificados. Las enzimas empleadas en la industria panadera se pueden utilizar para modificar el almidón, las proteínas, los pentosanos y los lípidos de la harina de trigo, con el objetivo de causar alguna alteración en su estructura y mejorar su funcionalidad en los productos; ya sea durante la elaboración como en el producto final.

Las enzimas amilásicas son las más populares y las primeras enzimas aplicadas en panificación. Entre ellas se han utilizado α - y β -amilasas y, en menor medida amiloglucidasas (Wursch y Gummy, 1994; Cole, 1982; De Stefanis y Turner, 1981; Vidal y Gerrity, 1979). Aunque la α -amilasa y la β -amilasa se encuentran naturalmente en la harina, estas son adicionadas rutinariamente a las harinas. Las amilasas adicionadas a las harinas son capaces de generar modificaciones sobre las moléculas de amilosa y amilopectina, degradan el almidón presente en la harina produciendo azúcares y dextrinas de bajo peso molecular (Bowles, 1996). Por lo tanto, el efecto de estas enzimas se debe principalmente a que incrementan el contenido de azúcares fermentables (Bowles, 1996) y de azúcares reductores. Los azúcares fermentables sirven de nutrientes para las levaduras aumentando la producción de dióxido de carbono, mientras que los azúcares reductores promueven la generación de los productos de la reacción de Maillard intensificando el sabor, el aroma y el color del pan (Bowles, 1996; Drapron y Godon, 1987). Además de esto, se ha demostrado que las dextrinas producidas por acción enzimática interfieren con la retrogradación de la amilopectina, lo que provoca una disminución del endurecimiento de las piezas de pan (Rojas et al., 2001; Defloor y Delcour, 1999; Min et al., 1998; León et al., 1997).

Para el empleo de los distintos aditivos se requiere un amplio conocimiento de su mecanismo de acción y de las propiedades del sistema donde serán aplicados. A continuación se describen las características principales de las enzimas empleadas en este trabajo de tesis.

- **α -amilasa**

La α -amilasa es una enzima que hidroliza enlaces glucosídicos D- α (1,4) de los carbohidratos cada tres o más unidades de glucosa. Este tipo de enzima actúa sobre el almidón y sobre polisacáridos y oligosacáridos relacionados, degradando los enlaces en forma aleatoria. La α -amilasa cataliza la hidrólisis de la amilosa y de las ramificaciones de la amilopectina, rompiendo enlaces del interior de los polímeros (endo-enzima), obteniéndose principalmente una mezcla de dextrinas de variada longitud, con una baja proporción de maltotriosa y maltosa (Goesaert et al., 2009; van der Maarel et al., 2002) (Figura 10).

La incorporación de esta enzima en la formulación de productos panificados mejora el volumen de las piezas, como así también la textura de los productos. Asimismo, esta enzima ha demostrado tener un efecto positivo sobre el control del envejecimiento de las piezas de pan cocidas durante el almacenamiento, ya que tienden a mejorar la retención de la suavidad de los productos horneados a lo largo del tiempo (Sahlstrom y Brathen, 1997; Cole, 1982). Estos efectos positivos sobre el retardo en el endurecimiento se detectan sólo después de 3-4 días de almacenamiento (Olesen, 1991). La incorporación de este aditivo puede traer aparejado un aumento de la gomosidad de las piezas de pan, lo cual está relacionado con la producción de maltodextrinas ramificadas (De Stefanis y Turner, 1981). A pesar del efecto anti-envejecimiento de este aditivo enzimático, el uso de α -amilasas como agente anti-envejecimiento no es generalizado, debido a que una ligera sobredosis resulta en un incremento de la pegajosidad del producto panificado (De Stefanis y Turner, 1981).

- **Amilasa maltogénica**

La amilasa maltogénica es una enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos D- α (1,4) de los polisacáridos. Esta enzima puede ser clasificada como una endo- o exo-amilasa, ya que su patrón de acción y especificidades no están claras aún. Algunos reportes sugieren que esta enzima actúa como un exo-amilasa (Kragh, 2002; Bowles, 1996), sin embargo, en concordancia con las características de una endo-amilasa, esta enzima no requiere un extremo no reductor, y no invierte la configuración anomérica (Christophersen et al., 1998). Se han propuesto numerosos patrones de acción para esta enzima, los cuales en su mayoría consideran que ejerce un patrón de ataque múltiple (Bijttebier et al., 2008; Robyt y French, 1967). Empleando amilosa como sustrato se ha encontrado que durante los primeros estadios de la hidrólisis esta enzima presenta una acción similar a la β -amilasa (exo-enzima), sin embargo, a mayores periodos de incubación y particularmente a mayores temperaturas ejerce una acción endo-enzimática.

La amilasa maltogénica degrada los polímeros de almidón y polisacáridos y oligosacáridos relacionados liberando casi exclusivamente maltosa, además de dextrinas, mediante la remoción sucesiva de residuos de α -maltosa a partir de los extremos no reductores de las cadenas poliméricas (Goesaert et al., 2009; van der Maarel et al., 2002) (Figura 10).

Esta enzima es una de las amilasas más eficaces a la hora de mitigar los efectos de endurecimiento en panificados, por lo que es muy utilizada en la elaboración de este tipo de productos. El uso de esta enzima no trae aparejado ningún efecto secundario desventajoso al sistema, lo que torna a este aditivo una excelente alternativa (Derde et al., 2012; Goesaert et al., 2009; Olesen, 1991).

- **Amiloglucosidasa**

La amiloglucosidasa o glucoamilasa es una exo-enzima que hidroliza enlaces glucosídicos D- α -(1,4) y -(1,6) de los extremos no reductores de los polímeros de almidón, amilosa y amilopectina. Esta enzima actúa sobre los residuos externos de glucosa de los polímeros de amilosa y amilopectina, y por lo tanto, la hidrólisis sucesiva produce sólo la liberación de β -D-glucosa, a pesar de que esta enzima tiene una menor actividad sobre los enlaces α -(1,6) respecto a la degradación a los α -(1,4) (Figura 10). Además de esto, la glucoamilasa posee la capacidad de convertir la configuración anomérica de la maltosa liberada de α a β (Goesaert et al., 2009; van der Maarel et al., 2002).

Al igual que las anteriores enzimas descritas, la amiloglucosidasa ha demostrado ser un aditivo enzimático capaz de retrasar el efecto del envejecimiento en productos leudados como el pan (Wursch y Gumy, 1994; Van Eijk, 1991; Vidal y Gerrity, 1979), aunque se encuentra un escaso número de trabajos con la utilización de esta enzima en la producción de panificados.

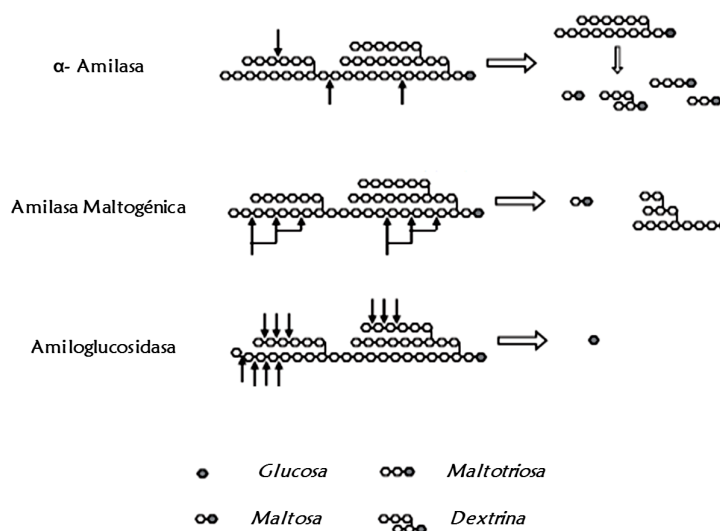


Figura 10: Representación de la acción enzimática y los productos de hidrólisis de la α -amilasa, amilasa maltogénica y amiloglucosidasa sobre los polímeros de almidón.

El consumo de harina en Argentina fue de 94 kilos per cápita en el año 2012. Los argentinos consumen 64 kg per cápita de pan artesanal, 10 kg de pastas, 9 kg de harina fraccionada, 7 kg de galletitas y sólo 4 kg de panificados industriales, según datos de la Federación Argentina de la Industria Molinera. En este sentido, considerando que el pan y las galletitas son de consumo generalizado, es de suma importancia mejorar su calidad y resolver diferentes problemáticas asociadas a su producción y conservación.

La harina es la materia prima principal de estos productos, y por lo tanto sus características fisicoquímicas son las que definen fundamentalmente su calidad final. En general, aunque dependiendo del tipo de producto a elaborar, se pretende que una harina contenga una adecuada proporción y calidad de proteínas, para que cuando se hidraten produzcan un gluten satisfactorio respecto a la elasticidad, resistencia y estabilidad. Otro componente de las harinas que puede afectar la calidad de los panificados es el contenido de almidón dañado, debido a que modifica fundamentalmente la absorción de agua de las harinas y altera el desempeño de las masas obtenidas durante los procesos de producción.

Pese al avance en el conocimiento de las modificaciones en las propiedades de las harinas que produce la presencia de almidón dañado, no se ha establecido claramente su incidencia sobre la calidad panadera de las harinas, independientemente del papel que juegan los demás componentes. Además, poco se conoce hasta el momento sobre las posibles acciones que puedan contribuir a compensar los efectos de elevados contenidos de almidón dañado sobre los productos de panificación, y las modificaciones que pudieran llegar a generarse sobre las características reológicas de las masas y la calidad de los productos finales a causa de los efectos de una posible mitigación.

A lo largo de este trabajo se han abordado diferentes aspectos de esta problemática. En el primer capítulo se detalla el efecto del contenido de almidón dañado en harinas de cultivares de trigo y triticale, independientemente de la función de los demás componentes. A partir de estos resultados y mediante la utilización de un sistema modelo de dos componentes constituido por almidón y proteínas, en el segundo capítulo, se describe el efecto del almidón dañado sobre las propiedades reológicas y térmicas de las masas panarias, y el efecto del agregado de enzimas amilásicas sobre estas características. Con todo este estudio previo y la evidencia encontrada, en el tercer y cuarto capítulo, a través de un sistema compuesto únicamente por almidón, se profundiza respecto a la influencia del contenido de almidón dañado sobre características reológicas y los procesos de gelatinización y retrogradación, y los efectos de la molienda sobre la estructura granular. Finalmente, como cierre de este estudio, a partir de harinas obtenidas industrialmente, en el quinto capítulo se analiza la contribución efectiva de las enzimas amilolíticas como aditivos para la corrección de harinas con elevados niveles de almidón dañado, sobre la producción de galletitas dulces y pan.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la influencia del contenido de almidón dañado sobre la calidad de las harinas para elaborar productos de panificación y analizar los efectos ocasionados por el uso de enzimas en la atenuación de los inconvenientes provocados por el almidón dañado.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del contenido de almidón dañado sobre las propiedades fisicoquímicas de las harinas.
- Estudiar el impacto del almidón dañado sobre el comportamiento reológico de las masas y la calidad de los productos de panificación.
- Analizar el efecto del contenido de almidón dañado sobre el comportamiento reológico, la microestructura y las transiciones de estado sufridas por el almidón.
- Analizar el efecto del daño mecánico sobre la estructura de los gránulos de almidón.
- Estudiar la capacidad de diferentes enzimas amilolíticas para mitigar los problemas de calidad de los productos de panificación derivados del uso de harinas con niveles elevados de almidón dañado.

Capítulo 1

*Análisis de los efectos del almidón dañado
sobre la calidad de las harinas y los
panificados*

Materiales y Métodos

1. Obtención de harinas con diferente nivel de almidón dañado

1.1 Muestras empleadas

Se utilizaron granos de dos cultivares de trigo con diferentes comportamientos en panificación, Klein Don Enrique y Baguette, y de un cultivar de triticale, Tatú.

La Estación Experimental Marcos Juárez del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) proporcionó las muestras de trigo, mientras que el Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC proveyó el cultivar de triticale.

1.2 Obtención de harinas

La molienda de los granos se realizó en dos etapas con el propósito de obtener harinas con distintos porcentajes de almidón dañado. La primera etapa se llevó a cabo en un molino de rodillos Agromatic AG AQC 109 (Laupen, Suiza). Para la segunda etapa, una fracción de cada lote de harina se re-molió en un molino de disco Whisper Series Bench Top (Rocklabs, Nueva Zelanda) por diferentes periodos de tiempo con el propósito de provocar una mayor ruptura de los gránulos y obtener harinas con porcentajes más elevados de almidón dañado. En el caso de las harinas provenientes de ambos trigos una fracción de cada lote se sometió a re-molienda durante 2 min, otra durante 5 min y una tercera parte no se sometió a este proceso; las fracciones del lote de harina del triticale se trataron durante 3,5 y 7 min, y al igual que los trigos, una tercera fracción no se sometió a este tratamiento. De esta manera se obtuvieron un total de nueve muestras.

Durante la re-molienda de las harinas la temperatura se monitoreó y controló para mantenerla por debajo de 40 °C.

2. Determinación de la dureza de los granos (Método 55-30; AACC, 2000)

La dureza de los granos se determinó a partir del método del Índice de tamaño de partícula (PSI, Particle Size Index). Este índice se utiliza para predecir la dureza del grano y por lo tanto, la finalidad y calidad de la harina obtenida.

Se utilizaron granos limpios y con un contenido de humedad no superior al 14 y 15% para los granos de triticale y trigo, respectivamente. Se molieron los granos en un molino Agromatic AG AQC 109 (Laupen, Suiza) al que previamente se le retiró el tamiz para obtener una molienda completa de los granos. Consecutivamente se pesó una fracción de la harina obtenida, a la cual se le adicionó granos limpios, los cuales tuvieron como objetivo facilitar el tamizado de la harina, y se tamizó a través de una malla N° 200 ó de 75 μm en un vibrador para tamices MACOTEST. Posteriormente el material tamizado se pesó y el porcentaje PSI se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% PSI = \frac{W}{W_1} * 100$$

W: Peso de la harina tamizada.

W₁: Peso de la muestra original.

Para obtener la dureza relativa, el valor obtenido para cada cultivar se comparó con los valores de la Tabla 1.1

Tabla 1.1. Relación entre la dureza relativa del grano y el porcentaje PSI.

% PSI	Categoría
Hasta 7	Extra duro
8-12	Muy duro
13-16	Duro
17-20	Medianamente duro
21-25	Medianamente blando
26-30	Blando
31-35	Muy blando
>35	Extra blando

3. Composición y calidad de las harinas

3.1 Porcentaje de humedad (Método 44-19, 44-01; AACC, 2000)

El contenido de humedad se determinó por diferencia de pesada antes y después de calentar 2,00±0,01 g de harina a 135±2 °C durante 2 h en estufa isotérmica de calentamiento eléctrico con circulación de aire forzado.

3.2 Porcentaje de proteínas en harinas (Método 46-13; AACC, 2000)

El contenido de nitrógeno se determinó por el Micro Método de Kjeldahl. La determinación se llevó a cabo en tres etapas:

1. Mineralización

Se mineralizó toda la materia orgánica presente en 100 mg de harina con H₂SO₄ a 400° C para lo cual se empleó un bloque de digestión MB-6, Raya (R. Espinar SL, España).

2. Destilación

El amoníaco resultante, a partir de la forma de NH₄HSO₄ en medio básico, se destiló sobre ácido bórico en una unidad de destilación VELP Científica Modelo UDK 126 A (Milán, Italia)

3. Titulación

El amoníaco recolectado como $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_4$ se tituló con ácido clorhídrico. El contenido porcentual de proteínas totales se calculó como: $\%N \times 5,7$; donde $\%N$ es el porcentaje de nitrógeno determinado por titulación y 5,7 el factor que se utiliza para proteínas de cereales; este factor depende del contenido de aminoácidos aminados de las proteínas.

3.3 Determinación del contenido de Almidón Dañado

El contenido de almidón dañado se determinó mediante hidrólisis enzimática con α -amilasa fúngica (Método 76-30A; AACC, 2000) y posterior titulación de azúcares reductores (Método 80-60; AACC, 2000). A partir de esta técnica es posible determinar el porcentaje de almidón en harinas que es susceptible a la hidrólisis con α -amilasa. El almidón dañado presente se define como los gramos de almidón sujetos a la hidrólisis enzimática por cada 100 g de muestra sobre una base del 14% de humedad.

Durante la etapa de hidrólisis de este método, el almidón, debido al uso de la enzima α -amilasa del *Aspergillus Oryzae*, da origen a una solución rica en maltosa, en donde el 61% del almidón es convertido en este disacárido. Mediante una posterior titulación de azúcares reductores de esta solución, la cual utiliza tiosulfato de sodio como titulante, es posible determinar la concentración de maltosa a partir de una tabla (Método 22-18; AACC, 2000) que permite relacionar el volumen del titulante, obtenido de la diferencia entre el volumen utilizado para titular el blanco y el volumen usado para titular la muestra, con los mg de maltosa por cada 10 g de harina; finalmente este valor es multiplicado por el factor 0,082 obteniéndose de esta forma el porcentaje de almidón dañado presente en una muestra.

El valor 0,082 deriva de $(1,64/100)*5$, se multiplica por 5 para obtener los mg de maltosa por cada 10 g de muestra, desde una dilución 1:50 usada en este método y una dilución 1:10 usada en el método de titulación. Debido a que bajo las condiciones de esta técnica el 61% del almidón es convertido en maltosa, la multiplicación del recíproco de 0,61 (1,64) es necesaria para convertir los mg de maltosa a mg de almidón hidrolizado por cada 10 g de muestra, la división de este término por 100 lo convierte en unidades porcentuales.

3.4 Determinación del contenido de amilosa

El contenido de amilosa de las muestras deslipidizadas se determinó por espectrofotometría UV a través de la reacción que la molécula de amilosa establece en presencia de yodo, método colorimétrico de Samec y Mayer 1983 (Morrison y Laignelet, 1983). Se utilizó amilosa de maíz de grado analítico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) como estándar para la calibración.

La deslipidización de las harinas se realizó por extracción continua sólido-líquido por medio de un sistema tipo Soxhlet, durante 12 h, utilizando n-hexano como solvente de extracción (Método 30-25; AACC, 2000).

Las harinas deslipidizadas (30 mg) se solubilizaron en NaOH 1M (5 ml) y agua (5 ml) durante 20 min a 100 °C. A una alícuota diluida en agua y acidificada con HCl 0,5N de cada muestra se le

agregó una solución de yodo (I_2 -KI, 2% KI, 0,2% I_2) para formar el complejo color azul característico, el cual luego de 30 min se cuantificó espectrofotométricamente a 600 nm. Los valores de absorbancia se transformaron en contenidos (g amilosa/100 g) de amilosa a partir de una curva de estándares preparada mediante soluciones de amilosa de maíz.

3.5 Determinación del gluten húmedo (Método 38-10; AACC, 2000)

El contenido de gluten húmedo de las harinas se determinó a partir del lavado manual de una masa armada con 10 g harina y 6 ml de agua. Una vez removidos todos los componentes solubles en agua como el almidón, los pentosanos y las proteínas solubles, el gluten obtenido se expresó como porcentaje de la muestra.

El gluten húmedo obtenido no sólo consta de proteína pura, sino que también, conserva lípidos, cenizas y restos almidón.

El contenido de gluten húmedo es un indicativo de la capacidad que poseen las proteínas para formar gluten, por lo tanto, es un parámetro que comúnmente se utiliza para predecir la calidad panadera de una harina (Gómez Pallarés et al., 2006).

3.6 Determinación de la actividad amilásica - Falling Number (Método 56-81 B; AACC, 2000)

Este método se basa en la capacidad que posee la α -amilasa para licuar un gel de almidón. Para la determinación de la actividad enzimática de la α -amilasa, las harinas se suspendieron en agua y posteriormente se sometieron a calentamiento y agitación. La actividad de la enzima es medida por el índice de caída (FN), definido como el tiempo en segundos necesario para dejar caer el agitador una distancia medida a través de una suspensión de harina caliente. El equipo de *Falling Number* registra los segundos que tarda en caer el agitador debido a la disminución de la viscosidad de la suspensión ocasionada por la actividad enzimática.

Para la determinación se pesaron $7,00 \pm 0,05$ g de harina, y posteriormente se adicionó 25 ml de agua. Se agitó la suspensión hasta su total dispersión y se colocó la muestra en el viscosímetro-agitador dentro de un baño de agua. Al final del ensayo, se registró el tiempo en segundos.

Los valores de *Falling Number* menores a 150 s indican una elevada actividad amilásica en la harina, valores entre 200-250 s actividad amilásica normal y valores mayores a 300 s revelan una actividad amilásica baja.

3.7 Índice de retención de Agua Alcalina (IRAA) (Método 56-10; AACC, 2000)

La capacidad de retención de agua alcalina evalúa la proporción de agua alcalina que una harina con una base de 14% de humedad puede retener luego de su hidratación y centrifugación. Para esto, las muestras de harina de humedad conocida se suspendieron en una solución de bicarbonato de sodio 0,1 N, se dejaron hidratar y finalmente se centrifugaron. Este índice es expresado como el porcentaje de peso de la harina.

$$\% IRRA = \left[\left(\frac{PG}{PH} \right) * \left(\frac{86}{100 - \%H} \right) - 1 \right] * 100$$

PG: Peso del precipitado.

PH: Peso de la harina.

%H: Porcentaje de humedad.

A través de este índice es posible predecir la calidad de una harina para elaborar galletitas dulces, las cuales se desarrollan en un medio ligeramente alcalino por los agentes de fermentación. Este índice está inversamente relacionado con la extensión de las galletitas.

Valores altos de índice de retención indican una mala calidad galletitera dado que la capacidad de retener agua de las harinas resulta ser un inconveniente para el desarrollo eficiente de este producto.

Con el propósito de evitar el desarrollo de la red de gluten, la cual posee capacidad de retención de agua, esta técnica utiliza una solución de pH alcalino, y de esta manera se evita que el gluten afecte a los valores de retención.

3.8 Índice de Sedimentación en Dodecil Sulfato de Sodio (IS-SDS)

El índice de sedimentación en SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) se determinó de acuerdo al método AACC 56-70 (AACC, 2000), modificado según Dick y Quick (1983). Este índice consiste en medir el volumen de sedimentación de una harina humectada en una solución de ácido láctico-SDS. Para este análisis 1 g de harina se humectó con una solución de azul de coomassie de concentración 10 mg/L y una solución de ácido láctico-SDS (1:8 v/v ácido láctico - 2% SDS).

Este método se basa en la capacidad que poseen las proteínas del gluten de hincharse bajo la influencia del ácido láctico. El agregado de detergente (SDS) facilita la ruptura de las células del endospermo y la dispersión de las proteínas.

Mediante este índice es posible predecir la calidad de una harina para elaborar productos esponjados. Por consiguiente, mientras mayor sea el valor del índice más apta será la harina para el desarrollo de pan, ya que una mayor cantidad de gluten corresponde a una mayor capacidad del mismo para embeberse en agua.

3.9 Perfil de Capacidad de Retención de Solventes (SRC) (Solvent Retention Capacity) (Método 56-11; AACC, 2000)

La capacidad de retención de solventes evalúa la capacidad que posee una harina con una base de 14% de humedad de retener cuatro solventes independientes luego de la centrifugación. Para la determinación se utilizaron cuatro soluciones diferentes: sacarosa 50% p/p, carbonato de sodio 5%

p/p, ácido láctico 5% p/p y agua destilada. Las muestras de harina de humedad conocida se suspendieron en cada uno de estos solvente, se dejaron hidratar y finalmente se centrifugaron.

$$\% SRC = \left[\left(\frac{PG}{PH} \right) * \left(\frac{86}{100 - \%H} \right) - 1 \right] * 100$$

PG: Peso del precipitado.

PH: Peso de la harina.

%H: Porcentaje de humedad.

A partir de esta determinación se obtiene un patrón de comportamiento que luego se relaciona con la calidad de las harinas para elaborar diferentes productos de panificación. A diferencia del método que determina el índice de retención de agua alcalina, el uso en esta técnica de carbonato de sodio al 5% p/p incrementa el pH a un valor mayor a 11, el cual es superior al pK de los grupos hidroxilos del almidón. Esto permite que se lleve a cabo una distinción entre el almidón dañado o pregelatinizado y el almidón nativo (Gaines, 2000; Slade y Levine, 1994)

4. Caracterización del almidón

4.1 Análisis de la Viscosidad

Las propiedades de viscosidad se determinaron a través de un Viscoanalizador Rápido (RVA) (Newport Scientific Pty Ltd., Australia). Para la determinación una dispersión de harina en agua es calentada, enfriada y sometida a agitación constante (fuerza de corte) bajo condiciones controladas. Durante este ensayo se evalúan los cambios de viscosidad del sistema en función del tiempo y la temperatura (Figura 1), lo que permite estudiar el proceso de gelatinización y gelificación del almidón.

Para las determinaciones se utilizó el método general de pasting standard Newport Scientific Method 1 (STD1). Las suspensiones de 3,5 g de harina (humedad conocida) y $25 \pm 0,1$ ml de agua (0,88 fracción de volumen de agua) se calentaron a 50 °C, mientras se agitó a 160 rpm durante 10 s para la dispersión completa de la harina. La suspensiones se mantuvieron a 50 °C durante 1 min, y posteriormente se calentaron hasta 95 °C a una velocidad de calentamiento de 9,4 °C/min y una velocidad de agitación de 960 rpm. El sistema se mantuvo a 95 °C durante 2,5 minutos, y finalmente se enfrió a 50 °C a una velocidad de enfriamiento de 11,8 °C/min.

El pico de viscosidad (PV), la viscosidad media (VM), viscosidad final (VF), “*breakdown*” (PV – VM) y “*setback*” (VF – VM) se determinaron a partir de las curvas de perfil de viscosidad. El pico de viscosidad (PV) es la máxima viscosidad que el sistema puede adquirir, se origina cuando un número suficiente de gránulos de almidón se hincha como consecuencia de la absorción de agua y la temperatura. Luego de alcanzar este valor, la viscosidad del sistema cae levemente debido a la ruptura

de algunos gránulos y a que las moléculas, principalmente de amilosa, liberadas al medio durante la gelatinización se orientan en sentido del flujo, la viscosidad en este punto es denominada viscosidad media (VM). Durante el enfriamiento de la pasta la viscosidad comienza a aumentar nuevamente hasta lo que se denomina viscosidad final (VF), este incremento en la viscosidad se encuentra relacionado con la reasociación de las moléculas de amilosa. El “*breakdown*” es una medida de la facilidad con la que los gránulos hinchados pueden ser desintegrados por acción de las fuerzas de corte. El “*setback*” es una medida de la tendencia que poseen las moléculas de amilosa a retrogradar durante el enfriamiento de la pasta. Este parámetro depende de la tendencia que tenga la amilosa para formar un gel, o lo que es lo mismo, de la capacidad de gelación de la amilosa. (Copeland et al., 2009).

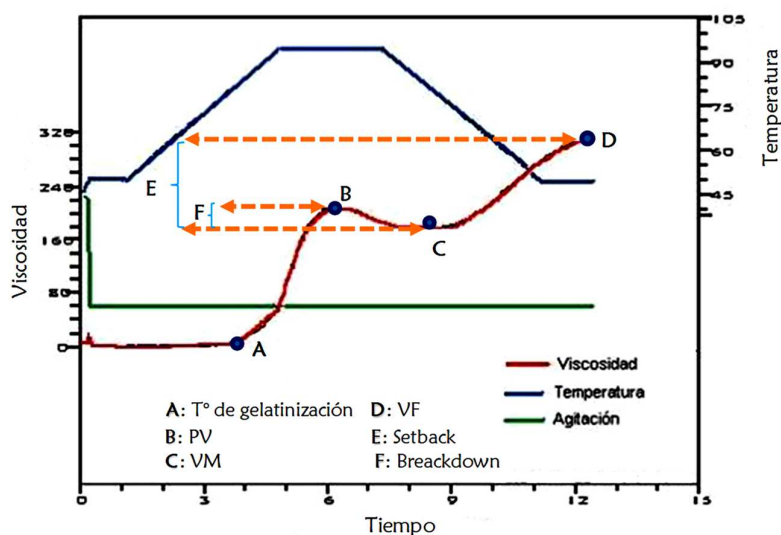


Figura 1.1: Esquema del perfil de viscosidad de almidones y parámetros de viscosidad.

4.2 Propiedades térmicas del almidón

Las transiciones de estado sufridas por el almidón durante el calentamiento en agua se registraron mediante un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC823e Calorimeter Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza), con software STARe Default DB V9.00 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza). Para este ensayo, se pesó entre 8-10 mg de harina en cápsulas de aluminio y posteriormente a cada cápsula se le adicionó agua (50%). Las cápsulas se sellaron herméticamente y se dejaron reposar durante 1 h a temperatura ambiente antes de ser sometidas al análisis.

4.2.1 Gelatinización del almidón

Durante el ensayo, las cápsulas se calentaron desde 30 °C hasta 130 °C a una velocidad de 10 °C/min. A partir de los gráficos de flujo de calor versus temperatura se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la

gelatinización (T_{end}), temperatura de pico (T_p) y cambio de entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g) y la entalpía de fusión del complejo amilosa- lípido (ΔH_f).

4.2.2 Retrogradación de la amilopectina

Para establecer el efecto del almacenamiento sobre la recristalización de la amilopectina, las cápsulas con las muestras gelatinizadas se enfriaron y almacenaron a 22 ± 2 °C durante 0, 1, 3 y 7 días, y posteriormente se volvieron calentar bajo las mismas condiciones. A partir de los gráficos de flujo de calor versus temperatura se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de pico (T_p), cambio de entalpía de retrogradación del almidón (ΔH_r) y la entalpía de fusión del complejo amilosa- lípido (ΔH_f).

5. Elaboración y calidad de los productos de panificación

5.1 Galletitas

5.1.1 Elaboración de las galletitas

Se elaboraron galletitas según el Micrométodo III descrito por Finney et al. (1950) con modificaciones (León et al., 1996), empleado por el centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo (CIMMYT).

Las galletitas se elaboraron utilizando la siguiente formulación: harina 45 g; azúcar impalpable 27 g; grasa vegetal 20,20 g; leche en polvo 2,25 g; bicarbonato de sodio 0,50 g; sal 0,42 g y agua 8,5 ml. La grasa, azúcar, leche, sal, bicarbonato de sodio y agua se mezclaron (3 min) previamente mediante una amasadora manual de espiral (HR 1495, Philips, Buenos Aires, Argentina) para formar una crema. Luego, la harina se incorporó y se mezcló todo (2 min) hasta obtener una masa.

Las galletitas fueron horneadas a 180 °C por 10 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Argentina). Seis galletitas se obtuvieron en cada lote de producción y las cuatro galletitas más homogéneas se seleccionaron para la determinación de la calidad.

5.1.2 Evaluación de la calidad de las galletitas

Factor Galletita

La calidad de las galletitas se determinó mediante el factor galletita (FG), obtenido de la relación entre el diámetro y la altura de cuatro galletitas orientadas al azar (León et al., 1996). Los valores de factor galletita más altos se correlacionan con una mejor calidad de las galletitas.

5.2 Pan

5.2.1 Elaboración del pan

Los panes se elaboraron utilizando la siguiente formulación: 1 kg harina; 30 g levadura prensada comercial; 18 g cloruro de sodio; 2 g propianato de sodio; 0,15 g ácido ascórbico y 600 ml de agua. Los ingredientes se mezclaron y amasaron (9 min) con una amasadora Argental L-20 (Argentina). La levadura y la sal se disolvieron previamente en agua, en forma separada, y los demás ingredientes se agregaron sólidos. La temperatura del agua se ajustó para obtener una masa final a

24±1 °C. La masa resultante se dejó reposar (15 min a 30 °C) y posteriormente fue desgasificada y laminada en una sobadora Mi-Pan vf roller (Mi-Pan, Córdoba, Argentina) con dos rodillos de 50 x 12,7 cm. A continuación, la masa fue dividida en piezas de 80 g las cuales fueron moldeadas mediante una armadora (Braesa, Brasil) para formar las piezas de pan. Posteriormente las piezas fueron inmediatamente fermentadas en una atmósfera de 96% de humedad relativa y 30 °C hasta alcanzar su máximo volumen (90 min). Finalmente, las piezas se hornearon a 200 °C por 18 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Argentina) previa vaporización de agua sobre la superficie de las piezas de pan (Ribotta et al., 2003; Armero y Collar, 1998).

5.2.2 Evaluación de la calidad de las piezas de pan

Determinación del volumen

El volumen de las piezas de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza, después de 4 h de horneado. El volumen específico se obtuvo dividiendo el volumen de la muestra por su peso.

Textura de la miga

La firmeza de la miga de pan se evaluó mediante un analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd, Godalming Surrey, UK). Rodajas de pan de 2,5 cm de espesor se sometieron a un test de compresión bajo las siguientes condiciones: celda de compresión de 5 kg; Velocidad del cabezal 100 mm/min; deformación máxima 40%; diámetro de la sonda cilíndrica de compresión 25 mm. La dureza de la miga se expresó como la fuerza requerida para comprimir la muestra hasta el 25% de su espesor original.

5.2.3 Envejecimiento de las piezas de pan

Textura de la miga

La firmeza de la miga de los panes se determinó a los 0, 1, 2 y 7 días de almacenamiento. El ensayo se llevó a cabo en un analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd, Godalming Surrey, UK) y se utilizó un test de compresión, como se detalló anteriormente. La dureza de la miga se expresó como la fuerza requerida para comprimir la muestra hasta el 25% de su espesor original.

6. Análisis estadístico

En todos los casos los ensayos experimentales se realizaron al menos por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina) (Di Rienzo et al., 2011). Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). La técnica del análisis de varianza (ANOVA) permite realizar las estimaciones de las respuestas promedio de tratamientos y las comparaciones entre ellas. Los resultados fueron comparados por el método de la mínima diferencia significativa test de Fisher's (LSD), con un nivel

de significancia de 0,05 (Di Rienzo et al., 2002). La relación entre los distintos parámetros se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson con $p \leq 0,05$.

Resultados y Discusión

La calidad tecnológica de los productos panificados es afectada principalmente por las características químicas y físicas de las harinas. Las harinas poseen entre un 80-85% de almidón, y gran parte de los atributos sensoriales y texturales de los panificados tienen su origen en las transformaciones físicas y químicas que sufre este componente.

A lo largo de este capítulo se describe el efecto del contenido de almidón dañado sobre las pruebas fisicoquímicas utilizadas para predecir la calidad de las harinas y el impacto del almidón dañado sobre la calidad de los productos de panificación, independiente del rol que desempeñan los demás componentes de una harina.

1. Textura de los granos de cereales y almidón dañado

El contenido de almidón dañado de una harina depende de la dureza de los granos y las condiciones y tipo de molienda empleada para la obtención de la harina. Los granos de trigo duro ofrecen una mayor resistencia durante la molienda en la obtención de harinas, por lo tanto es más dificultoso el proceso de reducción de los granos. Consecuentemente, las harinas provenientes de granos de textura dura poseen un tamaño medio de partícula mayor y un mayor contenido de almidón dañado que las harinas procedentes de un trigo blando (Hoseney, 1994d)

La dureza relativa de los granos de los tres cultivares utilizados para la obtención de harinas se determinó a través del índice de tamaño de partícula (Tabla 1.2). Los cultivares de trigo, Baguette y Klein Don Enrique, presentaron una mayor dureza de grano y mostraron un mayor ($p \leq 0,05$) porcentaje de almidón dañado respecto al cultivar de Triticale, Tatú. Estos resultados coinciden con lo reportado por Mok y Dick (1991), quienes informaron que los trigos candeales presentan un mayor contenido de almidón dañado que los trigos pan, los cuales a su vez mostraron un mayor contenido de almidón dañado que los trigos blandos. Estas tendencias están relacionadas con el espesor de la pared celular de las células del endospermo y con la intensidad con la que los gránulos de almidón están adheridos a la matriz proteica dentro de las células del endospermo. El espesor de la pared celular de las células del endospermo depende de la composición del grano, y se ha demostrado que los granos de textura dura presentan una pared celular más gruesa con una mayor cantidad de hemicelulosa respecto a los de textura blanda. Además de esto, existe evidencia de que la adherencia entre los gránulos de almidón y la matriz proteica dentro de las células del endospermo varía según la textura del grano, y en este sentido, se ha reportado que los granos de textura dura presentan una fuerte adhesión entre el almidón y las proteínas. En este contexto, los granos de textura dura oponen una mayor resistencia durante la molturación como resultado de una estructura más firme y rígida de las células del endospermo, condición que torna más frágiles a estas células frente a las fuerzas aplicadas durante la molienda, lo que resulta en una mayor proporción de almidón dañado en las harinas obtenidas (Hoseney, 1994a; Mok y Dick, 1991). A partir de los resultados obtenidos se

encontró que la dureza obtenida como %PSI correlacionó significativamente con los niveles de almidón dañado encontrados ($r = -0,95$), lo que confirma lo descripto por otros autores.

Las harinas provenientes de los tres cultivares se re-molieron en un molino a disco con el propósito de aumentar el nivel de almidón dañando. En todos los casos, se registró un gradual incremento del contenido de almidón dañado con el tiempo de molienda, como era de esperar (Tabla 1.2).

2. Composición de las harinas

En términos generales, las harinas no sometidas a re-molienda provenientes de los cultivares de trigo presentaron un porcentaje de proteínas mayor ($p \leq 0,05$) que la harina de triticales (Tabla 1.2). Comúnmente los trigos poseen un contenido de proteínas más elevado que los triticales. La mayor concentración de proteínas en los trigos se debe a programas de mejoramiento dirigidos a obtener granos con una concentración más elevada y una mejor calidad de las proteínas del gluten, ya que en nuestro país estos aspectos son de gran importancia para la finalidad de uso de estos granos. El contenido de proteína de las harinas de trigo estuvo dentro de los rangos informados por Colombo et al. (2008) y Xiao et al. (2006), mientras que, la harina de triticales estuvo dentro los rangos publicados por Rocca et al. (2006) y Pérez et al. (2003), aunque un poco mayores que los informados por Rogers y Hosney (1989) y Doescher y Hosney (1985). El contenido de proteínas de las muestras de harina provenientes de un mismo cultivar no fue afectado por el procedimiento de re-molienda en los casos evaluados (Tabla 1.2).

El hecho de que cualquier incremento en el contenido total de proteínas en una harina se traduce en un aumento del contenido de gluten es muy generalizado (Dowel et al., 2008; Perten et al., 1992), sin embargo, es importante tener en cuenta que la cantidad de proteínas no es una medida directa de la cantidad y calidad del gluten formado (Ćurić et al., 2001; Peterson et al., 1986). En este sentido, el contenido de total de proteínas de las harinas no es un indicador suficiente para determinar la calidad panadera de una harina, por lo que resulta necesario evaluar la capacidad de esas proteínas para formar gluten. A través de la determinación del contenido de gluten húmedo es posible predecir el comportamiento de una harina en la panificación, ya que evalúa la capacidad que tiene una harina de trigo para formar gluten, debido a que es un parámetro indicativo de la polimerización de las proteínas de gluten durante el amasado.

Las harinas de trigo mostraron un contenido de gluten mayor ($p \leq 0,05$) que la harina de triticales. Los valores registrados para los cultivares de trigo estuvieron dentro del rango informado por Colombo et al. (2008) para diferentes trigos Argentinos. La harina Klein Don Enrique registró un contenido de gluten húmedo mayor ($p \leq 0,05$) que la harina Baguette, y por lo tanto, puede ser calificada como una harina de mejor calidad panadera. Por el contrario, la harina de triticales Tatú no registró formación de gluten, lo cual era de esperar ya que generalmente las harinas provenientes de

cultivares de triticales poseen un mayor contenido de proteínas hidrosolubles, lo que implica una menor proporción de proteínas del gluten, en relación a las harinas de trigo (León et al., 1996). En el trigo existe una fuerte correlación entre el contenido de proteínas de la harina y la cantidad de gluten, sin embargo, esta correlación es mucho menor en triticale, debido a que una parte de sus proteínas tienen menor capacidad para formar gluten (Gupta et al., 1992; Skovmand et al., 1984; Chen y Bushuck, 1970).

El potencial de las proteínas formadoras de gluten para desarrollar una red elástica y cohesiva no fue afectado por la re-molienda de las harinas en el molino a disco ya que el contenido de gluten húmedo no varió significativamente ($p \leq 0,05$) para los diferentes tiempos de molienda en ningún cultivar (Tabla 1.2). Estos resultados indican que el proceso de re-molienda al que las harinas fueron sometidas no alteró la funcionalidad de las proteínas y de que el incremento en el contenido de almidón dañado presente en las harinas no afectó la capacidad de las proteínas para desarrollar gluten.

El contenido de amilopectina del almidón de trigo puede oscilar entre un 70-80%, mientras que el de amilosa entre un 20-30% (Jay-lin, 2009; Feillet, 2000). El contenido de amilosa del almidón de las harinas de los tres cultivares estudiados fue similar, y los valores registrados estuvieron dentro del rango de referencia mencionado, tendiendo al valor mínimo en los tres casos ($\sim 20\%$) (Tabla 1.2). La composición y arquitectura de los gránulos de almidón regulan su susceptibilidad al daño físico. La composición de los gránulos de almidón, proporción de amilosa:amilopectina y contenido de lípidos, son indicativos parciales de la susceptibilidad de daño, ya que cuando una cantidad constante de almidón es tratada en un molino, la proporción de daño inducido por el impacto mecánico ha demostrado depender de la composición y la cristalinidad de los gránulos (Tester, 1997). En este sentido, Han et al. (2002) y Tester (1997) han demostrado que una mayor proporción de amilopectina o reducidos contenidos de amilosa tienden a generar una mayor proporción de almidón dañado, bajo idénticas condiciones de molienda, lo que indica que almidones de este tipo presentan una mayor susceptibilidad al daño mecánico. A partir de esto, teniendo en cuenta que la proporción de amilosa total de los almidones de las harinas de trigo analizadas no resultó diferente, es posible justificar el hecho que ambas harinas no se diferencien en el contenido de almidón dañado, siendo un cultivar de textura dura (Baguette) y el otro de textura medianamente blanda (K. Don Enrique). En el caso de la harina de triticale, debido a que el contenido de amilosa no fue diferente respecto al almidón de trigo, la menor proporción de almidón dañado de las harinas de Tatú en comparación con las harinas de trigo estuvo influenciada principalmente por una menor adherencia entre el almidón y las proteínas dentro de las células del endospermo.

El procedimiento de re-molienda de las harinas no alteró el contenido de amilosa en ningún caso. Lo que coincide con los resultados publicados por Morrison y Tester (1994), quienes han reportado que sólo una molienda severa puede alterar a la amilosa por efecto de una degradación polimérica.

Tabla 1.2. Índice de tamaño de partícula y sus durezas relativas, contenido de almidón dañado, proteínas, gluten húmedo y amilosa de los tres cultivares.

Muestra	PSI (%)	Molienda de disco (min)	Almidón dañado (%)	Proteínas (%)	Gluten Húmedo (%)	Contenido de amilosa (%)
Baguette	15,3 ± 0,2 Duro	0	9,3 b	11,6 b	30,7 ab	21,5 a
		2,0	14,7 e	11,9 b	28,9 a	22,2 a
		5,0	17,2 f	11,7 b	28,7 a	21,6 a
K. Don Enrique	21,2 ± 0,8 Medianamente blando	0	8,4 b	14,3 c	32,9 cd	21,3 a
		2,0	12,8 d	14,1 c	33,6 d	20,1 a
		5,0	17,7 f	13,9 c	32,6 cd	20,1 a
Tatú	25,6 ± 0,1 Blando	0	6,1 a	9,7 a	nd	20,5 a
		3,5	10,4 c	10,0 a	nd	20,3 a
		7,0	14,0 e	9,8 a	nd	19,8 a

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

PSI: Índice de tamaño de partícula. nd: no detectado.

3. Evaluación de la calidad de las harinas mediante métodos químicos predictivos de calidad

La forma más correcta de establecer la calidad de una harina para elaborar un determinado producto de panificación es elaborar y evaluar dicho producto. Sin embargo, en muchas ocasiones esto no es posible debido a que es necesario tener esta información de manera rápida o se cuenta con una limitada cantidad de muestra. En función de esto, resulta necesario utilizar pruebas predictivas que se correlacionen significativamente con la aptitud de las harinas para elaborar diferentes productos panificados.

El perfil de capacidad de retención de solventes (SRC) establece un perfil de calidad y funcionalidad de las harinas, y por lo tanto es utilizado para predecir el uso final de las mismas. A pesar de que el perfil de capacidad de retención de solventes fue propuesto inicialmente para evaluar la calidad de trigos blandos (Gaines, 2000; Slade y Levine, 1994) más tarde fue aplicado con éxito en trigos pan (Colombo et al., 2008; Moiraghi et al., 2005). Los porcentajes de SRC de cada solvente se relacionan con diferentes componentes de las harinas y generan un perfil de calidad y funcionalidad útil para predecir su aptitud panadera. En las harinas de trigo, el porcentaje de retención de ácido láctico está asociado con las características de las proteínas (principalmente gluteninas), y se ha sugerido la utilización del SRC ácido láctico para diferenciar harinas de trigos pan de distinta calidad proteica para panificación (Xiao et al., 2006). El porcentaje de retención de carbonato de sodio con los niveles de almidón dañado, el de sacarosa con el contenido de pentosanos y gliadinas, y el de

agua con todos los componentes capaces de absorber agua presentes en una harina (Kweon et al., 2009; Guttieri et al., 2002; Gaines, 2000).

El perfil de retención de solventes de las harinas no sometidas a re-molienda de los trigos fue mayor ($p \leq 0,05$) respecto al de triticale (Tabla 1.3). Los índices de retención registrados para las harinas de trigo estuvieron dentro del rango informado por Colombo et al. (2008) y Xiao et al. (2006). Con respecto a la harina de triticale, los índices de retención estuvieron dentro de los valores informados por Rocca et al. (2006) y Ramírez et al. (2003). El SRC_{sacarosa} no presentó variaciones significativas entre los 3 cultivares, lo que muestra similitudes en el contenido de pentosanos y gliadinas. Esta inferencia es válida ya que se ha informado la existencia de una correlación positiva entre el contenido de pentosanos solubles y el SRC_{sacarosa} para harinas de trigo (Colombo et al., 2008) como así también para harinas de triticale (Rocca et al., 2006). Los otros tres índices de retención indican que la harina del cultivar Baguette presenta una mayor proporción de componentes con capacidad de retención, que se relacionó con una mayor proporción de hemicelulosa en las paredes de las células del endospermo ya que este cultivar presenta una textura dura (Hoseney, 1994a). Asimismo, a partir del $SRC_{\text{Ac láctico}}$ es posible inferir que este cultivar se diferencia del resto en las características de las gluteninas que posee. Las diferencias marcadas por el $SRC_{\text{Carbonato}}$ están relacionadas con la presencia de un mayor contenido de almidón dañado en las harinas de trigo respecto a la de triticale.

Los resultados registrados indicaron que los %SRC para los distintos solventes fueron afectados por el contenido de almidón dañado. En los tres cultivares, los índices de retención incrementaron significativamente ($p \leq 0,05$) con el aumento del tiempo de molienda en el molino a disco (Tabla 1.3). Los porcentajes de retención para cada solvente correlacionaron significativamente ($p \leq 0,05$) con el contenido de almidón dañado, $SRC_{\text{H}_2\text{O}}$ $r = 0,97$; SRC_{sacarosa} $r = 0,75$; $SRC_{\text{Carbonato}}$ $r = 0,82$ y $SRC_{\text{Ac láctico}}$ $r = 0,82$; lo que confirma que el contenido de almidón dañado presente en una harina afecta fuertemente la absorción de la misma. En el mismo sentido, Torri et al. (2003) determinaron un significativo grado de asociación ($r = 0,77$) entre el porcentaje de almidón dañado y el $SRC_{\text{Carbonato}}$ en harinas de cultivares de triticale. Asimismo, Colombo et al. (2008) y Moiraghi et al. (2005) informaron correlaciones positivas y significativas entre los porcentajes de retención y el contenido de almidón dañado en harinas provenientes de trigo pan.

El índice de retención de agua alcalina (IRAA) es un test predictivo de calidad utilizado para seleccionar harinas para elaborar galletitas. En las harinas de trigo, los componentes principalmente responsables de la retención de bicarbonato de sodio son los pentosanos, proteínas, glicoproteínas y complejos proteínas-polisacáridos (Yamazaki y Lord, 1988). Los valores de este índice correlacionan inversamente con el diámetro de las galletitas, y es a partir de esto que es posible predecir la conveniencia de una harina para elaborar galletitas con este método (Yamazaki, 1953). Este test es considerado especialmente eficaz en la discriminación entre trigos pan y trigos blandos, sin embargo,

su poder predictivo se reduce cuando se utiliza para distinguir trigos que pertenecen a una misma clase de dureza (Kitterman y Rubenthaler, 1971; Yamazaki, 1953).

Las harinas de trigo no sometidas a re-molienda mostraron una índice de retención de agua alcalina mayor ($p \leq 0,05$) que la harina de triticale (Tabla 1.3). Los IRAA registrados para los trigos fueron menores a los valores informados por Colombo et al. (2008), mientras que los registros obtenidos para la harina de triticale estuvieron dentro de los rangos reportados por Rocchia et al. (2006), Pérez et al. (2003) y Ramírez et al. (2003). Los mayores índices de retención de las harinas de trigo están asociados con la presencia de una mayor proporción de proteínas, almidón dañado y contenido de hemicelulosa de las paredes de las células del endospermo que estas harinas presentan respecto a las de triticale. Estos resultados y lo registrado mediante el perfil de capacidad de retención de solventes (SRC) indican que las harinas de trigo presentan claramente una mayor capacidad de absorción y retención respecto a las de triticale.

Al igual que en el perfil de capacidad de retención de solventes, los índices IRAA de las harinas provenientes de un mismo cultivar de granos, aumentaron significativamente con el contenido de almidón dañado (Tabla 1.3), sugiriendo un deterioro de la calidad galletitera de las harinas. Esta tendencia fue reafirmada por la correlación significativa ($p \leq 0,05$) encontrada para este índice de calidad y el almidón dañado ($r = 0,72$). Estos resultados coinciden con lo reportado por Colombo et al. (2008), Moiraghi et al. (2005) y Torri et al. (2003), quienes informaron correlaciones significativas, $r = 0,81$, $r = 0,90$ y $r = 0,77$, entre los valores de %IRAA y el contenido de almidón dañado en harinas de triticales y trigos pan, respectivamente.

Otro test predictivo de calidad de harinas es el índice de sedimentación en SDS a partir del cual posible predecir la aptitud de una harina para elaborar productos esponjados. Esta prueba mide la capacidad relativa del gluten para formar una red, y además de ser simple y altamente reproducible, ha sido considerada un buen indicador de calidad de pan (Wang y Kovacs, 2001; Kruger y Hatcher, 1995; Blackman y Gill, 1980; Axford et al., 1979) y una herramienta eficiente para seleccionar trigos en programas de mejoramiento genético (Carter et al., 1999; Ayoub et al., 1993). Este índice depende de la cantidad y calidad de las proteínas, y se basa en la capacidad de las proteínas de absorber agua en ácidos diluïdos. Las gluteninas son las proteínas que principalmente absorben agua y se hinchan bajo las condiciones químicas de este test (Eckert et al., 1993), por lo que esta fracción de proteínas es la principal responsable del desarrollo del sedimento. En este sentido, se han reportado correlaciones positivas y significativas entre este test y el contenido de glutenina de la harina (Colombo et al., 2008).

Los valores de índice de sedimentación de las harinas no sometidas a re-molienda de trigo y triticale no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Los registros para las harinas de trigo fueron menores a los valores informados por Colombo et al. (2008) y Slaughter et al. (1992), sin embargo, estos índices estuvieron dentro del rango reportado por Xiao et al. (2006). En relación a la harina de

triticale, el índice registrado estuvo dentro de los rangos publicados por Roccia et al. (2006), Pérez et al. (2003) y Ramírez et al. (2003) para diferentes harinas de este cereal. Estos resultados indican que la aptitud panadera de estas tres harinas, evaluada mediante este índice de calidad, no difiere significativamente entre sí, a pesar de que las harinas de trigo hayan presentado un contenido de proteínas, gluten y valores de $SRC_{Acláctico}$ significativamente mayor respecto a la harina de triticale. Es importante destacar que no se observó una correlación significativa ($p \leq 0,05$) entre el IS-SDS y el contenido de gluten, aunque si bien se registró una correlación significativa ($p \leq 0,05$) y positiva ($r = 0,62$) entre el IS-SDS y el contenido de proteínas. Existe evidencia de que el índice de sedimentación correlaciona positivamente con el contenido de proteínas, gluten y $SRC_{Acláctico}$ (Colombo et al., 2008; Roccia et al., 2006; Xiao et al., 2006; Moiraghi et al., 2005), sin embargo, algunas publicaciones no reportan asociaciones entre estos parámetros (Wieser et al., 2003; Wang y Kovacs, 2002).

A diferencia de lo encontrado para el perfil de capacidad de solventes y el índice de retención de agua alcalina de una harina, los valores de IS-SDS de las harinas provenientes de un mismo cultivar de granos no mostraron una clara tendencia como consecuencia del incremento en el contenido de almidón dañado. En el caso de las harinas Baguette y Tatú, el incremento en el contenido de almidón dañado causó una disminución en los valores de IS-SDS, sin embargo, en las harinas Klein Don Enrique los valores del IS-SDS aumentaron como consecuencia del incremento en los niveles de almidón dañado (Tabla 1.3). No se observó correlación entre este parámetro de calidad panadera y el contenido almidón dañado, lo que puede deberse a que este índice predictivo de calidad está específicamente relacionado con la cantidad y calidad de las proteínas de la harina.

Los índices predictivos de calidad, SRC e IRAA, ponen en evidencia la influencia negativa que tiene un incremento en el contenido de almidón dañado sobre la elaboración de productos panificados, lo cual está directamente relacionado con la gran capacidad de absorción de agua que poseen los gránulos dañados de almidón. En este sentido, se ha reportado que los gránulos dañados de almidón tienen la capacidad de absorber entre un 200 y 430% de su peso en agua, mientras que los gránulos sanos absorben entre un 39 y 87% de su peso en agua (Berton et al., 2002). Este significativo incremento de la capacidad de absorción de agua de una harina modifica la consistencia de las masas y genera problemas durante su producción (Bettge et al., 1995; Evers y Stevens, 1985).

Tabla 1.3. Parámetros predictivos de calidad panadera

Muestra	Molienda de disco (min)	SRC (%)				IRAA (%)	IS-SDS (cm ³)
		H ₂ O	Na ₂ CO ₃	Sacarosa	Ac. Láctico		
Baguette	0	67,4 c	78,7 b	86,3 a	109,9 d	65,6 b	10,7 a
	2,0	75,6 f	92,3 d	100,1 b	125,0 f	76,1 c	9,8 b
	5,0	79,3 g	99,0 e	106,5 cd	126,6 f	79,7 d	9,4 cd
K. Don Enrique	0	65,0 b	78,1 b	90,6 a	102,5 c	67,3 b	9,3 a
	2,0	72,4 e	90,5 c	102,3 bc	116,1 e	73,9 c	11,4 bc
	5,0	83,9 h	109,6 f	121,7 e	132,6 g	85,4 e	13,9 e
Tatú	0	60,9 a	72,8 a	88,2 a	77,9 a	63,0 a	8,6 a
	3,5	70,3 d	99,0 e	107,5 d	89,5 b	82,0 d	7,3 d
	7,0	78,6 g	113,0 g	124,4 e	100,9 c	92,9 f	7,0 e

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

SRC: Perfil de capacidad de retención de solventes, IRAA: Índice de retención de agua alcalina, IS-SDS: Índice de sedimentación en SDS.

4. Actividad de la enzima α -amilasa de las harinas

Mediante el test del índice de caída (*Falling number*) se estima la actividad α -amilásica en granos y harinas con el objetivo de detectar el daño por pre-germinación, optimizar los niveles de actividad enzimática y garantizar la sanidad del grano. La actividad α -amilásica tiene un efecto muy importante sobre la calidad de los productos panificados. Una actividad amilásica elevada se traduce en panes más oscuros y con migas más pegajosas, debido a la presencia de un elevado porcentaje de dextrinas en el sistema. Es importante destacar que el índice de caída no detecta la presencia de β -amilasas, ya que éstas se inactivan a las temperaturas del ensayo (Gómez Pallarés et al., 2006). La enzima α -amilasa propia de la harina tiene la capacidad de hidrolizar las moléculas en los gránulos gelatinizados o dañados, por lo tanto, la cantidad de almidón dañado presente en una harina tendrá efectos directos sobre la actividad enzimática de esta enzima.

La harina de triticale no sometida a re-molienda presentó un valor de *Falling number* (FN) menor ($p \leq 0,05$) que los registrados para las harinas de trigo (Tabla 1.4), lo que indica una mayor actividad enzimática en las harinas de triticale. Los valores de índice de caída registrados para los trigos fueron mayores a los informados por El-Porai et al. (2013) para dos harinas trigos egipcios, Lemelin et al. (2005) y Prabhasankar et al. (2000) para harinas de tres trigos comerciales y para dieciséis trigos franceses. Sin embargo, los registros de *Falling number* de los cultivares de trigo aquí analizados estuvieron dentro de los rangos informados por Finney (2001) para veinticinco trigos de Estados Unidos, y Tara y Bains (1976) quienes examinaron sesenta y tres muestras de trigos indio. Con respecto al cultivar de triticale, el valor de índice de caída estuvo dentro de los rangos publicados por Dennett et al. (2013) quienes informaron un rango de 62-350 s para este tipo de cultivares.

En los granos de cereales como el trigo, triticale y centeno, el índice de caída se correlaciona negativamente con la actividad de α -amilasa (Oettler, 2002; Wehmann et al., 1991). Los valores *Falling number* para los trigos revelan una actividad amilásica baja de las harinas ya que son valores que se encuentran por encima de 300 s. Sin embargo, la harina de triticale presentó un índice entre 200-250 s, lo que está relacionado con una actividad amilásica más elevada pero normal. Una característica importante que diferencia el triticale de sus especies progenitoras es su mayor actividad α -amilasa. La mayor actividad de α -amilasa del triticale se identificó a principios de su desarrollo (Lorenz y Welsh, 1976) y aún este factor es considerado el mayor obstáculo para la utilización de este cereal en la producción de productos panificados. Se ha demostrado que los triticales exhiben FN menores que los trigos en ausencia de una germinación visible, aunque existe variabilidad (Erekul y Kohn, 2006; Tohver et al., 2005; Serna-Saldívar et al., 2004). Además, en algunos casos se han observado cultivares de triticale que presentan un número similar o superior de FN que los trigos (Makarska et al., 2008; Tohver et al., 2005).

En el caso de las harinas de trigo el índice de caída disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) con el incremento del contenido de almidón dañado (Tabla 1.4), lo que indica que una mayor proporción de gránulos de almidón estuvieron disponibles para la acción enzimática durante la determinación, ya que el contenido de α -amilasa no fue modificado. El incremento en el contenido de almidón dañado no causó modificaciones sobre los valores de *Falling number* en las harinas de triticale, lo que está relacionado con la elevada actividad amilásica que esta harina presenta.

5. Comportamiento térmico del almidón

El comportamiento viscoso de las suspensiones de harina y las transiciones de estado sufridas por el almidón durante el calentamiento en agua dependen en gran medida de las características del almidón. Conocer el comportamiento del almidón en los ciclos de calentamiento y enfriamiento es fundamental, ya que la gelatinización afecta a la expansión de las masas y batidos durante el horneado, mientras que la retrogradación es una de las causas principales del endurecimiento de los productos de panificación.

5.1 Propiedades viscosas del almidón

Los cambios en el comportamiento reológico de una suspensión de almidón calentada, como resultado del hinchamiento de los gránulos y la solubilización (lixiviación) de la amilosa, pueden ser monitoreados por medidas de viscosidad (Biladieris, 2009).

Las harinas de trigo no sometidas a re-molienda presentaron un perfil de viscosidad diferente al encontrado para la harina de triticale (Tabla 1.4). Esta última registró menores ($p \leq 0,05$) valores de viscosidad respecto a las harinas de trigo, lo que está relacionado principalmente con la elevada actividad amilásica registrada para la harina de triticale. Otros estudios relacionados con triticale han informado valores de viscosidad máxima de hasta 10 veces menores a las registradas para el trigo

(Gómez Pallares et al., 2012; Naik et al., 2010; Oliete et al., 2010). Sin embargo, la α -amilasa es activa bajo las condiciones de este ensayo, y por lo tanto, causa una rápida hidrólisis del almidón a medida que la suspensión se calienta. La inactivación de las enzimas endógenas de las harinas de triticale genera perfiles de viscosidad similares a los de trigo. Se ha demostrado que bajo condiciones de inhibición de la enzima α -amilasa las harinas de triticale presentaron valores de viscosidad dentro del rango presentado por los trigos y no se detectaron diferencias entre las especies (Dennett et al., 2013).

En todos los casos el contenido de almidón dañado afectó las propiedades viscosas de las harinas. En todas las muestras, el incremento en el contenido de almidón dañado causó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) del pico de viscosidad (PV). En las harinas de trigo, la viscosidad media (VM) y la viscosidad final (VF) disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) por el incremento de almidón dañado. Sin embargo, en el caso del triticale se observaron modificaciones sobre estos parámetros, lo que está relacionado con la elevada actividad amilásica de estas harinas. Los valores de *breakdown* no se vieron afectados por el almidón dañado, excepto para la harina de triticale que registró una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de este parámetro. Los valores de *setback* no mostraron una clara tendencia, sin embargo, las harinas provenientes del triticale mostraron un incremento gradual de este parámetro con el contenido de almidón dañado en el sistema (Tabla 1.4).

Los resultados obtenidos indican que el nivel de almidón dañado afecta significativamente la etapa de formación de la pasta, mientras que, no causa cambios apreciables durante el periodo de enfriamiento del sistema. Esto puede estar asociado con el proceso de gelatinización espontánea que sufren los gránulos de almidón dañado en agua fría (Morrison et al., 1994), lo que provoca su rápida hidratación e hinchamiento y los torna más frágiles y deformables frente al esfuerzo de cizalla. Consecuentemente, es posible que los gránulos dañados no contribuyan al incremento de la viscosidad durante el calentamiento del sistema. Otro aspecto a considerar, es el efecto de la hidrólisis de la enzima α -amilasa endógena. La gelatinización espontánea en agua fría permite una rápida degradación de los gránulos dañados por parte de la α -amilasa, y como resultado de esto no contribuyen al incremento de la viscosidad del sistema durante el calentamiento. En este sentido, se encontró una correlación significativa ($p \leq 0,05$) y positiva entre el *Falling number* y el pico de viscosidad (PV) ($r = 0,97$), viscosidad media (VM) ($r = 0,96$) y viscosidad final (VF) ($r = 0,93$), lo que confirma la influencia de la α -amilasa sobre las propiedades viscosimétricas de las harinas evaluadas.

Tabla 1.4. *Falling number* y parámetros del perfil de viscosidad.

Muestra	Molienda de disco (min)	<i>Falling Number</i> (s)	PV (cP)	VM (cP)	Breakdown (cP)	VF (cP)	Setback (cP)
Baguette	0	694 f	1885 f	1133 ef	752 d	2364 e	1231 cd
	2,0	568 d	1834 f	1075 e	759 d	2359 e	1284 de
	5,0	519 c	1742 e	1007 c	735 cd	2228 d	1221 c
K. Don Enrique	0	630 e	1697 e	1151 f	546 ab	2405 e	1254 cd
	2,0	505 c	1628 d	1056 cd	572 ab	2371 e	1315 e
	5,0	419 b	1439 c	922 b	517 a	2132 c	1210 c
Tatú	0	234 a	947 b	269 a	678 c	830 a	561 a
	3,5	229 a	882 a	283 a	599 b	1019 b	736 b
	7,0	231 a	836 a	263 a	573 ab	992 b	729 b

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

PV: pico de viscosidad, VM: viscosidad media, VF: viscosidad final

5.2 Transiciones de estado del almidón

Acorde con el modelo propuesto Donovan (1979) cuando el almidón gelatiniza durante su calentamiento en agua, las regiones cristalinas son desestabilizadas y el almidón funde debido a la hidratación y al hinchamiento de las regiones amorfas, proceso que es registrado mediante la aparición de la endoterma de gelatinización (endoterma-G). Cuando el agua en el sistema se transforma en un factor limitante, sólo algunas partes de las regiones cristalinas son desestabilizadas a través de este proceso, y la fusión de las regiones remanentes dan como resultado la aparición de la endoterma de fusión (endoterma-M) (Biladieris, 2009).

Las transiciones de estado sufridas por el almidón registradas durante el calentamiento de las harinas en agua se evidenciaron a partir de una endoterma de transición entre los 59 y 78 °C, correspondiente al proceso de gelatinización del almidón, y una endoterma adicional a una mayor temperatura (T_p promedio 111 ± 1 °C), correspondiente a la disociación del complejo amilosa-lípido (Biladieris, 2009; Singh et al., 2003). La entalpía de gelatinización (ΔH_g) determinada para las harinas de trigo fueron algo menores que los valores publicados por otros autores (Singh et al., 2003). Sin embargo, se han reportado valores de entalpía de gelatinización de almidones nativos en el rango de 5-20 J/g, en acuerdo con los resultados obtenidos (Biladieris, 2009). La entalpía de gelatinización del almidón de la harina Baguette fue significativamente menor que la de K. Don Enrique y Tatú, mientras que estas últimas no presentaron diferencias significativas entre sí. La relación entre la composición de los gránulos de almidón y su estructura, y los parámetros de gelatinización han sido ampliamente estudiados. En este sentido, se ha establecido que la entalpía de gelatinización da una medida general de la cristalinidad, calidad y cantidad de cristales, y es un indicador de la pérdida del orden molecular dentro del gránulo de almidón (Hoover y Vasanthan, 1994; Cooke y Gidley, 1992; Tester y Morrison,

1990). Además de esto, las diferencias en la entalpía de gelatinización en almidones nativos de diferentes cultivares puede ser asociada a las diferencias en las cantidades de las cadenas más largas de amilopectina (Yamin et al., 1999). Asimismo, los parámetros térmicos pueden ser influenciados por la arquitectura molecular de la región cristalina, que corresponde a la distribución de cadenas más cortas de amilopectina (Noda et al., 1996).

En todos los casos, la entalpía de gelatinización (ΔH_g) del almidón disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) con el incremento en el contenido de almidón dañado (Tabla 1.5), al igual que lo informado por Morrison et al. (1994) para almidones de trigo y maíz, y por Jovanovich et al. (2003) para harinas de trigos argentinos. Sin embargo, la temperatura de inicio de la gelatinización (T_0) y la temperatura de pico (T_p) no sufrieron modificaciones, a diferencia de lo reportado por Morrison et al. (1994). Estos autores encontraron una disminución sobre T_0 y T_p , la cual fue atribuida a un cambio en la estructura cristalina de los gránulos que no tuvieron la capacidad de gelatinizar espontáneamente y que forman parte de la fracción de almidón que da origen a la endoterma de gelatinización. No obstante, es importante destacar que dentro de los resultados publicados por estos autores, las muestras de almidón de trigo y maíz dañadas a tiempos cortos de molienda no acusaron significativas variaciones sobre T_0 respecto al control en cada caso.

Las disminuciones registradas sobre los valores de entalpía de gelatinización están relacionadas con la gelatinización espontánea que sufren los gránulos de almidón dañado. De esta manera los gránulos gelatinizados espontáneamente no contribuyen a la medida de entalpía registrada, por lo que el cambio térmico resulta en una menor cantidad de energía involucrada. En lo que respecta a la temperatura de inicio de la gelatinización, si las mezclas de harina en agua se consideran sistemas homogéneos, se entiende que todos los gránulos de almidón, en condiciones de un exceso o déficit de agua, se encuentran rodeados de una delgada capa de líquido, por lo que las regiones amorfas del gránulo cercanas a la superficie tienen acceso al agua disponible y por consiguiente, pueden promover el inicio de la gelatinización (Waigh et al., 2000). En este sentido, Perry y Donald (2002) describen que si una cantidad suficiente de agua, mayor o igual a un nivel crítico requerido, se encuentra disponible en el sistema al inicio del proceso de gelatinización, la temperatura de comienzo de este proceso debería ser la misma. Esto explica el hecho que la temperatura de inicio de la gelatinización no cambie con el contenido de almidón dañado, a pesar de que la absorción de agua ocasionada por los gránulos dañados tienda a alterar las proporciones de agua libre del sistema.

La entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) con el almidón dañado (Tabla 1.6) ($r = 0,92$), lo que indica una mayor proporción de complejo formado. Posiblemente, este comportamiento está relacionado con un incremento en la proporción de amilosa libre en el medio, derivada de los gránulos gelatinizados espontáneamente, capaz de formar complejo con los lípidos presentes.

Las suspensiones gelatinizadas de almidón tienden a sufrir retrogradación. Con este término se designa a la transición irreversible desde el estado soluble o disperso a otro insoluble y microcristalino alcanzado por el enfriamiento del sistema. Los perfiles térmicos de las muestras previamente gelatinizadas y almacenadas mostraron dos transiciones endotérmicas. La primera transición endotérmica entre los 58 y 80 °C y la segunda entre los 95 y 121 °C, correspondiente a la retrogradación de la amilopectina (Roulet et al., 1990; l'Anson et al., 1990), y a la fusión del complejo amilosa-lípido, respectivamente. La harina Baguette mostró una entalpía de retrogradación de amilopectina luego de las 24 h de almacenamiento mayor respecto a la harina de Klein Don Enrique y Tatú. En relación a lo discutido con los valores de entalpía de gelatinización, las diferencias estructurales en la molécula de amilopectina (longitud de la cadena) puede dar cuenta de la variación de las tasas de retrogradación de los almidones, existe evidencia de que la cinética de retrogradación de amilopectina se ve acelerada por la presencia de una mayor proporción de cadenas más largas de amilopectina (Durrani y Donald, 1995; van Soest et al., 1994; Akingbala et al., 1988).

Como era de esperar, en todos los casos la entalpía de retrogradación incrementó durante el tiempo de almacenamiento. En general, el grado de re-asociación de la amilopectina aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) con el incremento en el contenido de almidón dañado (Tabla 1.5). En todos los casos, la presencia de un mayor contenido de almidón dañado causó una mayor influencia sobre la entalpía de retrogradación de la amilopectina hasta los tres días de almacenamiento, y estas diferencias disminuyeron a tiempos de almacenamiento mayores. En relación al aumento en la proporción de amilopectina retrogradada por efecto del almidón dañado y en concordancia con los resultados encontrados en este estudio, Mao y Flores (2001) informaron una correlación positiva ($r = 0,90$; $p < 0,001$) entre el contenido de almidón dañado y la firmeza de tortillas formuladas con harina de trigo, y además registraron que el envejecimiento de este tipo de producto resultó más rápido durante los primeros 2 días de almacenamiento. Posiblemente este efecto esté relacionado con la presencia de dextrinas derivadas de la degradación de los gránulos dañados por acción de las amilasas endógenas de la harina, las cuales interfieren en la reasociación de las cadenas de amilopectina durante el almacenamiento (Duran et al., 2001).

No se registraron variaciones significativas en la entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido (ΔH_i) durante el almacenamiento ni por el incremento en el porcentaje de almidón dañado en ningún tipo de harina (Tabla 1.6). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ribotta et al. (2004) y Zobel et al. (1988), quienes a partir de un estudio por difracción de rayos X informaron que durante el envejecimiento del pan no se registraron cambios significativos en la intensidad de la estructura cristalina de tipo V, asociada con el complejo amilosa-lípido.

Tabla 1.5. Entalpía de gelatinización del almidón y entalpía de retrogradación de la amilopeptina

Muestra	Molienda de disco (min)	ΔH gelatinización (J/g)	ΔH retrogradación de la amilopeptina (J/g)			
			Día 0	Día 1	Día 3	Día 7
Baguette	0	3,92 d	nd	0,63 a	0,88 a	1,41 a
	2,0	3,70 c	nd	0,85 c	0,99 b	1,44 a
	5,0	2,76 a	nd	1,11 e	1,23 d	1,57 b
K. Don Enrique	0	4,45 e	nd	0,72 b	1,02 b	1,72 c
	2,0	3,57 c	nd	0,93 d	1,14 c	1,75 cd
	5,0	2,85 a	nd	0,99 e	1,25 d	1,82 e
Tatú	0	4,32 e	nd	0,99 e	1,16 c	1,54 b
	3,5	3,64 c	nd	1,08 f	1,25 d	1,79 de
	7,0	3,27 b	nd	1,24 g	1,39 e	1,83 e

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Los valores de ΔH están expresados en J/g de harina. Las comparaciones estadísticas se realizaron en función del contenido de almidón dañado para cada cultivar.

Tabla 1.6. Entalpía de disociación del complejo amilosa-lípido durante el almacenamiento.

Muestra	Molienda de disco (min)	ΔH disociación del complejo amilosa-lípido (mJ/mg)			
		Día 0	Día 1	Día 3	Día 7
Baguette	0	0,57 c	0,58 cd	0,59 cd	0,62 c
	2,0	0,70 d	0,69 e	0,66 d	0,70 d
	5,0	0,82 e	0,77 f	0,79 e	0,80 e
K. Don Enrique	0	0,45 b	0,48 b	0,49 b	0,51 b
	2,0	0,59 c	0,61 d	0,64 d	0,69 d
	5,0	0,86 e	0,91 g	0,88 f	0,92 f
Tatú	0	0,36 a	0,39 a	0,39 a	0,41 a
	3,5	0,58 c	0,54 bc	0,55 bc	0,59 c
	7,0	0,80 e	0,78 f	0,87 f	0,83 e

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Los valores de ΔH están expresados en mJ/mg de harina. Las comparaciones estadísticas se realizaron en función del contenido de almidón dañado para cada cultivar.

6. Evaluación de la calidad de los panificados

6.1 Galletitas dulces

Las masas de galletitas dulces no poseen propiedades elásticas, es decir que ceden a una fuerza de tracción, y son de consistencia variable. La harina es el ingrediente principal de las masas para galletitas, pero son necesarias grandes cantidades de grasa y de azúcar, no sólo por el aporte del sabor, aroma y color del producto final, sino para generar la plasticidad y la cohesividad del sistema minimizando la formación de la red de gluten. La estructura de este tipo de galletitas consiste en una mezcla de proteína, almidón y azúcar, la cual no presenta una matriz proteica continua, y la grasa se

encuentra en forma de grandes glóbulos interconectados entre cuerpos de proteínas y de almidón. La textura es gruesa por la gran coalescencia de las burbujas de gas que se forman durante la cocción (Manley, 2000)

Para evaluar la aptitud de una harina para elaborar galletitas es necesario procesar la harina, obtener galletitas y evaluar su calidad. Para llevar adelante esto, se utiliza una formulación sencilla con un mínimo de ingredientes, y de esta manera las variaciones en las propiedades y composición de las harinas pueden ser fácilmente detectadas (León, 1995). En este sentido, se consideran de mejor calidad aquellas galletitas que tienen un mayor diámetro, un mínimo espesor y un alto de grado de agrietamiento de la superficie. El factor galletita (FG) es un parámetro que evalúa la calidad de las galletitas dulces a través de la relación entre el diámetro y su altura.

Las galletitas de mejor calidad se obtuvieron a partir de la harina Baguette no sometida a remolienda. Estas galletitas presentaron un FG significativamente ($p \leq 0,05$) mayor al de las galletitas elaboradas con las harinas no re-moliendas de los otros dos cultivares (Tabla 1.7), a pesar de que la harina Tatú posee menor contenido de almidón dañado inicial. Estos resultados coinciden con lo reportado por Torri et al. (2003), quienes informaron que la calidad galletitera no sólo depende del contenido de almidón dañado sino también de los demás constituyentes de una harina. Por lo tanto, con estos resultados queda en evidencia la contribución que tienen los demás componentes de una harina sobre la calidad galletitera. Las proteínas que forman el gluten son funcionales durante el horneado de las galletitas, a pesar de que no se produce o se produce en muy baja proporción la red de gluten durante el procedimiento de elaboración de este tipo de producto (Gaines, 1990). El patrón de agrietamiento de la superficie de las galletitas elaboradas a partir de estas tres harinas no mostró diferencias relevantes (Figura 1.2).

Las galletitas elaboradas con las harinas provenientes de los tres cultivares revelaron una disminución del factor galletita (FG) con el aumento en el contenido de almidón dañado ($r = -0,67$), al igual que la asociación ($r = -0,52$) reportada por Torri et al. (2003) para galletitas obtenidas a partir de harinas de triticale. Estos resultados ponen en evidencia la influencia negativa de un mayor contenido de almidón dañado sobre la elaboración de galletitas, efecto que es consistente con la tendencia obtenida a través del índice de retención de agua alcalina. También se encontró una correlación negativa y significativa ($p \leq 0,05$) entre el FG y el IRAA ($r = -0,89$), lo que coincide con lo reportado por otros autores que demuestran que harinas con excelente aptitud para elaborar galletitas producen galletitas de gran diámetro y con bajos valores de IRAA (Gaines, 2000; León et al., 1996; Abboud et al., 1985; Kisell et al., 1976).

En las galletitas elaboradas con las harinas de trigo y triticale el diámetro disminuyó drásticamente al incrementar el contenido de almidón dañado (Figura 1.2), y estos resultados coinciden con lo publicado por Gaines et al. (1988) y Donelson et al. (1988). En este tipo de masa, el agua se distribuye entre los componentes de las harinas y el azúcar. Cuando las harinas presentan una

baja absorción de agua, el azúcar tiende a retener más agua, incrementando de esta manera la proporción de azúcar disuelta en la masa, lo que origina una disminución de la viscosidad de la masa durante la cocción. Como consecuencia de esta disminución de viscosidad, las masas incrementan su capacidad de extensión produciendo así galletitas de mayor diámetro (Slade y Levine, 1994). Por el contrario, es posible que harinas con una excesiva capacidad de absorber agua, originada principalmente por la presencia de almidón dañado, produzcan masas con una mayor viscosidad debido a que la proporción de sacarosa disuelta en el sistema tiende a reducirse, lo que resulta en un efecto negativo sobre la expansión de la galletita durante el horneado.

En relación a las características de la superficie de las galletitas, en todos los casos se observó que los incrementos en el contenido de almidón dañado causaron una disminución del agrietamiento de la superficie en las galletitas (Figura 1.2), lo que sugiere un deterioro de la calidad de las galletitas.

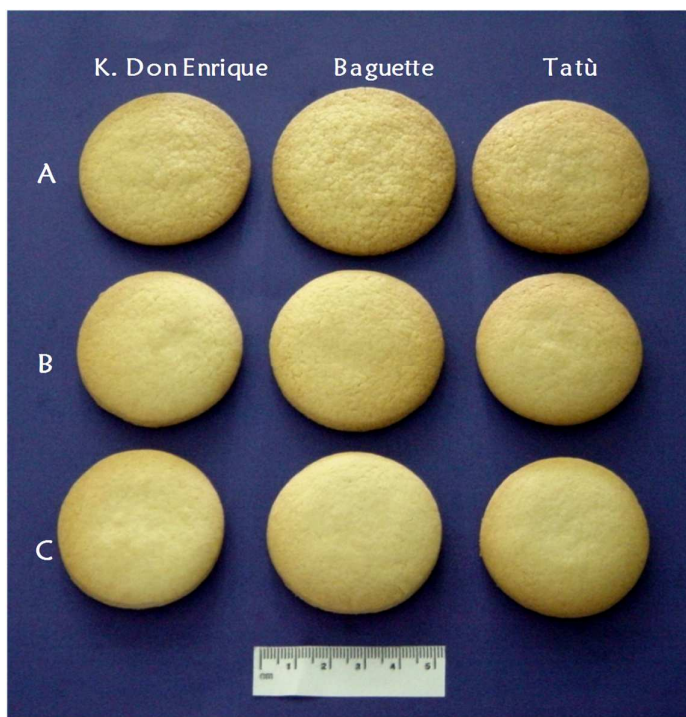


Figura 1.2: Galletitas elaboradas a partir de las harinas de los tres cultivares. **A:** Harinas no sometidas a re-molienda, **B:** Harinas re-molidas por 2 min para Baguette y K. Don Enrique, y 3,5 min para Tatù. **C:** Harinas re-molidas por 5 min para Baguette y K. Don Enrique, y 7 min para Tatù.

6.2 Pan

El pan es un producto leudado obtenido por acción de las levaduras que fermentan los azúcares producidos principalmente por la hidrólisis del almidón. Las masas de pan son elásticas y extensibles. La harina es el principal ingrediente de las masas panarias, por lo tanto, la calidad de este tipo de producto depende fuertemente de las características y propiedades de la harina. La estructura

de una masa de pan consiste en una red tridimensional continua (gluten) en donde se encuentran inmersos los gránulos de almidón.

Los atributos más importantes para determinar la calidad del pan son el volumen específico de las piezas de pan, como indicador de la esponjosidad, y la firmeza (parámetro de textura) de la miga.

Los panes elaborados con las harinas no sometidas a re-molienda de K. Don Enrique y Tatú registraron un mayor volumen ($p \leq 0,05$) que los panes de la harina de Baguette, lo que se relaciona con lo registrado en la evaluación de calidad de galletitas. Sin embargo, la dureza de la miga no mostró diferencias significativas entre los panes elaborados con estas harinas (Tabla 1.7). Nuevamente se evidencia la influencia que tienen sobre la calidad de los productos panificados los restantes componentes de una harina.

La calidad panadera de las harinas de trigo y triticale se deterioró al incrementar la proporción de almidón dañado. En todos los casos se registró una disminución en el volumen de las piezas de pan (Tabla 1.7 y Figura 1.3), y se encontró un alto grado de correlación negativa ($r = -0,95$; $p \leq 0,05$) entre ambos parámetros, lo que indica que la calidad panadera disminuye con el contenido de almidón dañado. Aunque, el IS-SDS y el porcentaje de gluten húmedo no sufrieron alteraciones por el nivel de almidón dañado, este detrimento del volumen era un hecho esperado, ya que es conocido que altos niveles de almidón dañado reducen la performance panadera (Dexter et al., 1994; Dexter et al., 1985; Tipples, 1969). En la elaboración del pan, el almidón dañado es considerado un factor de importancia ya que un exceso de este componente produce masas blandas debido a que los gránulos dañados hinchados liberan el agua cuando son degradados por las amilasas propias de la harina, lo que altera su posterior desempeño en el proceso de producción (Evers y Stevens, 1985). Por otro lado, las proteínas del gluten, gliadinas y gluteninas, necesitan agua en la etapa del amasado para desarrollar una red elástica y cohesiva capaz de retener los gases durante la fermentación y producir piezas de pan con un óptimo volumen. La presencia de almidón dañado puede disminuir la cantidad de agua disponible para el óptimo desarrollo del gluten durante el amasado, lo que deriva en una insuficiente formación de gluten y por consiguiente, en una disminución del volumen del pan obtenido.

La firmeza de la miga del pan fresco incrementó significativamente con el nivel de almidón dañado presente en las harinas (Tabla 1.7). Se determinó una correlación negativa ($r = -0,82$; $p \leq 0,05$) entre ambos parámetros, lo que sugiere una pérdida de la calidad panadera conforme incrementan los niveles de almidón dañado. Los resultados mostraron una relación inversa ($r = -0,81$) entre el volumen de pan y la firmeza de la miga, posiblemente debido a que menores volúmenes implican un mayor grado de compactación de la miga. En este sentido, existe evidencia de que panes con mayor volumen son más suaves durante el almacenamiento (Corsetti et al., 2000; Maleki et al., 1980), y que una correlación inversa y significativa ($r = -0,70$) existe entre la firmeza y el volumen de las piezas (Corsetti et al., 2000).

Como era de esperar, en todos los casos la firmeza de la miga incrementó como consecuencia del almacenamiento, al igual que las tendencias encontradas para la entalpía de retrogradación de la amilopectina. Durante el almacenamiento de las piezas de pan, el contenido de almidón dañado afectó la firmeza de la miga de los productos panificados. En todos los casos se registró un significativo ($p \leq 0,05$) incremento de la firmeza de la miga. Las diferencias encontradas para los primeros días de almacenamiento se acrecentaron notablemente a periodos de almacenamiento mayores (Tabla 1.7). Estos resultados coinciden con lo reportado por Mao y Flores (2001) quienes registraron un aumento en la firmeza de tortillas elaboradas con harinas de trigo debido al incremento en el contenido de almidón dañado.

Tabla 1.7. Parámetros de calidad de galletitas dulces y panes.

Muestra	Molienda de disco (min)	FG	VE (cm ³ /g)	Firmeza de la miga (g)			
				Día 0	Día 1	Día 3	Día 7
Baguette	0	6,4 g	3,29 e	542 ab	753 a	1361 a	2806 b
	2,0	5,1 d	2,68 d	859 c	879 b	1632 c	3204 d
	5,0	4,6 bc	2,36 a	890 c	1169 c	1899 e	3488 f
K. Don Enrique	0	5,9 f	3,52 f	567 ab	767 a	1301 a	2902 c
	2,0	4,9 cd	3,01 d	854 c	1162 c	1492 b	3574 g
	5,0	4,5 b	2,55 b	1333 e	1569 d	1810 d	3876 h
Tatú	0	5,5 e	3,86 f	501 a	785 a	1592 c	2621 a
	3,5	4,3 ab	3,36 e	599 b	940 b	1755 d	3379 e
	7,0	4,1 a	2,55 b	1201 d	1622 d	2123 f	4008 i

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las comparaciones estadísticas se realizaron en función del contenido de almidón dañado para cada cultivar. FG: Factor galleta, VE: Volumen específico.

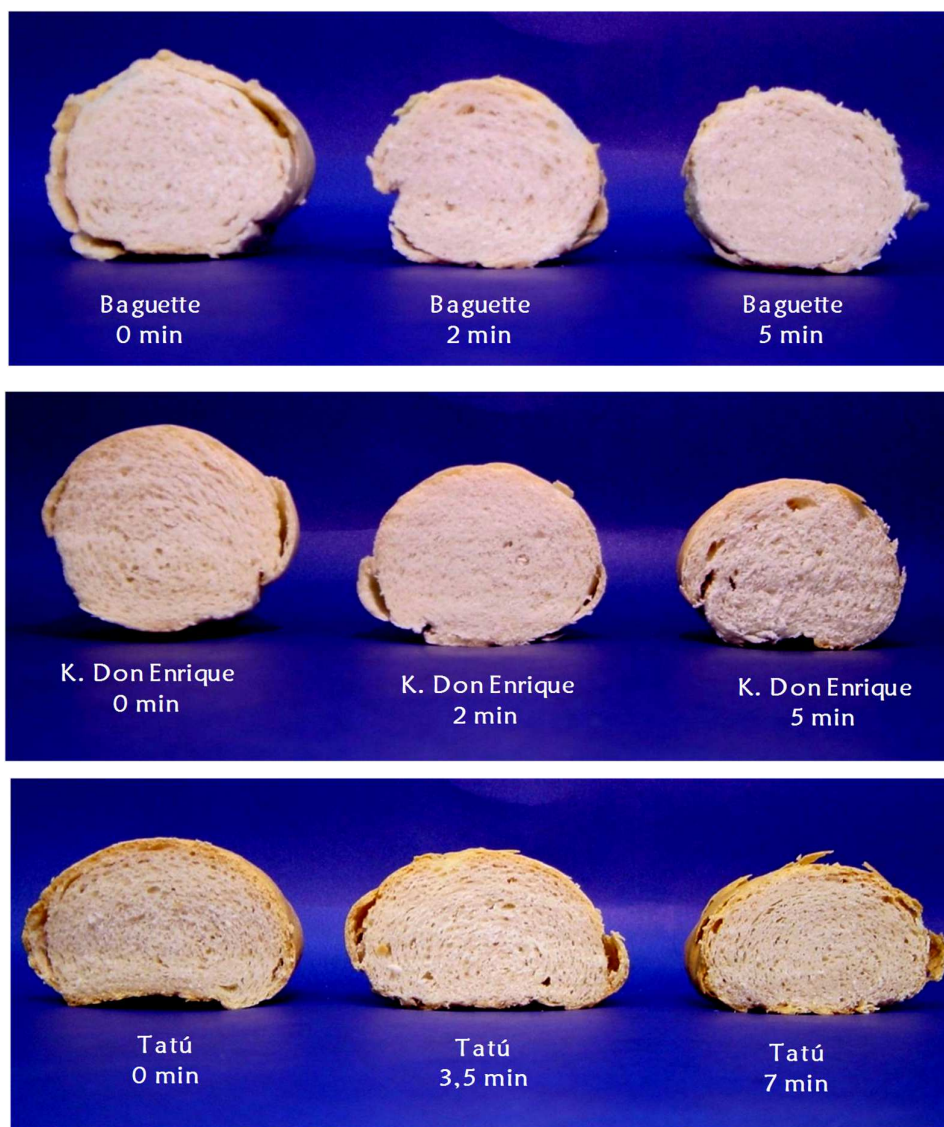


Figura 1.3: Imágenes de las piezas de pan elaboradas con las harinas provenientes de los tres cultivares.

7. Conclusiones

Las condiciones de molienda y la dureza de los granos inciden sobre el contenido de almidón dañado en las harinas. Los ensayos predictivos de calidad de harinas para elaborar productos de panificación fueron afectados por las variaciones en el contenido de almidón dañado, tanto en el índice de retención de agua alcalina como en el perfil de retención de solventes incrementaron al aumentar el daño, lo que indica un deterioro de la calidad de las harinas para elaborar productos panificados.

Los incrementos en el almidón dañado causaron un deterioro generalizado de la performance de las harinas en la elaboración de productos panificados. En galletitas se registraron disminuciones del diámetro, aumento en el espesor de las galletitas y superficies menos agrietadas; mientras que, en pan se observaron disminuciones de volumen y aumento de la firmeza.

Los resultados descritos en este capítulo permiten concluir que el contenido de almidón dañado es un parámetro que debe ser considerado de importancia en la producción de galletitas y panes.

Capítulo 2

*Estudio de la capacidad de diferentes
enzimas para mitigar los problemas de
calidad derivados del uso de harinas con
elevados niveles de almidón dañado*

Materiales y Métodos

1. Muestras

Con el objetivo de analizar la influencia del almidón dañado sobre las propiedades de las masas aislando la posible influencia de la calidad y la cantidad de proteínas y de los demás componentes de una harina, se prepararon dos sistemas para simular harinas con diferente contenido de almidón dañado. Para esto se mezcló almidón de trigo sin modificar (S5127 Sigma-Aldrich CAS Number 9005-25-8), almidón de trigo sin modificar tratado en molino a disco (Whisper Series Bench Top, Nueva Zelanda) con 35,7% de almidón dañado y gluten vital comercial (CBH Quingdao, China) (85:15 almidón:gluten). Durante la molienda del almidón la temperatura se monitoreó, no superando los 40 °C. El contenido de almidón dañado de los sistemas armados fue seleccionado en función de los porcentajes de almidón dañado de las muestras de harina derivadas de los cultivares de trigo y triticale descritos en el capítulo anterior.

En la Tabla 2.1 se presentan las características de los componentes utilizados para la preparación de las harinas, y en la Tabla 2.2 las harinas preparadas.

Tabla 2.1. Composición del almidón de trigo y gluten vital utilizados para el armado de las harinas.

	Almidón de trigo (Sigma-Aldrich)	Gluten vital de trigo (CBH Quingdao)
Amilosa¹ (%)	31,1±0,89	-
Humedad² (%)	10,5±0,25	9,5±0,34
Proteínas³ (%)	≤0,2*	75,65±2,5
Almidón dañado⁴ (%)	3,7±0,2	-

1. Determinado por el kit de ensayo amilosa/amilopectina (Megazyme International, Irlanda)

2. Método 44-19, 44-01; AACC, 2000

3. Método 46-13; AACC, 2000

4. Método 76-30A; AACC, 2000

*. Especificaciones del producto

Tabla 2.2. Harinas preparadas con diferente contenido de almidón dañado.

Muestra	Almidón dañado ¹ (%)	Humedad ² (%)
H1	4,4 a	11,6 a
H2	14,7 b	11,5 a

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

1. Método 76-30A; AACC, 2000

2. Método 44-19, 44-01; AACC, 2000

2. Enzimas

Las enzimas empleadas fueron α -amilasa (ALF) (Fungamyl 2500BG) (2500 FAU/g), amilasa maltogénica (AMM) (Novamyl 10000BG) (10000 MANU/g) y amiloglucosidasa (AMG) (AMG 800BG) (800 AGU/g), y sus mezclas, ALF+AMM, ALF+AMG y ALF+AMM+AMG. Los tres aditivos

enzimáticos utilizados fueron de grado alimenticio. Para los ensayos las dosis empleadas fueron el 50% más de las dosis máximas recomendadas (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Dosis de enzimas.

Enzima	Dosis
ALF	0,002 g/100 g harina
AMM	0,02 g/100 g harina
AMG	0,04 g/100 g harina

3. Características reológicas de las harinas

3.1 Análisis Farinográfico (Método 54-21; AACC, 2000)

Las absorción de agua de los componentes de la harina y las propiedades relacionadas con el proceso de amasado se evaluaron mediante un Farinógrafo Brabender (Brabender Instruments, Inc., Alemania). En este ensayo una mezcla de harina y agua es amasada a velocidad constante por la acción de paletas mezcladoras tipo Z. La resistencia que opone la masa al trabajo mecánico contra las paletas mezcladoras causa una fuerza opuesta al movimiento y esta es medida como un torque, registrada y graficada en función del tiempo. La resistencia es determinada en unidades Brabender, y evaluada en función del tiempo durante la formación de la masa (Figura 2.1).

La cantidad de agua necesaria para lograr una masa de consistencia estándar (500 unidades Brabender, valor estandarizado de consistencia máxima) con características de manejo óptimas y adecuadas para la calidad del producto (Stevens, 1987) se determinó a través de este ensayo. El rango de consistencia es de 0-1000 UB, donde 500 UB corresponde a una resistencia de torque de 5 Nm. Las curvas farinográficas informan acerca de los cambios de las propiedades reológicas durante el amasado. Los parámetros determinados a partir de las curvas farinográficas fueron el tiempo de desarrollo (TD), grado de decaimiento (GD) y estabilidad (E). *TD* es el tiempo que transcurre desde la adición del agua hasta el punto de máxima consistencia de la masa, es un parámetro que indica la calidad proteica de una harina. Mayor *TD* representa mejor calidad proteica, y por lo tanto un gluten más tenaz (Zounis y Quail, 1997). *E* es el intervalo de tiempo durante el cual la masa mantiene la máxima consistencia, se mide desde que la parte superior de la curva intercepta la línea de 500 UB (tiempo de llegada) hasta que la vuelve a interceptar (tiempo de salida) el valor indica la tolerancia de la harina al amasado, cuanto mayor es *E* mayor tolerancia posee la harina al amasado. *GD* es la diferencia en unidades farinográficas entre el centro de la curva en el punto de máxima consistencia y el centro de la curva 12 minutos después de este máximo. Da idea del ablandamiento o pérdida de la consistencia de la masa cuando existe un sobre amasado (Locken et al., 1972; Mailhot y Patton, 1988).

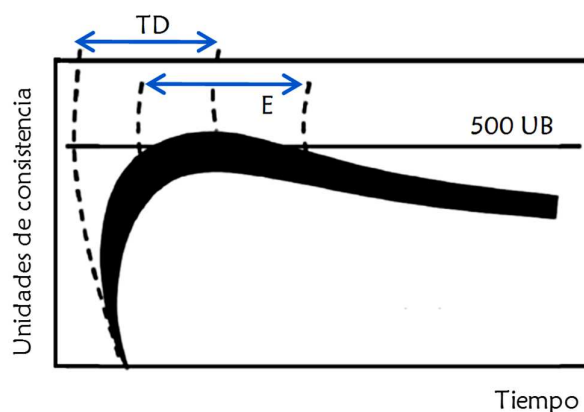


Figura 2.1: Diagrama esquemático de un farinograma

3.2 Análisis de Viscosidad

Las propiedades de viscosidad se determinaron a través de un Micro-Viscoamilógrafo (Brabender Instruments, Inc., Alemania). Para la determinación una dispersión de harina en agua es calentada, enfriada y sometida a agitación constante (fuerza de corte) bajo condiciones controladas. Durante este ensayo se evalúan los cambios de viscosidad del sistema en función del tiempo y la temperatura.

Las suspensiones de 5 g de harina (humedad conocida) y $95 \pm 0,1$ ml de agua se calentaron desde 30 a 95 °C, manteniendo constante durante 5 min a 95 °C, y luego se enfriaron desde 95 a 50 °C, manteniendo constante durante 1 min a 50 °C. La velocidad del ciclo de calentamiento y enfriamiento fue de 7,5 °C/min.

A partir de las curvas de perfil de viscosidad se determinó el pico de viscosidad o viscosidad máxima (PV), la viscosidad media (VM), viscosidad final (VF), “*breakdown*” (PV – VM) y “*setback*” (VF – VM).

4. Propiedades reológicas de las masas

4.1 Preparación de las masas

Se prepararon masas según absorción farinográfica con y sin el agregado de las dosis correspondientes de cada enzima. Los ingredientes se mezclaron y amasaron (amasadora HR 1495, Philips, Argentina) durante 2 min y las masas resultantes se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente antes de llevar a cabo los ensayos.

4.2 Adhesividad (Stickiness)

La adhesividad es una propiedad textural que resulta del balance entre las fuerzas adhesivas y cohesivas de un material. Cuando la fuerza adhesiva es mayor que la cohesiva el material resulta pegajoso (Figura 2.2). Esta propiedad se determinó mediante un analizador de textura TA.XT2i (Stable

Micro Systems Ltd, Reino Unido). La adhesividad se evaluó mediante la plataforma y celda *SMS Chen-Hoseney dough stickiness (A/DSC)* y una sonda cilíndrica de 25 mm (P/25P) (Figura 2.3).

Un fragmento de masa se colocó dentro de la celda, se extrusó aproximadamente 1 mm de espesor por encima de la superficie y se dejó reposar durante 30 s. Posteriormente, la masa extrusada fue comprimida con la sonda cilíndrica utilizando una fuerza de 40 gf a una velocidad de ensayo de 2 mm/s (velocidad de pre-ensayo 2 mm/s). Finalmente la sonda, fue separada de la superficie, determinándose la fuerza de adhesión entre la sonda y la masa. Se registraron curvas de fuerza vs tiempo, y la adhesividad de la masa se determinó como la fuerza requerida para separar la sonda de la masa (Chen y Hoseney, 1995).

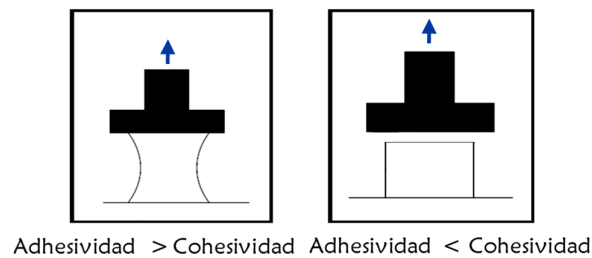


Figura 2.2: Representación del comportamiento de un material con mayor y menor adhesividad.

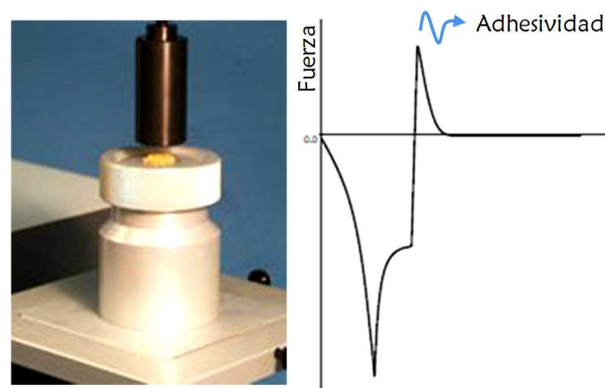


Figura 2.3: Sonda de medición y representación de una curva típica de adhesividad

4.3 Propiedades de extensibilidad

Las propiedades de extensibilidad se determinaron a través de ensayos de micro-extensión uniaxial mediante un analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd, Reino Unido). Los ensayos se realizaron mediante la plataforma *Kieffer dough and gluten extensibility (A/KIE)*. Las muestras de masa (20 g) se prensaron y cortaron en tiras mediante la base ranurada del molde. Posteriormente, la masa se dejó reposar durante 40 min en la prensa moldeadora. Las tiras de masa se retiraron, una por una, cuidadosamente para ejecutar la prueba de extensión. Cada tira de masa se extendió a una velocidad constante (3,3 mm/s) hasta su ruptura. Se registró la fuerza que el material

opone a la elongación vs la distancia recorrida por la sonda, y mediante el programa Texture Expert 1.22 (Stable Micro Systems, Reino Unido) se calcularon la resistencia máxima a la extensión (R_m), la extensibilidad máxima (E , distancia de extensión hasta la ruptura) y el área bajo la curva (A , trabajo de deformación que se requiere para extender la masa hasta la rotura) (Figura 2.4).

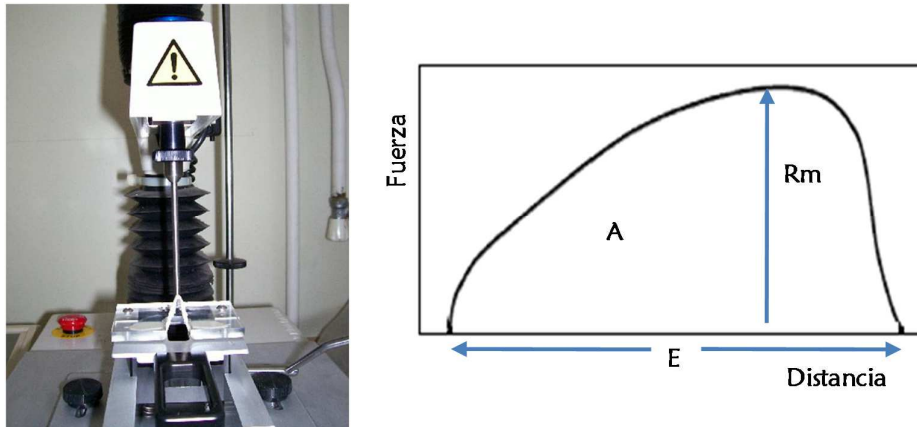


Figura 2.4: Sonda de medición y representación gráfica de una curva de extensión uniaxial.

4.4 Viscoelasticidad

El carácter viscoelástico se evaluó mediante un ensayo de compresión a través de un analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems Ltd, Reino Unido). El ensayo de compresión involucró la aplicación de un esfuerzo (σ) constante y normal durante un intervalo de tiempo, y la deformación (ϵ) ocasionada durante la aplicación y eliminación del esfuerzo se registró en el tiempo.

Los sistemas viscoelásticos presentan simultáneamente características de sólido y características de fluido. Los sistemas con esta particularidad fluyen y se deforman al mismo tiempo. Por lo tanto, cuando un material viscoelástico es sometido a un esfuerzo, este sufre una deformación instantánea y luego continúa deformándose en función del esfuerzo aplicado. Posteriormente, cuando el esfuerzo es removido, parte de la forma original es recobrada (componente elástica) y parte se pierde (componente viscosa).

El modelo mecánico más simple que se utiliza para interpretar el comportamiento reológico de una masa es el modelo de Burgers. Cuando una fuerza constante es aplicada a la masa, se obtiene una respuesta inmediata que está dada por la deformación elástica, seguida por una deformación elástica demorada en el tiempo, y finalmente un flujo viscoso. Las dos primeras respuestas son denominadas capacitancia, mientras que el tercer estado es llamado viscosidad newtoniana (Figura 2.5) (Steffe, 1996a).

Las masas preparadas se colocaron en una placa y se las prensó por 40 min para lograr un espesor constante. Posteriormente, se cortaron piezas cilíndricas de masa de 10 mm de altura y 25 mm de diámetro aproximadamente. Las determinaciones se llevaron a cabo con una sonda cilíndrica

de 30 mm de diámetro. Las mediciones reológicas se realizaron bajo un esfuerzo normal constante de 1,39 kPa, el cual se aplicó sobre las piezas de masa durante 45 s.

Los datos de deformación obtenidos del ensayo de compresión se describieron en términos de "capacitancia" (*creep compliance*) (J):

$$J = f(t) = \frac{\varepsilon}{\sigma}$$

Donde ε es la deformación ocasionada sobre la muestra y σ el esfuerzo aplicado durante la compresión (Steffe, 1996a).

Los resultados de compresión se analizaron mediante el modelo reológico de Burgers, el cual es una combinación en serie del modelo de Kelvin y Maxwell que describe el comportamiento viscoelástico de un material:

$$J(t) = J_0 + J_1 \left(1 - e^{(-t/\lambda_{ret})} + \left(\frac{t}{\eta} \right) \right)$$

donde J_0 es la capacitancia elástica instantánea, J_1 capacitancia elástica retardada, λ_{ret} es el tiempo de relajación del componente Kelvin y η viscosidad newtoniana. La capacitancia elástica instantánea es relacionada con las propiedades elásticas del sistema. La capacitancia elástica retardada y la viscosidad newtoniana representan la elasticidad y la viscosidad del elemento viscoelástico del modelo, respectivamente. El tiempo de relajación, es el tiempo requerido para que la deformación alcance el 63,2% del valor final.

Los parámetros del modelo de Burgers se estimaron por ajuste de los datos experimentales mediante el software SIGMAPLOT 10 (Systat Software, Inc., Alemania).

Los parámetros de ajuste J_0 , J_1 , λ and η se utilizaron para calcular el valor de la capacitancia máxima (J_{max}) alcanzada al final del test. La capacitancia máxima es un parámetro importante, el cual usualmente se utiliza para describir la rigidez del sistema (Wang y Sun, 2002)

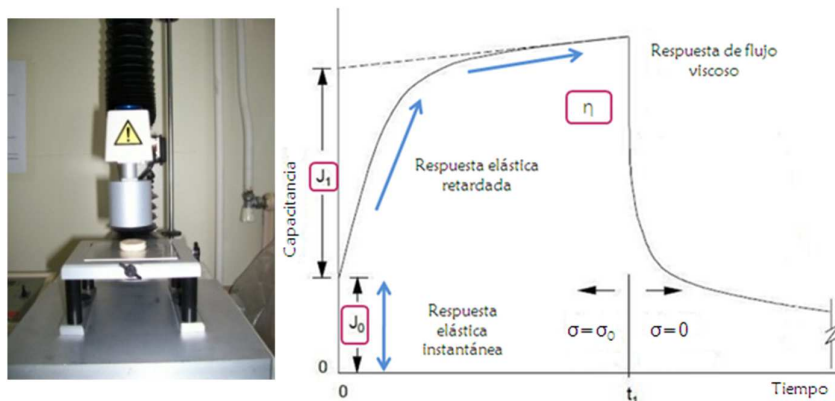


Figura 2.5: Curva típica de compresión-relajación de un material viscoelástico y parámetros correspondientes al modelo de Burgers.

5. Propiedades térmicas del almidón

5.1 Preparación de las masas

Se prepararon masas (absorción farinográfica) con y sin el agregado de enzima. Los ingredientes se mezclaron y amasaron (amasadora HR 1495, Philips, Argentina) durante 2 min y la masas resultantes se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente antes de llevar a cabo los ensayos.

5.2 Gelatinización del almidón

Los cambios sobre el proceso de gelatinización del almidón producido durante el transcurso del horneado de una masa se determinaron mediante un Calorímetro Diferencial de Barrido con software STARe Default DB V9.00 (DSC823e Calorimeter Mettler Toledo, Suiza). Para el ensayo se colocaron ~10 mg de masa en cápsulas de aluminio de 100 μ l, se sellaron y se sometieron al análisis. Para simular el proceso de horneado las cápsulas se mantuvieron a 30 °C por 2 min, luego, se calentaron desde 30 a 110 °C a una velocidad de 11,7 °C /min, y finalmente se mantuvieron a 110 °C por 5 min.

A partir de los gráficos de flujo de calor vs temperatura se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la gelatinización, temperatura de pico (T_p) y el cambio de entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g).

5.3 Retrogradación de la amilopectina

Para analizar el efecto del almacenamiento sobre la recristalización de la amilopectina, las cápsulas con las muestras calentadas se enfriaron y almacenaron a 4 ± 2 °C durante 9 días, y posteriormente se volvieron a calentar en el calorímetro desde 30 °C a 130 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

A partir de los gráficos de flujo de calor versus temperatura se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura de inicio de la retrogradación (T_0), temperatura máxima de pico (T_p) y el cambio de entalpía de retrogradación del almidón (ΔH_r).

6. Perfil de azúcares solubles

6.1 Preparación de masas liofilizadas

Se prepararon masas (absorción farinográfica) con y sin el agregado de enzima. Los ingredientes se amasaron (amasadora HR 1495, Philips, Argentina) durante 2 min y la masa resultante se dejó reposar durante 15 min a 25 °C. Inmediatamente después las masas se congelaron, y posteriormente se liofilizaron y almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

6.2 Determinación del perfil de azúcares

El perfil molecular de los azúcares solubles obtenidos de los polímeros de almidón en masas liofilizadas se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las corridas cromatográficas se realizaron en un cromatógrafo compuesto por una bomba LC-20AT, una unidad

controladora SCL-10A VP, un horno CTO-10 AS VP y un detector RID (10A Shimadzu, Japón). Las unidades se operaron a través del software LC solution V. 1.22 SP1 (Shimadzu, Japón).

Para el análisis se utilizó una columna PL-Hi-PlexNa, tamaño de partícula de 10 μm , 300 mm de largo x 7,7 mm de diámetro (Varian, Inc, EUA) y con una matriz de resina monodispersa de estireno-divinilbenceno con sulfonato de sodio. Las condiciones de corrida fueron: fase móvil: agua micropore filtrada, flujo: 0,3 ml/min, temperatura de columna: 80 $^{\circ}\text{C}$, detector: índice de refracción.

La extracción de las dextrinas y azúcares de las masas liofilizadas (2 g) se llevó a cabo con una solución de etanol 85% v/v (20 ml). Las suspensiones se mantuvieron entre 60-70 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 min. Posterior a una centrifugación (6000 rpm, 15 min), el sobrenadante se evaporó hasta sequedad a 60 $^{\circ}\text{C}$. Los extractos se disolvieron en agua (6 ml) y filtraron (0,45 μm). Los productos de extracción se filtraron por una membrana de 0,22 μm antes de ser analizados en HPLC. Las muestras se inyectaron (30 μl) en la columna y se eluyeron con agua durante 35 min. Para la identificación y cuantificación se utilizó como estándar: maltoheptosa (GP7), maltopentosa (GP5) (Supelco, EUA), maltosa (GP2) y glucosa (Sigma-Aldrich, EUA). La identificación de los picos se realizó a partir de los tiempos de retención característicos de los estándares (Figura 2.6). La concentración de los azúcares en cada muestra se realizó por comparación con las áreas de los picos obtenidas de los estándares de concentración conocida (método de estándar externo). Las dextrinas entre grado de polimerización 8 a 14 presentes en los perfiles cromatográficos de las muestras se cuantificaron mediante relaciones de áreas de estas dextrinas debido a que no se contó con los patrones necesarios para la cuantificación.

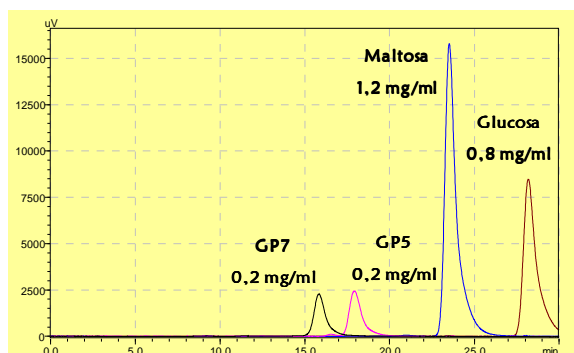


Figura 2.6: Cromatograma de los estándares empleados para la identificación y cuantificación de los azúcares.

7. Análisis estadístico

En todos los casos los ensayos experimentales se realizaron al menos por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina) (Di Rienzo et al., 2011). Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y análisis de varianza multivariado (MANOVA), según se indique. La técnica del

análisis de varianza (ANOVA) permite realizar las estimaciones de las respuestas promedio de tratamientos y las comparaciones entre ellas. El ANOVA es un procedimiento que descompone la variabilidad total en la muestra (suma de cuadrados total de las observaciones) en componentes (sumas de cuadrados) asociados cada uno a una fuente de variación reconocida (Nelder, 1994; Searle, 1971, 1987). Sin embargo, el análisis de la varianza multivariado (MANOVA) se basa en un conjunto de técnicas estadísticas que, cuando se estudian p variables para cada nivel de uno o más factores, evalúan simultáneamente medidas de varias variables en una muestra de observaciones (Johnson y Wichern, 1998; Kendall, 1975). Por lo tanto, el MANOVA analiza las diferencias globales entre las muestras teniendo en cuenta más de 1 variable. Este análisis estadístico es un análisis multidimensional de múltiples medidas cuali y cuantitativas obtenidas sobre un número de individuos u objetos. Comúnmente, el estadístico más utilizado para contrastar hipótesis multivariadas es el de Lawley-Hotelling, el que fue utilizado en los análisis estadísticos realizados.

Los resultados fueron comparados por el método de la mínima diferencia significativa test de Fisher's (LSD), con un nivel de significancia de 0,05 (Di Rienzo et al., 2002). La relación entre los distintos parámetros se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson con $p \leq 0,05$.

Resultados y Discusión

La mayor capacidad de absorción de agua de los gránulos dañados a temperatura ambiente (Farrand, 1972) resulta en un incremento en la absorción de las harinas, y permite que los gránulos dañados sean más accesibles al ataque de las amilasas en relación a los nativos, lo que deriva en una mayor producción de dextrinas. En consecuencia, se espera que la presencia de almidón dañado cause alteraciones sobre el comportamiento fisicoquímico y las características reológicas de las harinas, además de promover el deterioro de los productos panificados debido a que el agua tiene un rol muy importante en la determinación de las propiedades viscoelásticas de las masas de trigo (Dexter et al., 1994; Dexter et al., 1985; Holas y Tipples, 1978; Tipples, 1969).

Las amilasas son ampliamente utilizadas como aditivos en panificación. Diferentes enzimas amilolíticas son utilizadas con el propósito de mejorar las características de las masas y la calidad de los panificados (van der Maarel et al., 2002; Poutanen, 1997). En el capítulo anterior quedó demostrado que el incremento en el contenido de almidón dañado deteriora la calidad de los panificados, independientemente de los demás componentes de una harina. Debido a la susceptibilidad del almidón dañado a la hidrólisis enzimática (Si, 1997; Farrand, 1964), es posible que las amilasas ayuden a reducir los problemas que producen altos contenidos de almidón dañado. Teniendo en cuenta este contexto, en el capítulo 2 se describe el efecto del contenido de almidón dañado sobre el comportamiento reológico y la microestructura de las masas, y las transiciones de estado sufridas por el almidón durante la cocción de las masas. Además, se detallarán aspectos relacionados a la capacidad potencial que poseen enzimas como α -amilasa, amilasa maltogénica y amiloglicosidasa para mitigar los problemas de calidad derivados del uso de harinas con elevados niveles de almidón dañado.

Todos estos aspectos se evaluaron sobre un sistema modelo, ya que de esta manera fue posible controlar perfectamente las proporciones de almidón dañado y proteínas en el sistema, para así poder analizar la influencia de la cantidad de almidón dañado sobre las propiedades de la masa aislando la posible influencia de la calidad y la cantidad de proteínas y de los demás componentes de una harina. Se prepararon dos sistemas modelos con diferente contenido de almidón dañado, la harina H1 con 4,4% de almidón dañado y la harina H2 con 14,7% de almidón dañado; según lo descrito en materiales y métodos.

1. Perfil de viscosidad de las harinas

Los cambios de viscosidad durante el calentamiento de una harina en agua reflejan la capacidad que poseen los gránulos de almidón para retener agua e hincharse y modificar las propiedades reológicas.

El incremento en el contenido de almidón dañado de las harinas y la incorporación de enzimas afectó el perfil de viscosidad del sistema.

El perfil de viscosidad de la harina H1 registró valores de viscosidad de pico (PV), viscosidad media (VM), *setback*, y viscosidad final (VF) significativamente mayores ($p \leq 0,05$) a los hallados para la harina H2. Sin embargo, el *breakdown* no sufrió modificaciones (Tabla 2.5). Estos resultados son consistentes con los obtenidos para las harinas del capítulo 1 y con los resultados reportados por Leman et al. (2006) y Holas y Tipples (1978). La asociación entre el pico de viscosidad y el contenido de almidón dañado parece estar relacionada con un efecto de dilución de los gránulos de almidón nativos, es decir, gránulos capaces de generar un máximo incremento de la viscosidad, ya que los gránulos dañados son más frágiles y sólo contribuyen parcialmente al incremento de la viscosidad durante el calentamiento del sistema.

Tabla 2.5. Efecto del almidón dañado sobre el perfil de viscosidad del sistema.

Muestra	PV (UB)	VM (UB)	VF (UB)	Breakdown (UB)	Setback (UB)
H1	98,0 b	93,0 b	191,0 b	5,0 a	98,0 b
H2	68,0 a	64,0 a	130,0 a	4,0 a	66,0 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)
 PV: pico de viscosidad, VM: viscosidad media, VF: viscosidad final

En la mayoría de los casos, el agregado de enzimas en ambas harinas causó una reducción de los parámetros de viscosidad como era de esperar, debido a la hidrólisis de los polímeros de amilosa y amilopectina. La incorporación de α -amilasa (ALF) y amilogucosidasa (AMG) a las muestras H1 y H2 no causó efectos significativos sobre el perfil de viscosidad del sistema en las dosis utilizadas. Sin embargo, la adición de amilasa maltogénica (AMM) promovió una significativa disminución de todos los parámetros respecto al control. En relación a las mezclas enzimáticas, la adición de ALF+AMM y ALF+AMM+AMG causó una disminución significativa del perfil de viscosidad del sistema respecto al control, del mismo modo que lo registrado para AMM. La incorporación de ALF+AMG también mostró una disminución del perfil de viscosidad aunque su efecto fue menos pronunciado (Tabla 2.6 y Tabla 2.7).

La temperatura óptima de actividad de AMM es entre los 50-80 °C, mientras que, para ALF y AMG las temperaturas óptimas son entre 50-55 °C y 55-60 °C, respectivamente (Hamer, 1992; Leman et al., 2006). A diferencia de ALF y AMG, que pierden su actividad a temperaturas cercanas a los 60 °C, AMM se inactiva a temperaturas por encima de los 80 °C (Derde et al., 2012; Leman et al., 2005). Durante la evaluación de la viscosidad el sistema se calienta desde los 30 a los 95 °C, por lo que AMM bajo estas condiciones permaneció activa prácticamente durante todo el periodo de calentamiento, mientras que, ALF y AMG se inactivaron más rápidamente, se estima a mitad de este proceso. Consecuentemente, los perfiles de viscosidad en presencia de AMM resultaron más influenciados

respecto a las demás incorporaciones enzimáticas. Los gránulos de almidón comienzan a gelatinizar alrededor de los 65 °C, por lo que ALF y AMG no muestran actividad máxima durante la gelatinización de los gránulos de almidón (Leman et al., 2006, Bowles, 1996). Estas condiciones producen una nula o reducida degradación enzimática por parte de ALF y AMG. Por otro lado, AMM hidroliza una mayor proporción de gránulos gelatinizados, lo que promueve la disminución del número de gránulos hinchados capaces de contribuir al incremento de la viscosidad en el sistema, y lo que en consecuencia causa una caída significativa del perfil de viscosidad del sistema.

En ambas harinas, AMM causó una reducción del ~45% del pico de viscosidad y viscosidad media, mientras que, la viscosidad final se redujo en un ~50%. Las disminuciones sobre el *breakdown* fueron de un 50% para ambas harinas, sin embargo, en lo que respecta al *setback* las reducciones fueron de un 60% y 50% para la harina H1 y H2, respectivamente.

Las incorporaciones de ALF+AMM y ALF+AMM+AMG causaron un mayor deterioro que AMM sobre el perfil de viscosidad de la harina H1, y la diferencia entre ambas incorporaciones no fue significativa, lo que indica que AMG no contribuyó al deterioro de la viscosidad y que ALF y AMM produjeron un efecto sinérgico. Sin embargo, en la harina H2 ocurrió lo contrario, ya que ALF+AMM y ALF+AMM+AMG produjeron un menor deterioro de la viscosidad respecto a AMM, y la incorporación de AMM y ALF+AMM no presentaron diferencias significativas entre sí, lo que sugiere que AMG contribuyó en los cambios de viscosidad, aunque su efecto con AMM no fue sinérgico ya que la viscosidad fue menor que la registrada para AMM.

Aunque ALF y AMG no ocasionaron cambios significativos sobre la viscosidad en ningún caso, la adición de ALF+AMG causó un deterioro sobre el perfil de viscosidad, aunque en menor proporción que las demás adiciones que involucraron AMM, y más acentuado sobre la harina H2. Para la harina H1 las disminuciones en el perfil alcanzaron un ~3,5%, mientras que, en el caso de la harina H2 las reducciones fueron de un ~7,5%. En ambos casos el *setback* no fue modificado.

Las enzimas ALF y AMG presentaron menor termoestabilidad y se inactivan antes de la gelatinización total del almidón. Esta condición tiende a reducir en gran medida su capacidad hidrolítica. Sin embargo, en función de los resultados pareciera que un nivel inicial de almidón dañado mayor y un efecto sinérgico entre ambas enzimas conducen a una mayor hidrólisis de los polímeros de almidón, lo que promueve mayor descenso en las propiedades viscosas del sistema.

Las modificaciones en las propiedades viscosas de las harinas a causa de las incorporaciones enzimáticas están relacionadas principalmente con una menor proporción de gránulos de almidón hinchados, sin embargo, los cambios registrados sobre la viscosidad de la pasta fría y el *setback*, están asociados con las características de la amilosa dispersa en solución y con la presencia de productos de hidrólisis derivados de la degradación enzimática. Leman et al. (2006) demostraron que los sistemas de almidón suplementados con ALF conducen a un incremento en la polidispersidad de la amilosa y a una pequeña disminución del tamaño molecular de la amilopectina. Además de esto, informaron

que las adiciones de AMM reducen fuertemente los polímeros de amilosa, lo que disminuye su polidispersidad en comparación con ALF, y actúan extensamente sobre la amilopectina, lo que resulta en un incremento en la proporción de moléculas de menor peso molecular. La caída generalizada de los valores de viscosidad final y *setback* registrados indica una disminución en la tendencia de re-asociación de las moléculas amilosa durante en enfriamiento del sistema, y por lo tanto, la formación de redes más débiles. Esto está asociado con una reducción en el tamaño molecular de la amilosa y con la presencia de dextrinas, las cuales posiblemente ocasionan una alteración en los puntos de unión entre las cadenas de amilosa.

Derde et al. (2012), Leman et al. (2006) y Leman et al. (2005) han informado que una limitada reducción de la amilosa favorece la formación de una red más fuerte, aunque este efecto depende la concentración de enzima aplicada. A partir de los resultados obtenidos se evidencia el efecto contrario a un reforzamiento de la red de amilosa, lo que puede deberse a una mayor reducción molecular de la amilosa en las condiciones de análisis.

Tabla 2.6. Efecto de la adición de enzimas sobre el perfil de viscosidad de la harina H1

Muestra	PV (UB)	VM (UB)	VF (UB)	Breakdown (UB)	Setback (UB)	
H1	98,0	93,0	191,0	5,0	98,0	D
H1 + ALF	99,0	93,0	190,0	6,0	97,0	D
H1 + AMM	51,0	47,0	111,0	4,0	64,0	B
H1 + AMG	98,0	92,0	190,0	6,0	98,0	D
H1 + ALF + AMM	44,0	42,0	101,0	2,0	59,0	C
H1 + ALF + AMG	94,0	89,0	185,0	5,0	96,0	A
H1 + ALF + AMM + AMG	43,0	41,0	99,0	2,0	58,0	C

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

PV: pico de viscosidad, VM: viscosidad media, VF: viscosidad final

Tabla 2.7. Efecto de la adición de enzimas sobre el perfil de viscosidad de la harina H2

Muestra	PV (UB)	VM (UB)	VF (UB)	Breakdown (UB)	Setback (UB)	
H2	68,0	64,0	130,0	4,0	66,0	E
H2 + ALF	66,0	62,0	124,0	4,0	62,0	F
H2 + AMM	31,0	29,0	65,0	2,0	36,0	A
H2 + AMG	66,0	62,0	125,0	4,0	63,0	F
H2 + ALF + AMM	33,0	31,0	66,0	2,0	35,0	C
H2 + ALF + AMG	64,0	59,0	120,0	5,0	61,0	D
H2 + ALF + AMM + AMG	35,0	32,0	69,0	3,0	37,0	B

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

PV: pico de viscosidad, VM: viscosidad media, VF: viscosidad final

2. Comportamiento de la masa durante el amasado

El agua incorporada a una harina durante la etapa de mezclado y amasado impacta sobre la dispersión, la disolución y la hidratación de los componentes propios de la harina. La absorción y competencia del agua por parte de estos componentes son aspectos importantes que están vinculados estrechamente con las características viscoelásticas de las masas.

Al principio del proceso de mezclado y amasado, luego de que la harina y el agua entran en contacto, las partículas de harina son independientes unas de otras y la mayor parte del agua está libre, y en consecuencia el sistema no opone resistencia a su mezclado. A medida que este proceso avanza, todas las partículas de harina son hidratadas y la cantidad de agua libre disminuye, lo que promueve un incremento de la cohesión del sistema como consecuencia del desarrollo gradual de la red de gluten. Cuando todas las partículas de harina están hidratadas y el gluten se ha desarrollado hasta un nivel óptimo, la consistencia del sistema alcanza un valor máximo. Posteriormente, si el amasado continúa a lo largo del tiempo, la consistencia disminuye debido al debilitamiento del sistema a causa de la ruptura de la red de gluten (Sluimer, 2005b; D'Appolonia y Kunerth 1984).

El incremento en el contenido de almidón dañado afectó la cantidad de agua necesaria para lograr una masa de consistencia estándar (500 UB) en el farinógrafo (Tabla 2.8). Como se esperaba, la absorción de agua de las harinas incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) con el contenido de almidón dañado, debido a su gran capacidad de absorción de agua como se ha mencionado anteriormente. Los resultados registrados coinciden con lo publicado por Jovanovich et al. (2003), Berton et al. (2002), Mao y Flores (2001), Bushuk (1998) y Holas y Tipples (1978), quienes reportaron que la variación en el contenido de almidón dañado es el principal factor que causa incrementos en la capacidad de hidratación de una harina. Tipples et al. (1978) han demostrado que el contenido de almidón dañado se relaciona positiva y directamente con la absorción de una harina, y que por consiguiente debería ser considerado como un buen factor en la predicción de absorción de agua.

La presencia de una mayor proporción de material soluble en las harinas con mayor contenido de almidón dañado, derivada de la depolimerización mecánica del almidón durante la molienda (Morrison y Tester, 1994; Morrison et al., 1994), contribuye al incremento en la capacidad de absorción de agua de las harinas. En este sentido, Miyazaki et al. (2004) evaluaron el efecto de la sustitución de harina de trigo por dextrinas y llegaron a la conclusión que cuanto mayor es la masa molecular de la dextrina mayor es la absorción de agua del sistema.

De los parámetros determinados a partir de las curvas farinográficas, el tiempo de desarrollo (TD) y el grado de decaimiento (GD) aumentaron significativamente ($p \leq 0,05$) con el incremento del almidón dañado, mientras que, la estabilidad (E) no se vio afectada (Tabla 2.8). Estos resultados indican que un mayor contenido de almidón dañado causa un aumento en la energía y el tiempo necesario para la formación de la masa, además de un mayor debilitamiento del sistema como consecuencia del sobre-amasado.

Para una harina, el tiempo de desarrollo, representa el tiempo óptimo de amasado, es el tiempo que transcurre desde el comienzo del proceso hasta que el sistema alcanza el máximo de consistencia (500 UB). Este parámetro está relacionado con la capacidad que tienen las proteínas para formar la red de gluten, y se entiende que cuanto mejor sea la calidad proteica de una harina mayor será el tiempo de desarrollo. Las proteínas del gluten necesitan agua para desarrollar una red elástica y cohesiva, por lo tanto esta resulta esencial durante el proceso de formación del gluten. El agua agregada a las harinas fue la necesaria para alcanzar una masa de consistencia estándar, por lo que las proteínas tuvieron la posibilidad de absorber el agua necesaria para el desarrollo del gluten. Bajo estas condiciones, y sumado a que el contenido y calidad de las proteínas son las mismas, es razonable pensar que el tiempo de desarrollo no debería haber sido afectado por el incremento en el contenido de almidón dañado. Sin embargo, es probable que debido a la gran capacidad de absorción de agua que poseen los gránulos dañados haya disminuido la disponibilidad del agua en el sistema durante los primeros estadios del proceso de amasado, interfiriendo en la hidratación de las proteínas del gluten; lo que derivó en un incremento en el tiempo necesario para lograr una consistencia de 500 UB.

La reducción de la tolerancia al sobre-amasado puede relacionarse con una disminución en la resistencia de los gránulos dañados hinchados a las deformaciones de cizalla y extensión que se producen durante el amasado (Sluimer, 2005b; Gras et al., 2000; Zheng et al., 2000). En este sentido, la mayor fragilidad de los gránulos dañados hinchados resulta en una menor proporción de agua retenida por parte de estos gránulos, lo que deriva en un incremento de la capacidad plastificante del agua, y en consecuencia, en una menor consistencia. El agua juega un rol importante en la determinación del comportamiento viscoelástico de las masas. En este tipo de sistema, una gran parte del agua presenta una alta movilidad (agua libre), mientras que la fracción restante se encuentra estructurada solvatando las proteínas del gluten y el almidón, flexibilizando de esta manera los polímeros (Sluimer, 2005b). El agua es una molécula que tiene la capacidad de actuar como

plastificante ya que permite la flexibilización de numerosos polímeros debido a que puede introducirse entre las cadenas poliméricas espaciándolas. El efecto plastificante del agua puede explicarse mediante la teoría de lubricación, la cual afirma que los plastificantes se comportan como lubricantes internos, los cuales permiten que las cadenas poliméricas se deslicen entre sí reduciendo la fricción entre ellas. Por lo tanto, los plastificantes reducen la viscosidad de los sistemas promoviendo el flujo del material y aumentando la plasticidad, lo que los torna más maleables. Sin embargo, cuando estos se hallan presentes en cantidades insuficientes normalmente se comportan como antiplastificantes, aumentando la dureza del sistema. (Fennema, 2000; Seymour y Carraher, 1995). Existe evidencia de que en una masa de trigo el agua no funcional o libre posee un comportamiento dual, debido a que puede actuar como un relleno inerte que tiene la capacidad de disminuir las propiedades viscoelásticas, o a que puede comportarse como un lubricante mejorador de la plasticidad del sistema (Masi et al., 1998).

La estructura de una masa está determinada por las interacciones que se establecen entre los agregados proteicos hidratados (gluten), el almidón y las interacciones almidón-proteína. La base molecular de las interacciones almidón-almidón son las fuerzas de van der Waals y las uniones puente hidrógeno, las cuales son de corto alcance. Las proteínas del gluten para formar una red continua y compleja interactúan a través de enlaces di-sulfuro entre las subunidades, enlaces puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (MacRitchie, 1992). Las interacciones proteína-proteína son de largo alcance y forman la base molecular para el desarrollo de la masa (Amemiya y Menjivar, 1992). Teniendo en cuenta esto, es posible que las interacciones que dan origen a la estructura de la masa se vean perturbadas debido a la disrupción granular causada durante el amasado, siendo las interacciones almidón-almidón y proteína-almidón las más afectadas. En este sentido, es probable que las alteraciones originadas en la estructura contribuyan al deterioro de la resistencia del sistema durante el sobre-amasado.

Es importante considerar que como consecuencia del daño mecánico de los gránulos de almidón se produce una depolimerización de la amilosa y amilopectina, lo que deriva en la producción de carbohidratos de menor tamaño (Morrison y Tester, 1994; Morrison et al., 1994). Miyazaki et al. (2004) encontraron evidencia de que los incrementos en la proporción de dextrinas de grado de polimerización mayor a 20 unidades de glucosa causan reducciones en la estabilidad y grado de decaimiento de las masas, lo que está en concordancia con los resultados registrados.

Tabla 2.8. Absorción de agua de las harinas y parámetros de amasado obtenidos por análisis farinográfico.

Muestra	Absorción de agua (%)	Tiempo de desarrollo (min)	Estabilidad (min)	Grado de decaimiento (UB)
H1	60,4 a	3,27 a	24,0 a	0,0 a
H2	74,8 b	6,27 b	19,8 a	50,0 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

La incorporación de enzimas a las harinas H1 y H2 no causó alteraciones significativas ($p \leq 0,05$) sobre la hidratación de las harinas respecto sus respectivos controles (Tabla 2.9). Esto se relaciona con las condiciones propias del ensayo. El tiempo de hidratación y desarrollo de la masa en estos ensayos es corto y las temperaturas alcanzadas durante este análisis son significativamente menores a las temperaturas óptimas en la que las enzimas desarrollan su máxima actividad, por lo que, la velocidad de hidrólisis fue mínima y no alcanzó un nivel significativo de degradación de los gránulos de almidón dañados como para producir una reducción detectable en la proporción de agua necesaria para lograr una consistencia estándar. Indrani y Venkateswara Rao (2007) demostraron que la incorporación de azúcar hasta un 1,5% no produce cambios en los parámetros farinográficos, sin embargo, cuando el nivel de azúcar incrementa hasta el 9% se produce una disminución en la absorción de agua farinográfica. Sumado a esto, Duedahl-Olesen et al. (1999) informaron que la presencia de dextrinas de grado de depolimerización 1-4 no produce variaciones significativas en la absorción de agua de una harina.

Tabla 2.9. Efecto de las enzimas sobre la capacidad de hidratación de las harinas.

Muestra	Absorción de agua (%)	
	H1	H2
Control	60,4 a	74,8 a
ALF	58,8 a	72,4 a
AMM	60,4 a	75,0 a
AMG	60,4 a	75,0 a
ALF + AMM	60,0 a	72,4 a
ALF + AMG	59,6 a	72,4 a
ALF + AMM + AMG	59,6 a	72,4 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

En las masas derivadas de la harina H1 ningún agregado enzimático modificó el tiempo de desarrollo de la masa ($p \leq 0,05$), aunque, la estabilidad y el grado de decaimiento de las masas sufrieron alteraciones ($p \leq 0,05$). A diferencia de todas las incorporaciones enzimáticas, la adición de

amiloglucosidasa (AMG) no causó variaciones significativas ($p \leq 0,05$) sobre las propiedades de amasado. Las adiciones enzimáticas que involucraron la presencia de α -amilasa (ALF) promovieron disminuciones en la estabilidad de la masa e incrementos en el grado de decaimiento. Un marcado ($p \leq 0,05$) incremento de la estabilidad se registró como consecuencia de la incorporación de amilasa maltogénica (AMM), mientras que, el mayor registro de deterioro ($p \leq 0,05$) de este parámetro se alcanzó con la incorporación de ALF+AMM+AMG (Tabla 2.10).

En las masas formuladas con la harina H2, todas las adiciones enzimáticas modificaron significativamente ($p \leq 0,05$) el sistema produciendo principalmente una disminución en el tiempo de desarrollo y la estabilidad. Las incorporaciones que implicaron la presencia de ALF fueron las que registraron las disminuciones más relevantes ($p \leq 0,05$) de ambos parámetros. El grado de decaimiento sufrió alteraciones por el agregado de ALF y ALF+AMG, y en ambos casos se registró un fuerte ($p \leq 0,05$) incremento de este parámetro (Tabla 2.11).

En general, las incorporaciones enzimáticas tendieron a contrarrestar los efectos causados por el incremento del contenido de almidón dañado en las harinas, ya que disminuyeron el tiempo de desarrollo. No obstante, los aditivos enzimáticos no alteraron fuertemente el grado de decaimiento y la estabilidad resultó reducida.

Bajo las condiciones establecidas en este ensayo, las enzimas sólo pudieron acceder a los gránulos dañados capaces de gelatinizar espontáneamente, y mediante su degradación parcial, producir polímeros de almidón de menor masa molecular y debilitamiento de la estructura granular. En este sentido, Duedahl-Olesen et al. (1999) demostraron que el agregado de un 3% de carbohidratos de bajo peso molecular y dextrinas de grado de polimerización (GP) entre 17-20 disminuye el tiempo de desarrollo e incrementa la estabilidad del sistema, mientras que, moléculas más pequeñas promueven un incremento del grado de decaimiento de las masas ya que las estructuras de mayor tamaño producen una reducción de este parámetro. En relación a esto, Miyazaki et al. (2004) informaron que la sustitución de harinas con un 2,5% de dextrinas entre GP 3-19 causan disminuciones en el tiempo de desarrollo, mientras que, el efecto contrario se observa con dextrinas entre GP 25-40. Con respecto a la estabilidad, estos autores reportaron que las dextrinas entre GP 3-19 aumentan la estabilidad del sistema, mientras que, dextrinas entre GP 25-40 generan el efecto contrario. El grado de decaimiento también sufrió alteraciones, y se informó que dextrinas entre GP 8-29 promueven un aumento, mientras que, el resto de las dextrinas acusaron una disminución de este parámetro.

Considerando los efectos registrados por las enzimas sobre las propiedades de amasado de las harinas H1 y H2 es posible indicar que la producción de dextrinas a partir de la degradación enzimática de los gránulos dañados representa una reducción de la resistencia al amasado y de la tasa de tolerancia del sistema al sobre-amasado. La hidrólisis de los polímeros de almidón de los gránulos dañados hidratados produjo una disminución en su capacidad de retención de agua, lo que causó un

incremento en la proporción de agua libre en el sistema. Consecuentemente, dependiendo de los productos de hidrólisis generados por las enzimas agregadas, y por consiguiente, de la capacidad plastificante del agua libre del sistema, es que las propiedades de amasado de las masas se vieron afectadas.

La presencia de α -amilasa determinó en gran medida los cambios en las propiedades de amasado de las harinas. El detrimento en los tiempos de desarrollo y estabilidad, y el incremento en el grado de decaimiento esencialmente promovido por la acción de esta enzima se condice con lo publicado por Kim et al. (2006), quienes reportaron que el agregado de α -amilasa a una harina de trigo produce una significativa caída del tiempo de desarrollo y estabilidad de la masa, y una marcada reducción de la tolerancia al sobre-amasado. Estas alteraciones en las propiedades de amasado de las harinas han sido atribuidas a un debilitamiento de la estructura de las masas causado por la presencia de dextrinas de bajo peso molecular, producto de la hidrólisis de los gránulos dañados de almidón por la acción de α -amilasa. El hecho de que la participación de la α -amilasa haya ocasionado una mayor reducción de la estabilidad en la H2 en comparación con la harina H1, parece estar asociado con la presencia de un mayor contenido de almidón dañado, y en consecuencia con una mayor proporción de productos de hidrólisis de los polímeros de almidón en el sistema.

Como consecuencia de la degradación enzimática de los gránulos dañados, un efecto combinado entre el efecto plastificante del agua y los cambios producidos sobre las interacciones establecidas entre el almidón y el gluten explican los cambios registrados en las características de las masas.

En todas las determinaciones descriptas de aquí en adelante, las masas se prepararon según su absorción de agua farinográfica establecida mediante este ensayo.

Tabla 2.10. Efecto de la incorporación de enzimas a la harina H1 sobre los parámetros de amasado.

Muestra	Tiempo de desarrollo (min)	Estabilidad (min)	Grado de decaimiento (UB)	
H1	3,3	24,0	0,0	F
H1 + ALF	3,5	18,8	50,0	C
H1 + AMM	3,3	50,0	10,0	B
H1 + AMG	3,3	24,0	20,0	F
H1 + ALF + AMM	3,3	11,4	50,0	D
H1 + ALF + AMG	3,5	12,0	50,0	E
H1 + ALF + AMM + AMG	3,3	6,3	40,0	A

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

Tabla 2.11. Efecto de la incorporación de enzimas a la harina H2 sobre los parámetros de amasado.

Muestra	Tiempo de desarrollo (min)	Estabilidad (min)	Grado de decaimiento (UB)	
H2	6,3	19,8	50,0	E
H2 + ALF	1,8	3,0	140,0	C
H2 + AMM	5,8	14,3	60,0	B
H2 + AMG	6,5	9,0	60,0	A
H2 + ALF + AMM	4,5	5,6	60,0	G
H2 + ALF + AMG	1,5	1,8	130,0	F
H2 + ALF + AMM + AMG	3,8	5,3	55,0	D

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

3. Perfil de azúcares de las masas

La gran capacidad de hidratación que poseen los gránulos dañados permite que estos sean más accesibles al ataque de las amilasas, lo que deriva en la producción de dextrinas (Bettge et al., 1995). De esta manera, el almidón dañado es degradado enzimáticamente, lo que origina polímeros de glucosa con un patrón de distribución de tamaño que depende de las enzimas empleadas. En el almidón la amilosa representa entre 15–25%, y por lo tanto, la amilopectina es el principal sustrato potencial en la hidrólisis enzimática del almidón. El patrón de la acción de las amilasas sobre la amilopectina y amilosa se ve afectado por la estructura de estas moléculas, y por lo tanto, los perfiles moleculares de degradación enzimática difieren entre sí (Park y Rollings, 1994; 1989). En este sentido, se ha demostrado que la naturaleza del sustrato, la solubilidad, el peso molecular y la presencia de cadenas laterales impactan sobre el patrón acción de las amilasas (Goesaert et al., 2010; Bijttebier et al., 2007).

Las dextrinas de grado de polimerización en el rango de 8-14 unidades de glucosa (GP 8-14) mostraron mayor proporción que las fracciones de grado de polimerización (GP) 5 y 7 y glucosa, en el perfil de azúcares en ambas masas, H1 y H2 (Tabla 2.12). Estos resultados coinciden con los resultados publicados por Leman et al. (2009), quienes informaron la presencia de una marcada proporción de dextrinas de grado de polimerización 10-24 y una menor contribución de dextrinas con grado de polimerización menor a 9, en fracciones de amilopectina extraída de suspensiones de almidón de trigo gelatinizadas. En concordancia con esto, Bijttebier et al. (2010) demostraron que, en almidón de maíz rico en amilopectina, la presencia de un mayor porcentaje de carbohidratos entre los GP 9-24 en relación con las moléculas de GP menores a 9.

En las masas obtenidas con las harinas H1 y H2, se encontró que la proporción de dextrinas en el rango GP8-14 y glucosa no sufrieron alteraciones significativas ($p \leq 0,05$), sin embargo, la concentración de maltosa aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) en la harina H2. En ninguna de las muestras se detectó la presencia de dextrinas de GP 7 y GP 5 (Tabla 2.12 y Figura 2.6). Leman et al.

(2006), Morrison y Tester (1994) y Morrison et al. (1994) han demostrado que el daño mecánico sobre los gránulos de almidón causa una reducción de tamaño de fracciones de amilosa y amilopectina, siendo este último polímero el que resulta más afectado durante el proceso de molienda. En almidón de trigo se ha informado que la molécula de amilosa es susceptible a la degradación polimérica únicamente cuando el almidón es sometido a un daño severo, mucho mayor que lo que pueda generarse en un procedimiento de molienda común, por lo que se ha informado que la amilosa no sufre alteraciones significativas bajo niveles normales de daño, en oposición a lo que se ha observado que ocurre con la molécula de amilopectina (Morrison y Tester, 1994). Leman et al. (2006), Morrison y Tester (1994) y Morrison et al. (1994) han indicado que la degradación de los polímeros de almidón se produce como consecuencia de las fuerzas de cizalla producidas durante la molienda, y además de esto, dan cuenta de que el daño mecánico promueve la ruptura de los enlaces α -1,4 glicosídicos. A pesar de que en este estudio fue posible diferenciar a las harinas H1 y H2 en función de la concentración de maltosa como producto de la depolimerización causada por la molienda, otros autores han registrado variaciones en fragmentos entre GP 50-80 y GP 20-30 derivados de la amilopectina con el incremento en el tiempo de molienda en almidones de trigo (Morrison y Tester, 1994).

Tabla 2.12. Perfil de azúcares de las masas con diferente contenido de almidón dañado.

Muestras	GP8-14	GP7	GP5	Maltosa	Glucosa
	Relación de Área (A_{H1}/A_{H2})	(mg /100g masa liofilizada)			
H1	1,00 a	0,0	0,0	385,8 a	23,8 a
H2	0,99 a	0,0	0,0	2498,4 b	26,0 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

GP: grado de polimerización. A_{H1} : Sumatoria del área de los picos GP8-14 de la muestra H1. A_{H2} : Sumatoria del área de los picos GP8-14 correspondiente de la muestra H2.

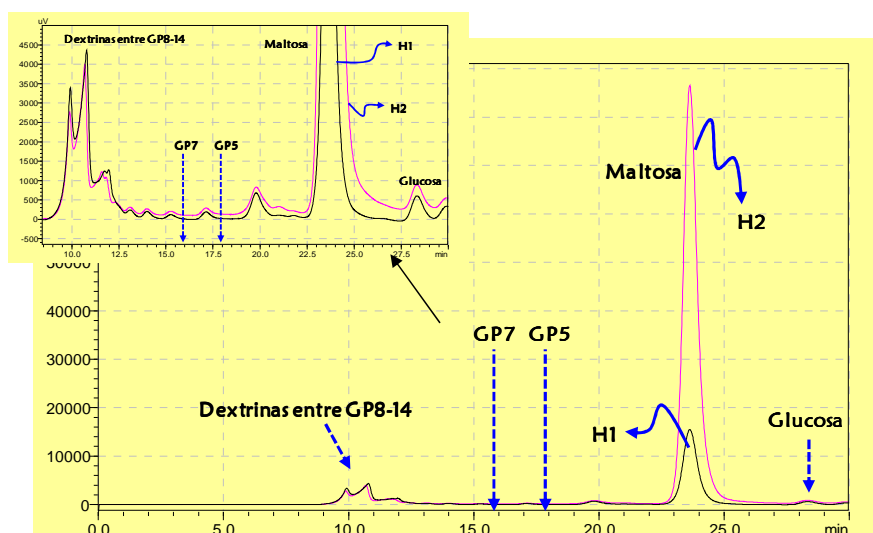


Figura 2.6: Perfil cromatográfico de las masas liofilizadas de las harinas H1 y H2.

La incorporación de enzimas a la formulación de las masas de la harina H1 y H2 causó un incremento en el nivel de dextrinas, maltosa y glucosa como era de esperar, debido a la degradación de los polímeros de almidón de los granulos dañados y posiblemente de los fragmentos derivados de la depolimerización mecánica del almidón durante la molienda (Tabla 2.13 y 2.14). En función de esto, la masa formulada con la harina H2 presentó en general una mayor proporción de dextrinas, maltosa y glucosa. En ninguna de las dos harinas el agregado de amilasa maltogénica (AMM) afectó significativamente ($p \leq 0,05$) el perfil de azúcares (Figura 2.7), sin embargo, las demás adiciones enzimáticas modificaron ($p \leq 0,05$) la proporción de GP 8-14, GP 7, GP 5, maltosa y glucosa. La aparente inactividad de AMM, puede estar relacionada con el hecho de que esta enzima presenta una actividad hidrolítica muy reducida a temperatura ambiente. Según Rosell et al. (2001), la AMM presenta una liberación relativa de carbohidratos aproximadamente un 50% menor entre los 25-35 °C que la α -amilasa. La amilasa maltogénica ejerce un patrón de ataque múltiple (Bijttebier et al., 2008; Robyt y French, 1967), ya que puede actuar como una endo- o exo-amilasa, por lo que tiende a producir casi exclusivamente maltosa (Bijttebier et al., 2010; Christophersen et al., 1998), además de algunas dextrinas como producto de hidrólisis del almidón. La inactividad observada de AMM no significa que esta enzima no haya producido ningún residuo de degradación enzimática.

En las masas H1 y H2, la presencia de α -amilasa (ALF) causó un incremento en la proporción de las dextrinas entre GP 8-14 y la concentración de GP 5 y maltosa ($p \leq 0,05$). La α -amilasa es una endo-enzima que hidroliza enlaces glucosídicos D- α (1,4) del almidón y productos relacionados cada tres o más unidades de glucosa, por lo que produce principalmente una mezcla de dextrinas de variada longitud, además de maltotriosa y maltosa (Muralikrishnaa y Nirmala, 2005), lo que coincide con los resultados obtenidos. En este sentido, Bijttebier et al. (2010) informaron la producción de oligosacaridos en el rango entre GP 2-10 a partir de la hidrólisis de almidón de maíz rico en

amilopectina gelatinizado mediante el uso de esta enzima. Asimismo, Di Cagno et al. (2003) demostraron que la presencia de α -amilasa incrementa la concentración de maltosa en las masas de 25 a 40 mmol/L en las condiciones de ensayo.

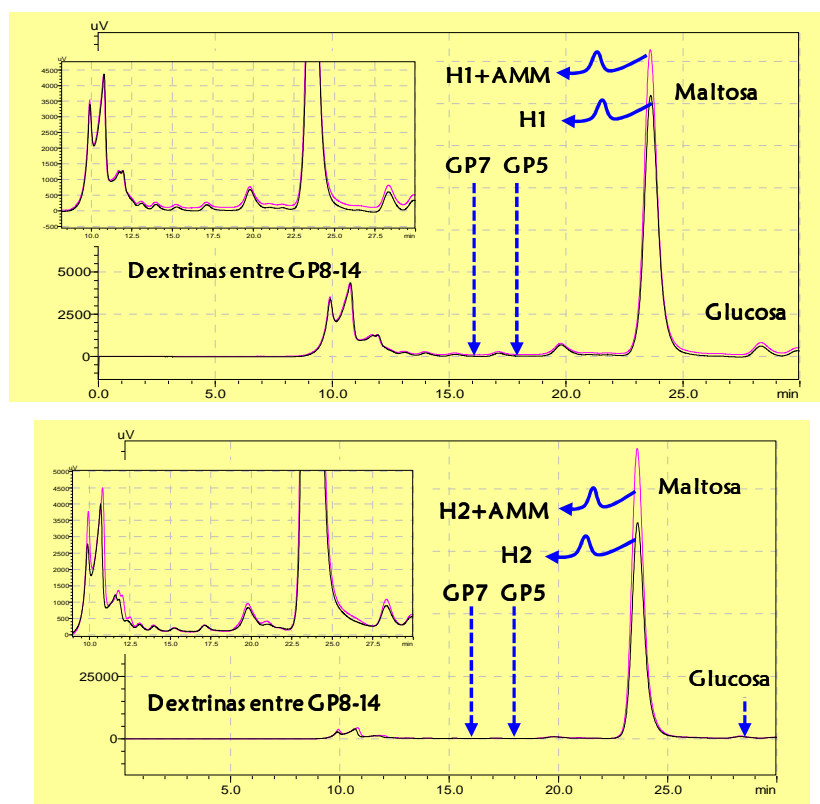


Figura 2.7: Perfil cromatográfico de las masas liofilizadas de las harinas H1 y H2 con amilasa maltogénica.

En relación a los carbohidratos de grado de polimerización 7 (GP 7), en la masa H1 se registró que la amiloglucosidasa (AMG) promovió especialmente el incremento de esta molécula ($p \leq 0,05$), aunque en la masa H2 no se observó la presencia de GP 7 en ningún caso. La concentración de maltosa en la masa formulada con H1 y H2 aumentó ($p \leq 0,05$) por la presencia de ALF y en general disminuyó ($p \leq 0,05$) al estar presente en el sistema AMG, ya que causó aumentos en la proporción de glucosa. La amiloglucosidasa es una exo-enzima que hidroliza enlaces glucosídicos D- α -(1,4) y D- α -(1,6) de los extremos no reductores de los polímeros de almidón y moléculas afines, y debido a que actúa sobre los residuos externos de glucosa produce principalmente la liberación de glucosa. Al igual que lo reportado por Fujii et al. (1988), los resultados muestran que la hidrólisis de los gránulos con un sistema mixto de α -amilasa y amiloglucosidasa, promueve una mayor formación de azúcares solubles que los generados por cada enzima por separado. El rol de la α -amilasa en la mezcla de ALF+AMG fue suministrar nuevos sustratos para la amiloglucosidasa mediante una degradación aleatoria mediada por el mecanismo endo-enzimático de moléculas de mayor tamaño. En este sentido, la

amiloglucosidasa mediante su acción exo-enzimática desprendió monómeros o dímeros desde el extremo no reductor de las moléculas de sustrato. Este efecto sinérgico establecido entre ambas enzimas ha sido reportado por Fujii y Kawamura (1985) y Fujii et al. (1988, 1981).

Tabla 2.13. Efecto de la adición de enzimas sobre el perfil de azúcares de masas formuladas con la harina H1.

Muestras	GP8-14	GP7	GP5	Maltosa	Glucosa	
	Relación de Área (A _c /A _x)	(mg /100g masa liofilizada)				
H1	1,00	0,0	0,0	385,8	23,8	B
H1 + ALF	1,37	0,0	5,9	777,8	34,4	D
H1 + AMM	0,99	0,0	0,0	448,4	24,2	B
H1 + AMG	1,13	2,4	1,5	88,5	1310,0	A
H1 + ALF + AMM	1,45	0,0	7,7	762,1	41,1	D
H1 + ALF + AMG	1,18	2,7	19,1	133,5	1902,2	C
H1 + ALF + AMM + AMG	1,18	3,9	19,5	106,6	1950,7	C

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

GP: grado de polimerización. A_c: Sumatoria del área de los picos GP8-14 de la muestra control. A_x: Sumatoria del área de los picos GP8-14 correspondiente a cada muestra con enzimas.

Tabla 2.14. Efecto de la incorporación enzimática sobre el perfil de azúcares de masas formuladas con la harina H2.

Muestras	GP8-14	GP7	GP5	Maltosa	Glucosa	
	Relación de Área (A _c /A _x)	(mg /100g masa liofilizada)				
H2	1,00	0,0	0,0	2498,4	26,0	F
H2 + ALF	2,23	0,0	1,3	4516,7	48,7	D
H2 + AMM	1,06	0,0	0,0	2808,8	29,2	F
H2 + AMG	1,16	0,0	0,0	1465,4	2532,2	A
H2 + ALF + AMM	2,15	0,0	1,3	4012,7	40,9	C
H2 + ALF + AMG	2,37	0,0	7,5	2936,3	3038,3	E
H2 + ALF + AMM + AMG	2,46	0,0	10,6	3009,2	3027,6	B

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

GP: grado de polimerización. A_c: Sumatoria del área de los picos GP8-14 de la muestra control. A_x: Sumatoria del área de los picos GP8-14 correspondiente a cada muestra con enzimas.

4. Adhesividad de las masas

Una propiedad reológica de importancia durante el procesamiento y transformación de las masas panarias es su pegajosidad, ya que afecta la manipulación de las masas durante la producción de panificados. La pegajosidad es una característica que resulta del balance entre las fuerzas de adhesividad y cohesividad de un material. Las fuerzas intermoleculares de atracción que mantienen unidas las moléculas internamente en un material son denominadas fuerzas cohesivas, mientras que, a las fuerzas intermoleculares de atracción que mantienen unido un material a la superficie de otro se

las conoce como fuerzas adhesivas. En estos términos, la pegajosidad es una propiedad textural que se define como la fuerza de adhesión que resulta cuando dos superficies se ponen en contacto, la que está relacionada con la resistencia que oponen las interacciones internas a adherirse a la superficie de otro material. Si la adhesividad es mayor que la cohesividad parte del material se adherirá a una superficie, lo que significa que el material no tiene la cualidad de permanecer compacto (Hoseney y Smewing, 1999).

El aumento del contenido de almidón dañado incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) la adhesividad de las masas, lo que se traduce en masas más pegajosas (Tabla 2.15). En acuerdo con estas observaciones, Ghodke et al. (2009) presentaron resultados que indican que la adhesividad de las masas incrementa con el contenido de almidón dañado presente en las harinas. En este estudio las masas evaluadas no fueron preparadas según la absorción farinográfica, por lo tanto, los cambios registrados por estos autores están asociados a una redistribución del agua en el sistema causada por una mayor proporción de almidón dañado. El almidón dañado tiende a ocasionar una restricción del agua en el sistema y como consecuencia a promover la formación de una masa con estructura menos desarrollada. Sumado a esta condición, es posible que en este caso las enzimas propias de las harinas hayan degradado los granulos dañados, lo que contribuye a una reducción de la capacidad de retención de agua de estos granulos y por consiguiente promueve un aumento en la proporción de agua libre en el sistema.

Los cambios en la pegajosidad de las masas pueden estar relacionados con un cambio en la estructura interna de la masa, ya que una mayor adhesividad está relacionada con una menor cohesividad del sistema. Asimismo, las alteraciones en la cantidad de agua libre pueden afectar las propiedades adhesivas. La alteración en la cantidad de los componentes solubles de una harina modifica la adhesividad resultante de una masa (Chen y Hoseney, 1995). En este sentido, las variaciones en el contenido de almidón dañado, y en los niveles de dextrinas y azúcares simples producidos por el daño mecánico de los gránulos de almidón, modificaron la absorción de agua de una harina e influyeron sobre las propiedades plastificantes del agua libre en la masa.

El agua agregada a las harinas no fue una limitante en el sistema para el óptimo desarrollo de la red de gluten, ya que las masas se prepararon agregando agua según la absorción farinográfica de las harinas. A partir de que los valores de contenido de gluten húmedo ($H1 = 32,4\%$; $H2 = 31,2\%$) y seco ($H1 = 13,9\%$; $H2 = 13,5\%$) determinados para ambas masas producidas según su absorción de agua farinográfica, no presentaron diferencias significativas, y dado que ambas masas se formaron bajo las mismas condiciones energéticas de amasado de amasado, se asume un desarrollo de gluten completo en ambos sistemas.

La estructura de la masa H2 resulta en una red de gluten más abierta debido al mayor tamaño de los gránulos dañados hinchados inmersos en ella, lo que sugiere una alteración de las interacciones internas establecidas en el sistema, y lo que deriva en una estructura menos cohesiva.

Consecuentemente, una estructura más debilitada no ofrece un arreglo de contención suficiente para el agua libre, quedando esta más accesible en la superficie lo que contribuye con un incremento de la adhesividad.

Es probable que los gránulos de almidón dañados fuertemente hidratados inmersos en la red de gluten hayan sido más sensibles a las fuerzas de corte originadas durante la formación de la masa, y consecuentemente se hayan desestructurado más fácilmente. Esta condición favorece la reducción en las propiedades cohesivas del sistema, ya que las interacciones proteína-almidón y almidón-almidón son menores, y el agua no retenida por los gránulos dañados queda en consecuencia más disponible para contribuir con la adhesividad.

En relación a las incorporaciones enzimáticas, ninguno de los agregados enzimáticos evaluados en las dosis estudiadas alcanzó a modificar la adhesividad de las masas formuladas con la H1 y H2. En ningún caso se registró un cambio significativo ($p \leq 0,05$) de la adhesividad del sistema, a excepción de la incorporación de α -amilasa (ALF) en la masa con menor contenido de almidón dañado (H1), la que ocasionó un incremento sobre este parámetro (Tabla 2.15). No obstante, es posible que la técnica empleada para evaluar la adhesividad no haya sido suficientemente sensible como para registrar las diferencias ocasionadas sobre el sistema como resultado de la presencia de una mayor proporción de azúcares solubles como resultado de la acción enzimática.

Según Autio y Laurikainen (1997) la presencia de α -amilasa produce masas pegajosas que conllevan a problemas de manipulación, lo que se relaciona a una excesiva degradación del almidón dañado como consecuencia de una sobredosis enzimática; por lo que la proporción de esta enzima en una formulación debe ser cuidadosamente optimizada.

Los resultados indican que los efectos principales sobre las características adhesivas de las masas están relacionados con el debilitamiento de la estructura interna derivado de la reducción en las interacciones proteína-proteína, almidón-proteína y almidón-almidón, y los cambios en la capacidad plastificante del agua. La presencia de una mayor proporción de azúcares solubles, como consecuencia de la hidrólisis enzimática del almidón no afecta significativamente las propiedades cohesivas en el sistema.

Tabla 2.15. Efecto del almidón dañado y de la incorporación de enzimas sobre la adhesividad de las masas.

Muestras	Adhesividad de masa (g)			
	H1		H2	
Control	34,6	p ab	56,5	s ab
ALF	42,7	c	54,5	a
AMM	38,4	bc	56,1	ab
AMG	35,1	ab	65,5	b
ALF + AMM	33,2	ab	58,6	ab
ALF + AMG	32,4	a	60,6	ab
ALF + AMM + AMG	34,4	ab	57,9	ab

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA). Las letras *p* y *s* indican la diferencia estadística entre los controles.

5. Extensibilidad de las masas

La caracterización reológica de las masas panarias es de verdadera importancia, ya que provee información valiosa relativa a la calidad de las materias primas y las características de los productos terminados. Las propiedades reológicas de las masas son influenciadas por numerosos factores como: calidad de la harina, formulación, contenido de humedad, energía aplicada durante el amasado y temperatura. En relación a la harina, aunque el constituyente principal es el almidón, la fracción proteica es la que determina principalmente las propiedades de extensión de las masas. Los gránulos de almidón juegan un rol importante durante la etapa de cocción (gelatinización) de las masas en la obtención de productos panificados, aunque en menor grado en la masa cruda (Létang et al., 1999).

A lo largo del proceso de elaboración de los productos panificados las masas son sometidas a sucesivos procesos durante los cuales se aplican grandes deformaciones sobre el sistema. Durante el proceso de amasado y laminado, las masas experimentan deformaciones que involucran principalmente su extensión. En función de esto, es ampliamente aceptado, que las propiedades de extensión que presenten las masas tienen un efecto directo sobre la calidad de los panificados.

El contenido de almidón dañado alteró las propiedades de extensibilidad de las masas (Figura 2.8), ya que se registró un incremento ($p \leq 0,05$) de la resistencia máxima (*R_m*) y una disminución ($p \leq 0,05$) de la extensibilidad (*E*) y del trabajo de deformación necesario para extender la masa hasta su ruptura (*A*) (Tabla 2.16). Estos resultados indican que los incrementos en el contenido de almidón dañado producen masas más resistentes y menos extensibles. La reducción registrada en el trabajo de deformación sugiere un debilitamiento de la estructura de la masa. En coincidencia con estos resultados, Dexter et al. (1994), mediante un análisis de extensión biaxial, informaron el desarrollo de masas más tenaces y menos extensibles como consecuencia del incremento en el contenido de almidón dañado en harinas derivadas de trigo duros. En concordancia con estas observaciones, Jovanovich et al. (2003) reportaron la existencia de una correlación positiva y significativa entre el contenido de

almidón dañado y los parámetros derivados de análisis de extensión biaxial, pese a las diferencias en la composición de las harinas analizadas. Rao et al. (2010) demostraron que el grado de daño del almidón reduce la extensibilidad de las masas e incrementa su dureza. Asimismo, en coincidencia con los demás autores, El-Porai et al. (2013) informaron que una intensa molienda afecta las propiedades de extensión de las masas, ya que se registraron reducciones en la extensibilidad. Es importante destacar que todos estos antecedentes fueron obtenidos a través de estudios en los que la proporción de agua y tiempo de amasado fueron iguales para todas las muestras de harina en cada caso. Por lo tanto, las diferencias encontradas por estos autores están relacionadas con una re-distribución del agua en el sistema causada por la presencia de una mayor proporción de almidón dañado, lo que resulta en masas con un menor desarrollo de gluten y en consecuencia con una alteración de los parámetros de extensibilidad.

En este trabajo, a diferencia de los estudios previos, el agua adicionada para la formación de las masas fue suficiente para asegurar el completo desarrollo del gluten. Por lo tanto, se considera que las estructuras de gluten en H1 y H2 fueron igualmente desarrolladas como se discutió previamente. Sin embargo, la presencia de un mayor número de gránulos hinchados (gránulos dañados) inmersos en la red sugiere una estructura tridimensional más abierta y posiblemente más debilitada, la cual tiende a presentar un arreglo estructural más rígido y con sus propiedades extensibles reducidas. El aumento de la rigidez de las masas puede estar relacionado con una redistribución del agua causada por los gránulos dañados y el material lixiviado, lo que afecta las propiedades plastificantes del agua.

Tabla 2.16. Efecto del almidón dañado sobre las propiedades de extensibilidad de las masas.

Muestras	Resistencia máxima (g)	Extensibilidad (mm)	Trabajo de deformación (g/mm)
H1	46,3 a	21,6 b	788,7 b
H2	64,7 b	17,3 a	692,1 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

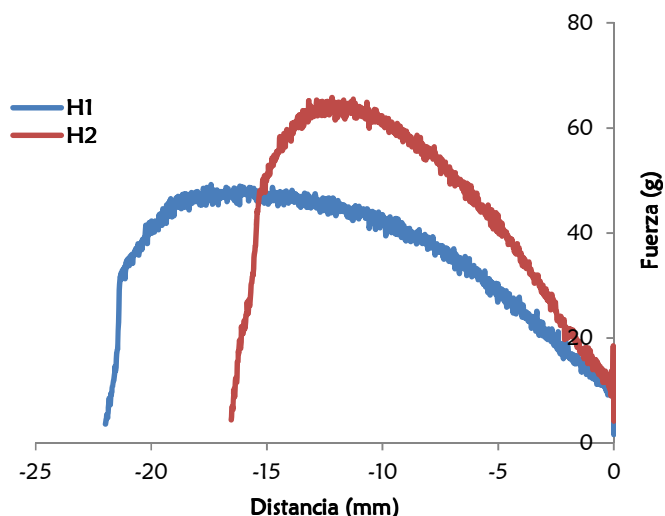


Figura 2.8: Efecto del contenido de almidón dañado sobre la extensibilidad de las masas

Las incorporaciones enzimáticas causaron una respuesta reológica diferente al incrementar el contenido de almidón dañado en el sistema. En general, en las masas con menor contenido de almidón dañado (H1), las adiciones enzimáticas promovieron un incremento ($p \leq 0,05$) de la resistencia máxima y una disminución ($p \leq 0,05$) de extensibilidad, mientras que el trabajo de deformación no fue modificado ($p \leq 0,05$). Sin embargo, en las masas con mayor contenido de almidón dañado (H2) los agregados enzimáticos tendieron a disminuir ($p \leq 0,05$) la resistencia máxima y el trabajo de deformación, pero no causaron alteraciones sobre la extensibilidad ($p \leq 0,05$) (Tabla 2.17 y 2.18). Estos resultados indicaron que en las formulaciones con H1 las adiciones enzimáticas produjeron masas más resistentes y menos extensibles, mientras que, en las masas con H2 las enzimas generaron masas menos resistentes y con una estructura debilitada, en función de las reducciones observadas sobre el trabajo de deformación, todo esto en relación a sus respectivos controles. La reducción en la resistencia de las masas H2 por efecto de las enzimas fue el único aspecto reológico que registró mejora frente al deterioro observado sobre este parámetro al comparar las masas controles H1 y H2 (Tabla 2.16). Además, es importante destacar, que los valores de resistencia alcanzados en todos estos casos fueron cercanos al observado en el control H1.

La respuesta mecánica opuesta registrada en las masas H1 y H2 por la incorporación de las enzimas posiblemente haya sido determinada por las diferencias en las características estructurales de la matriz en cada sistema. La degradación de los gránulos dañados hidratados en la masa H1 tiende a aumentar la proporción de dextrinas en el sistema. Estas dextrinas promueven una reducción de la proporción de agua libre en la masa, por lo que las propiedades plastificantes del agua disminuyeron en estas circunstancias, explicando los cambios descriptos en el sistema. Por el contrario, en la masa H2 la presencia y degradación de una mayor proporción de gránulos dañados hidratados por parte de las enzimas derivó en un aumento de las proporciones de agua libre del sistema, debido a la

desintegración granular. De esta manera, la plastización del sistema promovió una disminución de la resistencia de las masas. En la masa H2 la producción de dextrinas es mayor que en H1, sin embargo, debido a que la capacidad de retención de agua de los gránulos de almidón es mayor que la de las moléculas que derivan de su hidrólisis enzimática, el incremento resultante del agua libre en este sistema es significativo en relación a las masas H1.

El efecto reológico causado por las enzimas sobre las masas H2, pudo estar asociado también con una disminución en la cohesividad de la estructura debido a una menor proporción de interacciones del tipo almidón-proteína y almidón-almidón como consecuencia de la degradación enzimática de una mayor proporción de gránulos de almidón dañados hidratados. Asimismo, es probable que la presencia de una mayor proporción de dextrinas generadas bajo estas circunstancias pueda ocasionar interferencias entre las interacciones proteína-proteína del gluten, lo que debilitaría su estructura.

En las masas formuladas con H1, tanto las propiedades de extensibilidad de las masas (Tabla 2.17) y los perfiles de los azúcares (Tabla 2.13) con α -amilasa (ALF), amilasa maltogénica (AMM) y amiloglucosidasa (AMG) cambiaron significativamente ($p \leq 0,05$). La masa con ALF se distinguió de las masas con AMM y AMG porque presentó mayor proporción de GP 14-8 y una mayor concentración de GP 5 y maltosa, mientras que, la masa con AMG se destacó por tener mayor concentración de GP 7 y glucosa. Esto sugiere que las diferencias en las propiedades de extensión estuvieron relacionadas con la proporción de gránulos hidrolizados, la cantidad de dextrinas generadas y su tamaño molecular. En este sentido, ALF y AMG causaron una mayor desintegración de los gránulos dañados, lo que parece contribuir con una mayor alteración en la estructura del sistema. Además, es posible que también una mayor proporción de productos de hidrólisis, sumado a los diferentes perfiles de tamaños moleculares, afecten las proporciones del agua libre, lo que puede causar diferencias sobre las propiedades reológicas del sistema. Las propiedades de extensibilidad de las masas con ALF y ALF+AMM+AMG fueron equivalentes ($p \leq 0,05$), al igual que lo registrado para las masas formuladas con AMM y ALF+AMM. Sin embargo, no se encontraron similitudes entre los perfiles de azúcares solubles de las masas mencionadas (Tabla 2.13). La mezcla de ALF+AMG fue la incorporación que causó el mayor incremento sobre la resistencia a la deformación y la mayor disminución sobre la extensibilidad que cada enzima por separado. En consecuencia, queda demostrada la sinergia entre ambas enzimas; discutida con anterioridad al analizar el contenido de azúcares de las masas. Estos resultados confirman que una mayor desintegración de los gránulos dañados, sumado a la mayor proporción de productos de hidrólisis y al efecto de los distintos tamaños moleculares, tienen un efecto sobre las propiedades reológicas de las masas, a partir de cambios ocasionados sobre las propiedades plastificantes del agua y la estructura del sistema.

En contraste con lo observado en las masas de H1, en las masas formuladas con la harina H2, la incorporación de α -amilasa (ALF), amilasa maltogénica (AMM) y amiloglucosidasa (AMG) derivó

en masas con propiedades de extensión semejantes entre sí ($p \leq 0,05$). Este comportamiento no se relacionó con los perfiles de azúcares solubles obtenidos para estas masas, ya que los perfiles fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 2.14). Estos resultados indicaron que el mecanismo de acción y el tipo y cantidad de los productos de degradación no resultaron factores determinantes en la respuesta reológica de las masas. Las características de extensibilidad de las masas con ALF+AMG fueron similares ($p \leq 0,05$) a las de las masas con ALF y AMM, mientras que, las masas con ALF+AMM+AMG resultaron semejantes ($p \leq 0,05$) a las masas con ALF, AMM y AMG (Tabla 2.14).

En relación a los efectos que causa la incorporación de α -amilasa sobre los parámetros de extensión de las masas producidas con harina de trigo, Kim et al. (2006) demostraron que la adición de esta enzima resulta en una disminución de la extensibilidad y en un aumento de la resistencia en todas las masas, lo que coincide con los resultados encontrados. Con respecto a los efectos producidos por la acción de amilasa maltogénica y amiloglucosidasa, no se han reportado resultados bibliográficos para cotejar los efectos registrados.

Tabla 2.17. Efecto de la incorporación de enzimas sobre las propiedades de extensibilidad de las masas formuladas con H1.

Muestras	Resistencia máxima (g)	Extensibilidad (mm)	Trabajo de deformación (g/mm)	
H1	46,3	21,6	788,7	C
H1 + ALF	86,4	15,0	657,5	E
H1 + AMM	66,4	17,8	786,2	D
H1 + AMG	85,8	18,5	946,8	A
H1 + ALF + AMM	55,8	17,3	808,3	D
H1 + ALF + AMG	94,9	14,4	934,8	B
H1 + ALF + AMM + AMG	89,7	15,2	730,9	E

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

Tabla 2.18. Efecto de la incorporación de enzimas sobre las propiedades de extensibilidad de las masas formuladas con H2.

Muestras	Resistencia máxima (g)	Extensibilidad (mm)	Trabajo de deformación (g/mm)	
H2	64,7	17,3	692,1	A
H2 + ALF	48,1	17,6	570,3	CD
H2 + AMM	40,5	18,8	529,0	CD
H2 + AMG	41,8	16,2	582,8	D
H2 + ALF + AMM	47,7	15,7	487,9	B
H2 + ALF + AMG	43,5	18,5	472,2	C
H2 + ALF + AMM + AMG	42,4	17,1	584,1	D

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

6. Viscoelasticidad de masa

Las masas obtenidas a partir de harinas de trigo se comportan como un material viscoelástico, es decir, presentan simultáneamente las características de un líquido viscoso y de un sólido elástico. El comportamiento macroscópico de una masa depende de su microestructura, la cual está determinada por su composición, las disposiciones espaciales de los componentes y los diferentes tipos de interacciones existentes, y son las características propias de esa estructura las que tienen influencia directa sobre las propiedades reológicas.

Durante la preparación de una masa, el almidón absorbe agua hasta un $\sim 30\%$. Su función en la masa todavía no está muy clara, y en este sentido, se ha sugerido que actúa como material de relleno inerte en la matriz de proteína continua de la masa (Bloksma, 1990), aunque también, se ha descrito a las masas como una red bicontinua de almidón y proteína (Eliasson y Larsson, 1993a). En ambas consideraciones, los gránulos de almidón se encuentran presentes en el sistema en estado nativo donde permanecen en estado semi-cristalino (Hug-Iten et al, 1999). En este contexto, la red de gluten es la principal responsable del comportamiento viscoelástico único de las masas de trigo. En la red de gluten, los polímeros de glutenina proporcionan resistencia y la elasticidad de la masa (Belton, 1999; Ewart, 1972), mientras que, por otro lado, las gliadinas monoméricas aportan viscosidad al sistema y por lo tanto contribuyen con la extensibilidad de las masas (Khatkaret al., 1995; Cornec et al., 1994).

Una característica propia de los materiales viscoelásticos es que experimentan fluencia, es decir, continúan deformándose bajo la aplicación de un esfuerzo constante. Las curvas de fluencia de las masas formuladas con las harinas H1 y H2 exhibieron un comportamiento viscoelástico típico (Figura 2.9), representado por la combinación de la componente fluido-viscosa y la componente elástica (Steffe, 1996b), y en coincidencia con lo registrado para masas de trigo por Lazaridou et al. (2007), Sozer y Dalgic (2006), Sivaramakrishnan et al. (2004), y Edwards et al. (2000), (1999).

Para describir el comportamiento viscoelástico de las masas, las curvas de capacitancia en función del tiempo se ajustaron a través del modelo reológico de Burgers por análisis de regresión no lineal, y el nivel de ajuste fue asociado a un coeficiente de determinación mayor a 0,90.

El contenido de almidón dañado afectó las propiedades viscoelásticas de las masas (Figura 2.9), ya que las masas H2 fueron más resistentes a la deformación y presentaron una menor respuesta elástica. Los parámetros del modelo reológico indicaron que el aumento en el contenido de almidón dañado causó una disminución significativa de la capacitancia elástica instantánea (J_0), la capacitancia elástica retardada (J_1) y capacitancia máxima (J_{max}) ($p \leq 0,05$), y un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de la viscosidad newtoniana (η) del sistema. El tiempo de relajación del componente Kelvin (λ_{ret}) en el modelo, que está relacionado con el tiempo requerido para deformar la muestra, no presentó alteraciones por el almidón dañado presente en sistema (Tabla 2.15).

Estos resultados indicaron que las masas H2 fueron menos elásticas, más rígidas y más viscosas. Como se mencionó anteriormente, estos cambios pueden explicarse por una estructura menos cohesiva y menos plastificada por el agua. La presencia de una mayor proporción de gránulos dañados e hidratados inmersos en la red de gluten se traduce en cambios negativos sobre las propiedades elásticas del sistema. El desarrollo de una estructura de gluten más abierta en este sistema resulta en un arreglo estructural de características más rígidas y menos elástica. El agua juega un rol importante en la determinación del comportamiento viscoelástico de estos sistemas. Las masas H2 presentaron una mayor proporción de agua (H2= 43,98%; H1= 39,94%), sin embargo, mostraron mayor resistencia a fluir. Estos efectos están relacionados con una menor capacidad plastificante del agua.

Tabla 2.19. Efecto del almidón dañado sobre las propiedades viscoelásticas de las masas.

Muestras	J_0 (Pa ⁻¹) $\times 10^{-5}$	J_1 (Pa ⁻¹) $\times 10^{-5}$	J_{max} (Pa ⁻¹) $\times 10^{-4}$	λ_{ret} (s)	η (Pa.s) $\times 10^6$
H1	7,3 b	7,5 b	1,7 b	2,5 a	1,8 a
H2	2,4 a	1,3 a	0,4 a	2,9 a	6,6 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA). J_0 : capacitancia elástica instantánea. J_1 : capacitancia elástica retardada. J_{max} : capacitancia máxima. η : viscosidad newtoniana. λ_{ret} : tiempo de relajación del componente Kelvin.

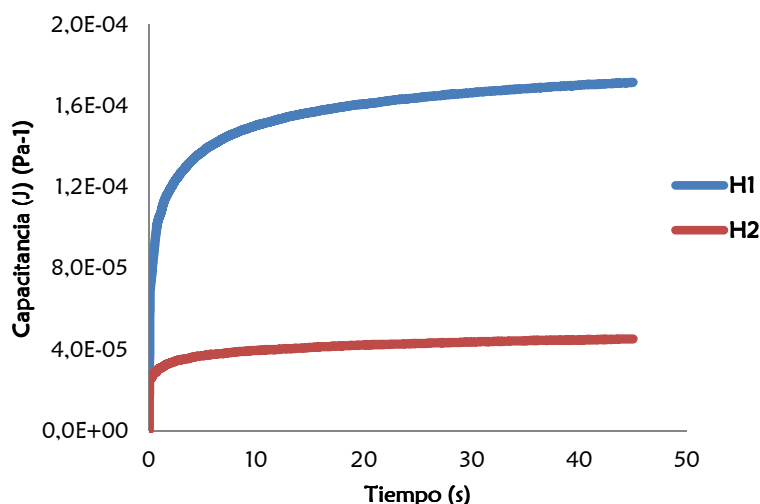


Figura 2.9: Curvas de fluencia de las masas H1 y H2.

En las masas H1, las adiciones enzimáticas disminuyeron las propiedades elásticas y aumentaron la rigidez y la viscosidad de la estructura ($p \leq 0,05$), a excepción de la adición de amilasa maltogénica (AMM) que no ocasionó cambios significativos sobre los parámetros evaluados (Tabla 2.20). Sin embargo, en las masas con mayor almidón dañado las enzimas incrementaron ($p \leq 0,05$) los parámetros asociados con la elasticidad y redujeron la rigidez y la viscosidad del sistema ($p \leq 0,05$), a diferencia del agregado de AMM que no causó diferencias relevantes (Tabla 2.21). Estos resultados indican que las enzimas mejoraron las propiedades reológicas de las masas H2 cuando se compararon con las masas controles (Tabla 2.19). No obstante, en general, los valores registrados no alcanzaron a aproximarse a los valores observados para el control H1.

El hecho de que las masas H1 y H2 hayan respondido de una manera diferente a las adiciones enzimáticas se debió principalmente a las diferencias en la estructura del sistema, como se ha mencionado anteriormente. La obtención de un sistema más rígido y viscoso y menos elástico como resultado del agregado de las enzimas en las masas H1 estuvo relacionado con una reducción en las propiedades plastificantes del agua. La degradación enzimática de la amilosa y la amilopectina de los gránulos dañados hidratados incrementó la proporción de dextrinas en el sistema, y en consecuencia, se promovió una reducción de la proporción de agua libre en la masa, lo que se traduce en un incremento en la resistencia de la estructura a fluir. Es posible que los cambios sobre las propiedades elásticas también estén relacionados con la presencia de una mayor proporción de dextrinas por su interferencia en la red de gluten.

Las masas H2 con mayor contenido de almidón dañado y la presencia de las enzimas, resultaron en sistemas menos rígidos y viscosos y más elásticos. Estas características reológicas sugieren una mayor capacidad plastificante del agua en el sistema, como consecuencia de una menor retención por parte de la mayor desintegración granular.

Las propiedades viscoelásticas de las masas formuladas con H1 y la incorporación de enzimas fueron semejantes entre sí ($p \leq 0,05$), pero significativamente ($p \leq 0,05$) diferentes del control, a diferencia de amilasa maltogénica (AMM) que no causó efectos. En las masas H2 se registró un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre el perfil viscoelástico del sistema con la presencia de α -amilasa (ALF) y sus mezclas, mientras que, amilasa maltogénica (AMM) y amiloglucosidasa (AMG) no causaron modificaciones sobre las características reológicas de las masas. En relación a estos resultados, es posible indicar que el tamaño y las proporciones de azúcares y dextrinas generados en cada caso no resultó ser un factor determinante en la respuesta reológica de las masas. En términos generales, el mecanismo de acción de las enzimas ensayadas no afectó la respuesta reológica de ambos sistemas. En ningún caso se observó sinergia entre la mezcla de α -amilasa y amiloglucosidasa.

Tabla 2.20. Efecto de las adiciones enzimáticas sobre las propiedades viscoelásticas de masas con 4,4AD.

Muestras	J_0 (Pa ⁻¹) $\times 10^{-5}$	J_1 (Pa ⁻¹) $\times 10^{-5}$	J_{max} (Pa ⁻¹) $\times 10^{-4}$	λ_{ret} (s)	η (Pa.s) $\times 10^6$	
H1	7,3	7,5	1,7	2,5	1,8	A
H1 + ALF	5,8	5,9	1,4	2,9	2,1	B
H1 + AMM	6,3	6,5	1,5	2,8	1,8	AB
H1 + AMG	5,7	5,9	1,4	2,8	2,3	B
H1 + ALF + AMM	6,0	6,6	1,5	3,0	1,9	B
H1 + ALF + AMG	5,7	5,8	1,3	2,8	2,3	B
H1 + ALF + AMM + AMG	5,0	5,4	1,2	2,9	2,5	B

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA). J_0 : capacitancia elástica instantánea. J_1 : capacitancia elástica retardada. J_{max} : capacitancia máxima. η : viscosidad newtoniana. λ_{ret} : tiempo de relajación del componente Kelvin.

Tabla 2.21. Efecto de las adiciones enzimáticas sobre las propiedades viscoelásticas de masas con 14,7AD.

Muestras	J_0 (Pa ⁻¹) $\times 10^{-5}$	J_1 (Pa ⁻¹) $\times 10^{-5}$	J_{max} (Pa ⁻¹) $\times 10^{-4}$	λ_{ret} (s)	η (Pa.s) $\times 10^6$	
H2	2,4	1,3	0,44	2,9	6,6	AB
H2 + ALF	4,4	2,9	0,86	2,2	3,8	C
H2 + AMM	2,2	1,3	0,41	3,2	7,0	B
H2 + AMG	3,8	1,5	0,60	2,6	6,6	B
H2 + ALF + AMM	4,2	3,8	0,93	2,3	3,3	C
H2 + ALF + AMG	4,7	3,1	0,89	2,1	4,0	C
H2 + ALF + AMM + AMG	3,2	2,2	0,63	2,7	4,7	AC

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA). J_0 : capacitancia elástica instantánea. J_1 : capacitancia elástica retardada. J_{max} : capacitancia máxima. η : viscosidad newtoniana. λ_{ret} : tiempo de relajación del componente Kelvin.

7. Propiedades térmicas

En la producción de panificados, durante la cocción de las masas, debido a la combinación de calor, humedad y tiempo, los gránulos de almidón inmersos en la matriz de gluten gelatinizan, aunque conservan su identidad granular (Hug-Iten et al., 1999; Varriano-Marston et al., 1980). Posteriormente, durante el enfriamiento del sistema y el almacenamiento, las moléculas de amilosa y amilopectina recristalizan parcialmente, lo que tiene relación directa con el endurecimiento de las piezas panarias. Debido a que las propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón son influenciadas por las alteraciones físicas o químicas que puedan ocasionarse sobre los gránulos (Copeland et al., 2009), las características estructurales que dan origen a los productos panificados se ven influenciadas por esta condición.

7.1 Gelatinización

Los termogramas de las masas H1 y H2 se presentan en la Figura 2.10. El perfil térmico de las masas formuladas con la harina H1 (39,94% de humedad) y H2 (43,98% de humedad) muestra una endoterma de gelatinización (endoterma-G) alrededor de los 60 °C, acompañada de otra endoterma en torno a los 90 °C (endoterma-M) asociada a la fusión de las regiones del gránulo que no fueron plastificadas con el agua, acorde con el modelo propuesto Donovan (1979). La aparición de la endoterma de fusión en ambas masas, se debe a que las proporciones de agua presente en el sistema no fueron suficientes como para promover la gelatinización total de almidón. La gelatinización de los gránulos de almidón es iniciada cuando el grado de movilidad molecular alcanza un nivel crítico en la región amorfa de los gránulos. Esta movilidad es controlada por el grado de plastización inducido por el agua y el calor. Por lo tanto, cuando la plastización ocasionada por el solvente no alcanza el nivel crítico requerido, la movilidad molecular y la disrupción molecular del sistema se producen únicamente a través de la plastización térmica (Perry y Donald, 2002).

El contenido de almidón dañado afectó el proceso de gelatinización del almidón durante la simulación del horneado de las masas, ya que se registraron disminuciones ($p \leq 0,05$) en la entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}) e incrementos ($p \leq 0,05$) en la temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), finalización (T_{end}) y pico (T_p) (Tabla 2.22). La tendencia observada sobre la entalpía de gelatinización del almidón, coincide con lo registrado y discutido en las harinas provenientes de los tres cultivares presentadas en el capítulo anterior. El hecho de que la gelatinización espontánea de los gránulos dañados es un proceso de similares características a la gelatinización causada por calor (Morrison et al., 1994) resulta en una menor proporción de gránulos capaces de contribuir al cambio en la entalpía registrado, lo que explica los resultados obtenidos.

Los incrementos sobre la temperatura de finalización y pico registrados como consecuencia del incremento del contenido de almidón dañado están influenciados por la endoterma de fusión acoplada a la de gelatinización. Las reducciones en la endoterma de gelatinización e incrementos en

el tamaño de la endoterma de fusión promueven un desplazamiento de las endotermas hacia mayores temperaturas y por lo tanto, a un incremento paulatino del ancho de pico (Biliaderis, 2009).

Tabla 2.22. Efecto del almidón dañado sobre los parámetros de gelatinización del almidón en masas.

Muestras	ΔH_{gel} (J/g)	T_0 (°C)	T_{end} (°C)	T_p (°C)	Ancho de pico ($T_{end}-T_0$) (°C)
H1	4,30 a	61,13 a	73,27 a	65,57 a	7,34 a
H2	3,01 b	62,70 b	84,00 b	70,15 b	17,02 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

Entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}), temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}) y temperatura de pico (T_p).

Los valores de ΔH están expresados en J/g de masa seca

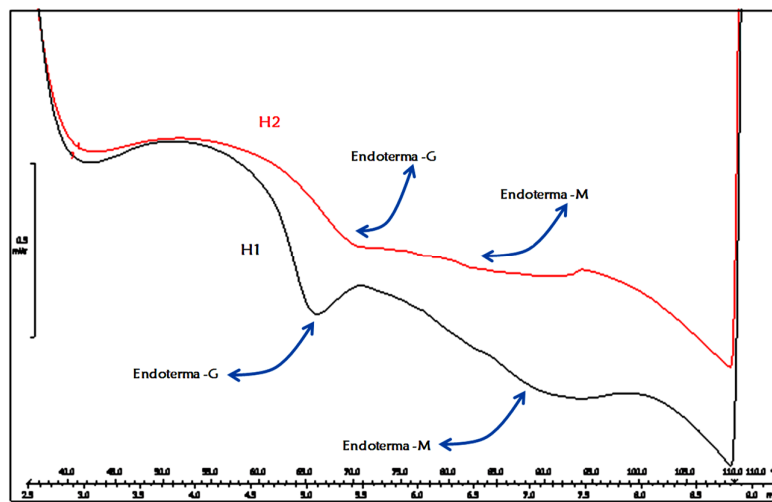


Figura 2.10: Efecto del almidón dañado sobre el proceso de gelatinización del almidón durante una simulación de horneado de la masa.

Durante los primeros estadios de la cocción de las masas panarias, además de la degradación enzimática de los gránulos dañados gelatinizados, se suma la hidrólisis del almidón de los gránulos nativos que bajo estas condiciones de calor y humedad gelatinizan. En este contexto es importante tener en cuenta la temperatura óptima de actividad de la enzimas presentes, ya que de esto dependerá su impacto durante esta fase del proceso de elaboración de panificados.

La incorporación de enzimas a las masas H1 y H2 sólo afectó la temperatura de inicio de la gelatinización (T_0) y pico (T_p), mientras que la entalpía (ΔH_{gel}), temperatura de finalización (T_{end}) y el ancho de pico no registraron modificaciones (Tabla 2.23 y 2.24). En las masas formuladas con H1 se observó un incremento ($p \leq 0,05$) sobre la temperatura de inicio de la gelatinización y sobre la temperatura de pico, sin embargo, en las masas H2 sólo se registraron incrementos sobre la

temperatura de pico ($p \leq 0,05$). Los incrementos observados en las temperaturas de inicio de la gelatinización y pico están relacionados con la mayor proporción de dextrinas y de azúcares simples provenientes de la hidrólisis enzimática del almidón. En este sentido, Sopadea et al. (2004), Perry y Donald (2002) y Duran et al. (2001) observaron que el incremento de azúcares solubles en la fase acuosa retarda la gelatinización del almidón, lo que deriva en un incremento de la temperatura de inicio de la gelatinización y pico de gelatinización. La presencia de azúcares disueltos en la fase acuosa de la masa reduce el nivel de plastización del agua ya que estas moléculas presentan una alta densidad de grupos $-OH$, y por lo tanto, tienden a disminuir la movilidad del agua (Tester y Sommerville, 2003; Perry y Donald, 2002). Como resultado de este efecto, la plastización de las regiones amorfas de los gránulos se ve reducida, y por consiguiente, se requiere de un mayor nivel de energía térmica inicial para que los gránulos de almidón puedan hincharse y comenzar a gelatinizar (Perry y Donald, 2002). Los resultados obtenidos también concuerdan con lo informado por Miyazaki et al. (2004), quienes al evaluar las propiedades de gelatinización de masas elaboradas con harina de trigo sustituidas con diferentes dextrinas, registraron un leve incremento sobre las temperaturas de inicio de la gelatinización y pico al aumentar el grado de sustitución con dextrinas. Esto autores atribuyeron este efecto a una mayor restricción del agua en el sistema causada por la presencia de dextrinas. En acuerdo con esto, Spies y Hoseney (1982) informaron el incremento en la temperatura de gelatinización como consecuencia del incremento en la concentración y longitud de los azúcares en el sistema. Al igual que Chinachoti et al. (1991) quienes observaron un incremento en la temperatura de gelatinización en almidones de trigo a causa de incrementos en la concentración de sacarosa.

La interacción entre los gránulos de almidón y dextrinas también podría contribuir a los cambios térmicos registrados en las masas H2. En este sentido, Lee et al. (2002) reportaron que la entalpía de fusión del almidón se relaciona positivamente con el grado de asociación entre polisacáridos y el almidón. Estos autores sugirieron que tal asociación tiende a reducir la movilidad de las cadenas del almidón, y por lo tanto, más energía térmica se requiere para que el almidón comience a gelatinizar, lo que se traduce en un incremento de la temperatura de inicio de la gelatinización.

Los resultados hasta aquí obtenidos muestran que, antes de que el almidón comience a gelatinizar por efecto de la temperatura y humedad, la acción degradativa sobre los gránulos dañados gelatinizados viene dada principalmente por α -amilasa (ALF) y amiloglucosidasa (AMG). Como ya se mencionó anteriormente la temperatura óptima de actividad de estas enzimas ronda alrededor de los 50 °C y que la temperatura de inactivación se aproxima a los 60 °C. Por lo tanto, estas enzimas permanecen prácticamente inactivas durante la gelatinización del almidón, debido a que la temperatura de inicio de la gelatinización fue próxima a los 62 °C. Los productos de la acción de ambas enzimas sobre los gránulos dañados gelatinizados producidos antes del calentamiento de la masa y durante el calentamiento, hasta los 60 °C, son los que afectan el proceso de gelatinización.

Por otro lado, la amilasa maltogénica (AMM) presenta su máxima actividad durante la gelatinización del almidón, ya que su temperatura de actividad óptima es alrededor de los 70 °C, por lo que no causaría cambios significativos sobre el almidón hasta una vez comenzada la gelatinización. En función de esto, todos los cambios registrados sobre la temperatura de inicio de la gelatinización y pico estarían determinados por efecto de la acción de ALF y AMG. A diferencia del fuerte deterioro sobre el pico de viscosidad observado en el perfil de viscosidad de las harinas (Tabla 2.6 y 2.7), AMM no acusó cambios sobre la entalpía de gelatinización. Es posible que este efecto esté relacionado con la cantidad de agua libre del sistema, ya que en las masas la proporción de agua libre fue menor en relación a las suspensiones preparadas para evaluar la viscosidad. En este sentido, debido a que la actividad de una enzima es influenciada por la proporción de agua del sistema, es probable que la acción de AMM no haya producido cambios aparentes sobre la entalpía de gelatinización en ningún caso.

En la masa H1 los únicos agregados enzimáticos que causaron modificaciones ($p \leq 0,05$) sobre el proceso de gelatinización fueron los de ALF, AMM y la mezcla de las tres enzimas (ALF+AMM+AMG), respecto al control. En los tres casos el perfil térmico fue semejante entre sí ($p \leq 0,05$), aunque el perfil de azúcares de cada masa fue significativamente diferente entre sí ($p \leq 0,05$) (Tabla 2.13). En las masas formuladas con H2 únicamente la incorporación de ALF+AMM y ALF+AMG consiguió modificar significativamente ($p \leq 0,05$) el perfil térmico, en relación al control. A pesar de que ambas masas presentaron un perfil térmico semejante ($p \leq 0,05$), el perfil de azúcares fue significativamente diferente ($p \leq 0,05$) en los dos casos (Tabla 2.14). Estos resultados indican que el tamaño y proporciones de azúcares y dextrinas producidos en cada caso no parecen afectar el proceso de gelatinización. En relación a este comportamiento, la respuesta térmica de ambos sistemas por el agregado de las enzimas pareciera no depender del mecanismo de acción de la enzima.

Tabla 2.23. Efecto de la incorporación de enzimas sobre los parámetros de gelatinización del almidón en masas H1 durante el horneado.

Muestras	ΔH_{gel} (J/g)	T_0 (°C)	T_{end} (°C)	T_p (°C)	Ancho de pico ($T_{end}-T_0$) (°C)	
H1	4,33	61,07	73,42	65,60	7,55	B
H1 + ALF	3,73	62,29	74,48	66,73	7,11	AC
H1 + AMM	3,80	61,92	74,61	66,30	7,42	A
H1 + AMG	4,16	61,66	74,17	66,21	7,77	ABC
H1 + ALF + AMM	4,22	61,91	74,05	66,46	7,33	BC
H1 + ALF + AMG	4,15	61,99	74,35	66,60	7,38	BC
H1 + ALF + AMM + AMG	4,51	62,10	74,47	66,66	7,35	AC

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA).

Entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}), temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}) y temperatura de pico (T_p).

Los valores de ΔH están expresados en J/g de masa seca

Tabla 2.24. Efecto de la incorporación de enzimas sobre los parámetros de gelatinización del almidón en masas H2 durante el horneado.

Muestras	ΔH_{gel} (J/g)	T_0 (°C)	T_{end} (°C)	T_p (°C)	Ancho de pico ($T_{end}-T_0$) (°C)	
H2	3,01	62,72	83,99	70,16	17,02	A
H2 + ALF	3,43	63,44	87,67	71,43	16,43	AB
H2 + AMM	3,11	61,63	87,94	70,89	16,04	AB
H2 + AMG	3,39	62,69	87,05	70,57	15,42	AB
H2 + ALF + AMM	3,59	64,06	90,96	72,31	15,43	B
H2 + ALF + AMG	3,58	63,84	88,94	72,18	15,18	B
H2 + ALF + AMM + AMG	3,51	63,85	88,29	71,79	14,90	AB

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA).

Entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}), temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}) y temperatura de pico (T_p).

Los valores de ΔH están expresados en J/g de masa seca

7.2 Retrogradación

El grado de retrogradación de la amilopectina a los 9 días de almacenamiento no sufrió cambios significativos ($p \leq 0,05$) por el incremento en el contenido de almidón dañado en el sistema (Tabla 2.25). Estos resultados apoyan la tendencia presentada en el capítulo 1, donde se demostró que la entalpía de retrogradación de la amilopectina es principalmente afectada por el incremento en el contenido de almidón dañado durante los primeros días de almacenamiento.

Tabla 2.25. Efecto del almidón dañado sobre los parámetros de retrogradación del almidón en masas almacenadas durante 9 días luego del horneado.

Muestras	ΔH_{ret} (J/g)	T_0 (°C)	T_{end} (°C)	T_p (°C)
H1	2,21 a	47,07 a	68,43 a	55,80 a
H2	1,92 a	44,30 a	68,18 a	55,43 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

Entalpía de retrogradación (ΔH_{ret}), temperatura de inicio de la retrogradación (T_0), temperatura de finalización de la retrogradación (T_{end}) y temperatura de pico (T_p). Los valores de ΔH están expresados en J/g de masa seca

La incorporación de enzimas afectó ($p \leq 0,05$) los parámetros de retrogradación de las masas H1, sin embargo, en la masa H2 no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) de las muestras respecto al control por efecto de la adición de enzimas (Tabla 2.26 y 2.27). Las determinaciones de la entalpía y las temperaturas llevaron asociados un alto porcentaje de error debido a que los valores de energía involucrados en este proceso fueron bajos, por lo que las diferencias entre las muestras se vieron afectadas por esta condición.

En la masa H1, AMG y las mezclas de ALF+AMM, ALF+AMG incrementaron ($p \leq 0,05$) la entalpía de retrogradación, y la mezcla ALF+AMM+AMG disminuyó ($p \leq 0,05$) la temperatura de pico. Por otro lado, en la masa H2 a pesar de que no se registraron cambios significativos sobre el perfil de retrogradación, el agregado de AMG en este caso también causó un aumento ($p \leq 0,05$) de la entalpía de retrogradación.

Las dextrinas derivadas de la acción de las amilasas interfieren con la retrogradación de la amilopectina (Defloor y Delcour, 1999; Min et al., 1998; León et al., 1997) y/o con la formación de interacciones entre los gránulos hinchados y la red de proteínas (Martin y Hosenev, 1991) en los productos panificados. Sin embargo, en contraste con esta teoría, otros autores (Duedahl-Olesen et al., 1999; Gerrard et al., 1997) proponen que las dextrinas producidas por la acción de las amilasas son un indicador de la modificación de la amilosa y amilopectina y que a partir de esto, los cambios en las propiedades de retrogradación se deben a la modificación de la estructura del almidón. En este sentido, Zobel y Senti (1959) sugirieron que las endo-amilasas escinden las cadenas largas de almidón, las cuales pueden unir diferentes regiones cristalinas. De esta manera, la estructura de la red de almidón resulta debilitada y menos rígida, lo que contribuye a una reducción en la capacidad de retrogradación del sistema. También se ha propuesto que las exo-amilasas pueden actuar sobre las ramas exteriores de la amilopectina, las cuales debido a que sobresalen del espacio inter-granular son más accesibles. La eliminación de estas cadenas de dobles hélices dificulta la formación de dobles hélices y la formación de cristales y/o el entrecruzamiento entre la amilosa y la amilopectina contribuyendo a una menor retrogradación (Bowles, 1996; Zobel y Kulp, 1996).

A pesar de que es conocido que la adición de enzimas amilolíticas reduce la capacidad de retrogradación del almidón, en general, los resultados registrados a los 9 días de almacenamiento no reflejaron una disminución de la entalpía de retrogradación de la amilopectina. Posiblemente la degradación polimérica que causaron las enzimas, principalmente ALF y AMG, sobre el almidón no resultó suficiente como para causar una reducción en la capacidad de re-asociación de amilopectina. Por otro lado, los registros de incremento en el cambio de entalpía causados por la presencia de AMG, quizás estén relacionados con el hecho de que esta enzima tiende a producir dextrinas GP 7 (Tabla 2.13), las cuales se ha demostrado que tienden a producir un incremento sobre la entalpía de retrogradación del almidón (Duran et al., 2001). Los resultados observados, en concordancia con Duran et al. (2001), sugieren que este tipo de moléculas podría contribuir a alguna cristalización adicional, lo que deriva en una mayor retrogradación en las masas. En contraposición con lo propuesto por Gudmundsson (1994) quien ha sugerido que las moléculas de almidón con menos de 15 unidades de glucosa no participarían en el proceso de retrogradación. Por otro lado, en apoyo a los resultados observados, Wang y Jane (1994) han propuesto la posibilidad de una posible co-cristalización cuando al almidón se le adicionan polisacáridos de alto grado de polimerización.

Tabla 2.26. Efecto de la incorporación de enzimas sobre los parámetros de retrogradación del almidón en las masas H1 almacenadas durante 9 días luego del horneado.

Muestras	ΔH_{ret} (J/g)	T_o (°C)	T_{end} (°C)	T_p (°C)	
H1	2,21	47,06	68,43	55,81	D
H1 + ALF	2,75	45,11	66,15	56,60	AD
H1 + AMM	2,54	45,95	68,82	56,28	D
H1 + AMG	2,97	45,85	70,00	55,65	ABCD
H1 + ALF + AMM	3,17	44,34	67,77	54,33	ABC
H1 + ALF + AMG	3,69	44,00	69,29	56,75	C
H1 + ALF + AMM + AMG	2,35	41,22	68,93	51,06	B

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

Entalpía de retrogradación (ΔH_{ret}), temperatura de inicio de la retrogradación (T_o), temperatura de finalización de la retrogradación (T_{end}) y temperatura de pico (T_p).

Los valores de ΔH están expresados en J/g de masa seca.

Tabla 2.27. Efecto de la incorporación de enzimas sobre los parámetros de retrogradación del almidón en las masas H2 almacenadas durante 9 días luego del horneado.

Muestras	ΔH_{ret} (J/g)	T_0 (°C)	T_{end} (°C)	T_p (°C)	
H2	1,92	44,29	68,16	55,42	AB
H2 + ALF	1,41	42,68	67,07	52,12	B
H2 + AMM	1,83	42,91	66,79	52,17	AB
H2 + AMG	2,58	42,06	66,95	52,34	A
H2 + ALF + AMM	1,53	43,95	66,33	54,19	B
H2 + ALF + AMG	1,76	45,47	62,89	53,47	B
H2 + ALF + AMM + AMG	1,69	44,22	66,83	53,35	B

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (MANOVA)

Entalpía de retrogradación (ΔH_{ret}), temperatura de inicio de la retrogradación (T_0), temperatura de finalización de la retrogradación (T_{end}) y temperatura de pico (T_p).

Los valores de ΔH están expresados en J/g de masa seca

8. Conclusiones

El incremento en el contenido de almidón dañado y la presencia de los productos de degradación molecular del almidón a causa del daño físico afectaron la formación de las masas, causando un debilitamiento de las propiedades funcionales de las masas. Las propiedades de extensibilidad, adhesivas y viscoelásticas resultaron afectadas. Las propiedades térmicas del almidón también se vieron influenciadas, registrándose un efecto significativo en el proceso de gelatinización, aunque no así en la retrogradación de la amilopectina evaluada al cabo de los 9 días de almacenamiento.

Los resultados permiten concluir que los cambios en la capacidad plastificante del agua fueron los principales responsables de las alteraciones en el comportamiento reológico de las masas y propiedades térmicas del almidón, además del efecto que causa el gran poder de absorción de agua del almidón dañado y las interacciones que se establecen entre el almidón y los demás componentes del sistema.

Las incorporaciones enzimáticas causaron una respuesta reológica diferente cuando se incrementó el contenido de almidón dañado en el sistema. La reducción en la resistencia de las masas y las mejoras sobre las propiedades viscoelásticas por efecto de las enzimas resultaron aspectos positivos frente a los cambios ocasionados por un mayor porcentaje de almidón dañado en el sistema. En general, se determinó que la adición de amilasa maltogénica en la dosis empleada no tuvo un efecto significativo sobre el perfil de azúcares de las masas, ni sobre las características reológicas y térmicas del sistema. Además de esto, se registró una sinergia entre la α -amilasa y la amiloglicosidasa. La presencia de amiloglicosidasa promovió la reducción de la concentración de maltosa de las masas.

La gelatinización del almidón de las masas durante la simulación del horneado y la evaluación de la amilopectina retrogradada durante el almacenamiento no fue afectado significativamente por

las adiciones enzimáticas, las dextrinas derivadas de la hidrólisis del almidón afectaron únicamente las temperaturas involucradas en el proceso de gelatinización, mientras que, los parámetros de retrogradación no resultaron significativamente afectados en ningún aspecto.

En función de esto, es posible concluir que las propiedades reológicas de las masas con alto contenido de almidón dañado cambiaron positivamente como consecuencia de la acción enzimática, posibilitando la utilización de estas amilasas y sus mezclas como aditivos correctores de harinas con elevado almidón dañado.

Capítulo 3

*Efecto del daño mecánico sobre la
integridad estructural y las propiedades
fisicoquímicas del almidón*

Materiales y Métodos

1. Muestras

El almidón de trigo sin modificar (S5127 Sigma-Aldrich CAS Number 9005-25-8) (Tabla 3.1) se trató en un molino a disco Whisper Series Bench Top (Rocklabs, Auckland, New Zealand) para lograr una mayor ruptura de los gránulos. Durante la molienda del almidón la temperatura se monitoreó, no superando los 40 °C. Se prepararon muestras de almidón de trigo con diferente contenido de almidón dañado mezclando almidón nativo (3,7% almidón dañado) y parcialmente dañado (35,7% almidón dañado). Los valores de almidón dañado se seleccionaron (Tabla 3.2) con el propósito de que los mismos estuvieran dentro del rango de daño comparable al inducido en el trigo pan por la molienda de rodillos seca (Ghodke et al., 2009).

Tabla 3.1. Composición del almidón de trigo.

	Almidón de trigo (Sigma-Aldrich)
Amilosa¹ (%)	31,1±0,89
Humedad² (%)	10,5±0,25
Proteínas (%)	≤0,2*
Almidón dañado³ (%)	3,7±0,2

1. Determinado por el kit de ensayo amilosa/amilopectina (Megazyme International, Irlanda)

2. Método 44-19, 44-01; AACC, 2000

4. Método 76-30A; AACC, 2000

*. Especificaciones del producto

Tabla 3.2. Muestras de almidón con diferente contenido de almidón dañado.

Muestra	Almidón dañado ¹ (%)	Humedad ² (%)
AD 1	3,7 a	
AD 2	8,1 b	10,5
AD 3	12,4 c	
AD 4	22,8 d	

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

1. Método 76-30A; AACC, 2000

2. Método 44-19, 44-01; AACC, 2000

2. Distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño granular se determinó por difracción láser (Mastersizer 2000E ver. 5.20, Malvern, Reino Unido). Esta técnica consiste en medir el tamaño de las partículas por difracción de un haz de luz láser. Las partículas expuestas a un rayo láser paralelo desvían la luz con un ángulo fijo que depende de su tamaño, por lo que este método se basa en que el ángulo de difracción es

inversamente proporcional al tamaño de la partícula. A partir de esto, la distribución de la intensidad de la luz dispersada se utiliza para calcular la distribución del tamaño de partícula de un conjunto de partículas.

El tamaño de las partículas hidratadas en agua se llevó a cabo de dos formas diferentes. En el primer caso, las muestras de almidón se transfirieron directamente al tanque de dispersión del analizador de tamaño de partícula conteniendo agua micropore filtrada. Esta medición se definió como tiempo inicial. En el segundo caso, se prepararon suspensiones de almidón en agua (6,25% p/p), las cuales se mantuvieron en agitación constante durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las suspensiones de almidón se transfirieron al tanque de dispersión del analizador de partículas conteniendo agua micropore filtrada, y de esta manera se determinó la distribución de tamaño de partícula.

Los parámetros de distribución de tamaño provistos por el equipo fueron: distribución porcentual de volumen de partícula, d_{10} , d_{50} y d_{90} , diámetro medio *De Brouckere* ($D_{4,3}$) y diámetro medio *Sauter* ($D_{3,2}$). Los valores d_{10} , d_{50} , y d_{90} indican que el 10%, 50%, y 90% de las partículas tuvieron valores de diámetro menor o igual al valor designado, respectivamente. El diámetro medio *De Brouckere* ($D_{4,3}$) es el diámetro medio del volumen equivalente de las partículas, y el diámetro medio *Sauter* ($D_{3,2}$) es diámetro medio de la superficie equivalente de las partículas. Todos estos parámetros se calcularon asumiendo que los gránulos de almidón son partículas esféricas (Malvern Instruments, 1999).

3. Propiedades reológicas de las suspensiones de almidón

3.1 Propiedades de flujo

Las propiedades de flujo de las suspensiones de almidón no calentadas se evaluaron mediante un ensayo de flujo en un reómetro de esfuerzo controlado (AR 1000-TA Instrument, EUA). Los ensayos de flujo se utilizan para caracterizar y modelizar el comportamiento de distintos fluidos.

Para los ensayos se utilizó una geometría de plato de acero (40 mm de diámetro) y se trabajó con un *gap* de 0,5 mm. Para las determinaciones se prepararon suspensiones de almidón en agua (20% p/p), las cuales se mantuvieron en agitación continua, suficiente para mantener los gránulos de almidón suspendidos, durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, una alícuota (1 ml) de las suspensiones se colocó sobre la placa inferior del reómetro y se dejó equilibrar a 25 °C. Durante el ensayo, el plato superior se aceleró uniformemente desde 0 a 300 1/s en 3 min (rampa 1), y seguidamente se mantuvo la velocidad de deformación en cizalla o velocidad de cizalla constante por 10 min (rampa de mantenimiento). Consecutivamente, la velocidad de cizalla disminuyó uniformemente durante 3 min hasta detenerse (rampa 2), e inmediatamente se aceleró de 0 a 300 s⁻¹ en 3 min nuevamente (rampa 3). La respuesta del sistema se monitoreó durante todo el ciclo, y se

obtuvieron graficas de esfuerzo de corte vs velocidad de cizalla. La velocidad de cizalla aplicada en las determinaciones reológicas de flujo no afectaron las condiciones de medición.

Para caracterizar el comportamiento de flujo de las suspensiones de almidón se utilizó el modelo de la ley de la potencia. Este modelo es utilizado para describir datos experimentales de fluidos del tipo pseudoplásticos o dilatantes (Rao, 1999a):

$$\tau = K * (\dot{\gamma})^n$$

donde K es el coeficiente de consistencia (Pa) y n el índice de comportamiento de flujo (adimensional). El índice de consistencia está relacionado con el grado de estructuración del sistema, y el índice de flujo indica cuán alejado está el fluido del comportamiento newtoniano (si n=1, el fluido se comporta de manera newtoniana; si es menor que 1, lo hace como un fluido pseudoplástico y si es mayor que 1 se comporta como un fluido dilatante).

Con el propósito de minimizar los efectos de sedimentación del almidón durante el ensayo, el modelo se aplicó a los datos experimentales de la rampa descendente, la cual comienza a mayores velocidades de cizalla. Los parámetros del modelo de la ley de la potencia se estimaron por ajuste de los valores experimentales mediante el software SIGMAPLOT 10 (Systat Software, Inc., Alemania).

3.2 Evaluación de la dependencia en el tiempo

Los datos experimentales derivados del ensayo de flujo se utilizaron para describir el comportamiento reológico dependiente del tiempo de las suspensiones de almidón mediante la aplicación del modelo de Weltman (1943).

El modelo de Weltman se utiliza para caracterizar el comportamiento tixotrópico y reopéctico de alimentos (Rao, 1999a):

$$\tau = A + B * (\ln t)$$

donde ζ es el esfuerzo de corte (Pa), t es el tiempo (s) y A (valor del stress cuando t=1s) y B son constantes. Para fluidos tixotrópicos B toma valores negativos, y para fluidos con comportamiento dilatante esta constante toma valores positivos. La constante A es asociada con el umbral de fluencia y B es relacionada con la extensión de la tixotropía (Rao, 1999a).

Los parámetros del modelo de Weltman se estimaron por ajuste de los datos experimentales provenientes de la rampa del ensayo de flujo en donde la velocidad de cizalla se mantuvo constante (300 s⁻¹ durante 10 min) mediante el software SIGMAPLOT 10 (Systat Software, Inc., Alemania).

4. Determinación de la amilosa lixiviada de los gránulos

La proporción de amilosa/amilopectina en el material lixiviado durante la hidratación e hinchamiento de los gránulos de almidón a temperatura ambiente se determinó mediante el método descrito por Gibson et al. (1997) usando el kit de ensayo amilosa/amilopectina (Megazyme International, Irlanda). Para la cuantificación de la proporción de amilosa/amilopectina se omitió la etapa de gelatinización química con dimetil sulfóxido (DMSO) y gelatinización con calor (100 °C durante 15 min) involucrada en la técnica. Los resultados fueron expresados en gramos de amilosa lixiviada por cada 100 g de almidón disponible.

Para la cuantificación, se prepararon suspensiones de almidón en agua (11,8% p/p), las cuales se agitaron durante 40 min cada 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min y los sobrenadantes recogidos se calentaron a 50-55 °C durante 5 min. Una alícuota de 1,5 ml se utilizó para determinar el porcentaje de amilosa y amilopectina lixiviado como consecuencia de la hidratación e hinchamiento de los gránulos de almidón.

5. Comportamiento térmico del almidón

5.1 Análisis de la Viscosidad

El perfil de viscosidad se determinó a través de un Viscoanalizador Rápido (RVA-4) usando el método general RVA pasting (Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia).

Para la determinación se utilizó el método de perfil de pasting STD1 (Método 76-21; AACC, 2000). Las suspensiones de 3,5 g de almidón (humedad conocida) y $25 \pm 0,1$ ml de agua se calentaron hasta 50 °C, mientras se agitaba a 160 rpm por 10 s para lograr una completa dispersión. La temperatura del sistema se mantuvo a 50 °C por 1 min, y luego se incrementó hasta alcanzar los 95 °C. La velocidad de calentamiento fue de 9,4 °C/min y la velocidad de agitación de 960 rpm. La temperatura de las mezclas se mantuvo constante a 95°C durante 2,5 min, y luego disminuyó hasta alcanzar los 50°C a una velocidad de enfriamiento de 11,8 °C/min

A partir de las curvas de viscosidad se determinó el pico de viscosidad o viscosidad máxima (PV), la viscosidad media (VM), viscosidad final (VF), “*breakdown*” (PV – VM) y “*setback*” (VF – VM).

5.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las transiciones de estado ocasionadas durante el calentamiento del almidón en agua se registraron mediante un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC823e Calorimeter Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza), con software STARe Default DB V9.00 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza). Se colocaron 20 mg de almidón en cápsulas calorimétricas de aluminio de 100 µl y posteriormente se adicionó agua hasta alcanzar fracciones de volumen de agua (Fv) de 0,82; 0,70; 0,60; 0,56; 0,51; 0,50; 0,48; 0,43; 0,37 y 0,35. La fracción de volumen se calculó considerando la

densidad (δ) del almidón de 1,536 g/cm³. Las cápsulas se cerraron herméticamente y se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente antes de ser sometidas al análisis.

Gelatinización

Durante el ensayo, las cápsulas se calentaron de 30 °C a 120 °C a una velocidad de 10 °C/min. A partir de los gráficos de flujo de calor versus temperatura se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}), rango de temperatura del proceso de gelatinización (ΔT_g) y cambio de entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g).

Retrogradación

Para evaluar el proceso de retrogradación de la amilopectina, las muestras gelatinizadas se almacenaron a 4 °C durante 9 días. Luego, las cápsulas se calentaron nuevamente en el calorímetro de 30 °C a 120 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. De los termogramas obtenidos se calcularon los siguientes parámetros: temperatura de inicio de la retrogradación (T_{or}), temperatura de finalización (T_{endr}), rango de temperatura del proceso de retrogradación (ΔT_r) y cambio de entalpía de retrogradación del almidón (ΔH_r).

6. Análisis de la interacción polímero-agua – Modelo de Flory-Huggins

La teoría de Flory-Huggins es comúnmente empleada para describir las transiciones de fase de cristalino-amorfo de mezclas de polímero-diluyente. Además, también es utilizada para estudiar el efecto del agua y solutos sobre la gelatinización y fusión de los gránulos de almidón. (Baks et al., 2007; Parker y Ring, 2001; Farhat y Blanshard, 1997; Moates et al., 1998; Whittam et al., 1990; Russell, 1987a; Donovan et al., 1983; Donovan y Mapes, 1980; Donovan, 1979; Lelievre, 1976).

El modelo de Flory-Huggins es frecuentemente utilizado para relacionar la temperatura de fusión T_m de un polímero cristalino, en una mezcla de polímero-diluyente, con la fracción de volumen ϕ del diluyente (Flory, 1953).

$$\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_m^0} = \left(\frac{R}{\Delta H_u} * \frac{V_2}{V_1} \right) * (\phi_1 - \chi_{12} * \phi_1^2)$$

donde T_m es la temperatura de fusión del polímero en el diluyente, T_m^0 es la temperatura de fusión del polímero puro, R es la constante de los gases, ΔH_u es el calor de fusión por unidad repetida de glucosa, V_1 y V_2 son los volúmenes molares el diluyente y de la unidad repetida del polímero respectivamente, y χ_{12} es el parámetro de interacción polímero-diluyente de Flory-Huggins. Flory, en 1953, introdujo χ_{12} para caracterizar la interacción termodinámica establecida entre el agua y el polímero. El parámetro de interacción de Flory-Huggins es adimensional y está asociado con la

diferencia de energía que representa una molécula de solvente inmersa en un polímero puro comparada con una molécula solvente rodeada por otras de su tipo.

Para calcular la temperatura de fusión del almidón se utilizó la ecuación de Flory-Huggins. A través de esta ecuación fue posible calcular la temperatura de fusión ideal de las muestras en función de la concentración de almidón. La temperatura de finalización del proceso de gelatinización (T_{end}) obtenida del análisis calorimétrico se utilizó como la temperatura de fusión (T_m). En el caso de la presencia de un segundo pico en los termogramas, la T_{end} del segundo pico fue empleada (Ferrero et al., 1996). El volumen molar parcial utilizado para el agua fue de $18,1 \text{ cm}^3\text{mol}^{-1}$ y para el almidón de trigo de $97,5 \text{ cm}^3\text{mol}^{-1}$, el cociente entre los volúmenes molares parciales se asumió constante e independiente de la temperatura (Lepori y Gianni, 2000; Shahidi et al., 1976). Además, se asumió que la densidad cristalina y amorfa del almidón de trigo fueron iguales. De esta manera, tres parámetros fueron determinados (T_m° , ΔH_u y χ_{12}). Los valores de T_m , derivados del análisis de gelatinización realizado a diferentes fracciones de volumen, fueron ajustados a la ecuación propuesta por Flory-Huggins con el software SIGMAPLOT 10 (Systat Software, Inc., Alemania).

7. Determinación de la cinética de retrogradación – Ecuación de Avrami

La cinética de recristalización de la amilopectina se evaluó mediante la ecuación de Avrami (McIver et al., 1968). El modelo propuesto por Avrami relaciona ΔH_t con el tiempo.

$$\theta_t = \frac{\Delta H_\infty - \Delta H_t}{\Delta H_\infty} = e^{-K \cdot t^n}$$

donde θ es la fracción de almidón que no retrograda a tiempo t , ΔH_{r0} , $\Delta H_{r\infty}$, y ΔH_{rt} son los cambios de entalpía a tiempo cero, infinito y a tiempo t , respectivamente, K es la constante de velocidad (comúnmente utilizada como $1/K = \text{constante de tiempo}$ para comparar la velocidad de endurecimiento del pan) y n el exponente Avrami. La constante K representa el crecimiento cristalino y el exponente n es comúnmente relacionado con la morfología del cristal, describe el orden de crecimiento cristalino (Hiemenz, 1984).

El ensayo calorimétrico se llevó a cabo en un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC823e, con software STARe Default DB V9.00 (Mettler Toledo, Suiza). Para realizar el ensayo se pesaron 20 mg de almidón en cápsulas calorimétricas de aluminio de 100 μl y posteriormente se adicionó agua hasta alcanzar una fracción de volumen de agua (F_v) de 0,56. Las cápsulas se cerraron herméticamente y se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente antes de ser analizadas.

Las muestras de almidón se gelatinizaron calentando las cápsulas de 30 °C a 120 °C a una velocidad de 10 °C/min. Para evaluar el proceso de retrogradación de la amilopectina en el tiempo, las cápsulas con las muestras calentadas se enfriaron y almacenaron a 4 ± 2 °C durante 2, 3, 6, 8, 10 y

15 días. Posteriormente, las cápsulas se calentaron nuevamente en el calorímetro de 30 °C a 120 °C a una velocidad de 10 °C /min. De los termogramas obtenidos se calcularon los cambios de entalpía de retrogradación del almidón (ΔH_r).

Los parámetros del modelo de Avrami se estimaron por ajuste de los valores experimentales de ΔH_r obtenidos en el tiempo mediante el software SIGMAPLOT 10 (Systat Software, Inc., Alemania).

Los parámetros de ajuste K y n se utilizaron para calcular el valor de tiempo medio de cristalización ($t_{1/2}$). El tiempo medio de cristalización es un importante parámetro de la cinética de cristalización, que se define como el tiempo que transcurre desde el inicio de la cristalización hasta completar el 50%. El tiempo medio de cristalización se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \left(\frac{-\ln 0,5}{K} \right)^{1/n}$$

8. Propiedades reológicas de geles de almidón

8.1 Preparación de los geles de almidón

Se prepararon geles de almidón con diferentes concentraciones. Para esto, inicialmente, el almidón se dispersó en agua en frascos de vidrio, y con el propósito de obtener suspensiones homogéneas, las dispersiones se mantuvieron en agitación constante durante 20 min a temperatura ambiente. Para evitar que el desarrollo microbiano deteriore las muestras, se agregó 0,1% p/p de azida sódica.

En ensayos previos se determinó el tiempo necesario para gelatinizar completamente los gránulos de almidón. En función de esto, las dispersiones almidón/agua se gelatinizaron por inmersión de los frascos cerrados herméticamente en baño de agua a 95 °C por 10 min. Las suspensiones se agitaron manualmente cada 1 min para evitar la heterogeneidad en el sistema de gel, durante los primeros 3 min. Finalmente, las suspensiones calientes (90 °C) se transfirieron a los recipientes correspondientes y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

8.2 Evaluación de comportamiento viscoelástico

El comportamiento viscoelástico de los geles de almidón se evaluó mediante un reómetro de esfuerzo controlado (AR 1000-TA Instrument, EUA). Para la evaluación del comportamiento viscoelástico se aplicó un esfuerzo de corte (ζ) sinusoidal, oscilatorio y de amplitud constante, y se midió como respuesta la deformación generada, como deformación de corte (γ).

Los sistemas viscoelásticos presentan simultáneamente características de sólido y características de fluido, por lo tanto fluyen y se deforman al mismo tiempo. Este tipo de sistemas, responden a la deformación aplicada almacenando parte de la energía (componente elástica) y disipando la energía restante en forma de calor (componente viscosa). El comportamiento elástico está representado por la ley de Hooke y el comportamiento viscoso mediante la ley de Newton. Las leyes mencionadas describen dos extremos.

$$\zeta_E = G * \gamma_E$$

$$\zeta_V = \eta * \dot{\gamma}_V$$

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

El esfuerzo de corte (ζ) sinusoidal y oscilatorio aplicado sobre un sistema se transforma en una deformación (γ) que puede describirse como:

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

donde γ_0 es la deformación máxima o amplitud y ω la velocidad angular. En función de esto, la respuesta elástica y viscosa del sistema se describen como:

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

$$\zeta_V = \eta * \omega * \gamma_0 * \text{cos}(\omega t)$$

lo que indica que la deformación generada y el esfuerzo de corte elástico se encuentran en fase, mientras que, el esfuerzo de corte viscoso se encuentra 90° fuera de fase con respecto a la deformación.

La medida de la diferencia de fase entre la deformación generada y el esfuerzo de corte de la respuesta indica la viscoelasticidad del sistema. Si la diferencia de fase es de 0° el material es puramente elástico, y si por el contrario, es de 90° el material es puramente viscoso. Si la diferencia se encuentra entre estos dos valores el sistema es viscoelástico.

La relación entre el esfuerzo de corte y la deformación máxima se denomina módulo complejo, G^* . Este parámetro representa la resistencia total del material la deformación aplicada:

$$G^* = \zeta_0 / \gamma_0$$

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

$$G' = G * \text{cos } \delta$$

$$G'' = G * \text{sen } \delta$$

donde δ es el ángulo de desfase entre el esfuerzo de corte y la deformación. Si el material es puramente elástico, $\delta=0^\circ$, $G^*=G'$ y $G''=0$. Por el contrario, si es puramente viscoso, $\delta=90^\circ$, $G^*=G''$ y $G'=0$.

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

$$\eta^* = G^*/\omega = (\zeta_0/\gamma_0) * \omega$$

Otro parámetro que se utiliza habitualmente para describir el comportamiento viscoelástico de un sistema es la tangente del ángulo de desfase ($\tan\delta$):

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

este parámetro describe el peso que tiene la componente viscosa frente a la componente elástica.

Para los ensayos se utilizó una geometría de plato-plato de acero (40 mm de diámetro) y se trabajó con un *gap* de 1 mm. Para las determinaciones se prepararon geles de almidón (4% p/p) según lo descrito en el inciso 10.1. Una alícuota (2 ml) de las suspensiones gelatinizadas calientes se transfirió cuidadosamente sobre la placa inferior del reómetro para minimizar cualquier alteración de la estructura, se bajó el plato superior hasta dejar una distancia de 1 mm y se dejó enfriar a 25 °C durante 1 h.

Para determinar el rango de viscoelasticidad lineal, se realizaron barridos de esfuerzo de corte (0,05–10 Pa) a 1 Hz a 25 °C. A partir de esto, los barridos de frecuencia se llevaron a cabo a deformaciones de 1% (0,2 Pa) en un rango de frecuencia desde 0,1 hasta 10 Hz a 25 °C. El valor de deformación seleccionado correspondió al rango de comportamiento viscoelástico lineal de las muestras.

En todos los casos para proteger las muestras de la deshidratación se utilizó un dispositivo de protección durante todo el ensayo (*solvent trap*).

A partir de estos ensayos se obtuvieron los valores de módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$), como función de la frecuencia.

8.3 Análisis de textura

El perfil de textura de los geles de almidón se evaluó a través de un análisis de perfil de textura (TPA) mediante un analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado con la celda de compresión de 25 kg y un émbolo de penetración de 25 mm de diámetro. Los geles se sometieron a dos ciclos de compresión - descompresión para obtener la curva de TPA característica a partir de la cual se obtuvieron los siguientes parámetros a través del programa Texture Expert (versión 1,22) (Figura 3.1):

Firmeza: es la fuerza máxima que tiene lugar, en cualquier tiempo, durante el primer ciclo de compresión (Bourne, 1978). Definida también como la fuerza, en g fuerza o newton, necesaria para comprimir el material hasta un 30% del espesor original.

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

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

Para la determinación del perfil de textura se prepararon geles de almidón (8% p/p) según lo descrito en el inciso 9.1. Aproximadamente 40 g de las suspensiones calientes se colocaron en tubos de centrífuga de 50 ml de 30 mm de diámetro, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 4 h y luego se almacenaron a 4 °C durante 24 h, 7 y 14 días. Posteriormente, una vez finalizado el periodo de almacenamiento correspondiente, los geles se atemperaron a temperatura ambiente (1 h) y se cortaron en discos de 1 cm de espesor aproximadamente. Para el ensayo se utilizó una sonda de 50 mm de diámetro y las condiciones de análisis fueron: velocidad de ensayo 0,5 mm/s, deformación 30%; los ciclos de compresión fueron separados por 10 s. Cinco discos por cada gel se analizaron para cada duplicado de muestra.

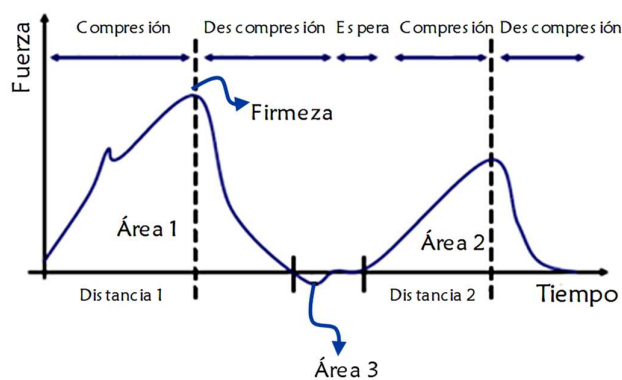


Figura 3.1: Curva característica de Análisis de Perfil de Textura (TPA).

8.4 Sinéresis

La separación del agua de los geles de almidón o de los productos que contienen almidón se denomina sinéresis. Para las determinaciones se prepararon geles de almidón (8% p/p) según lo descrito en el inciso 9.1. Aproximadamente 1,6 g de las suspensiones calientes se transfirieron a tubos

de centrifuga de 1,5 ml. Se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 4 h y luego se almacenó a 4 °C durante 24 h, 7 y 14 días.

El efecto del almacenamiento sobre la sinéresis de los geles se determinó mediante centrifugación. Una vez finalizado el periodo de almacenamiento correspondiente, los geles fueron atemperados a temperatura ambiente (1 h) y centrifugados a 3000 *g* durante 15 min. Luego de la centrifugación, el agua libre de cada gel fue separada. La cantidad de agua separada por centrifugación se expresó como porcentaje del total de agua presente en el gel. Además de esto, se calculó el porcentaje de incremento de sinéresis (IS), determinado como el cambio en los valores de sinéresis (*S*) con el almacenamiento en base a la sinéresis inicial (*S*):

$$IS = \left(\frac{S_{\text{día } x} - S_{\text{día } 1}}{S_{\text{día } 1}} \right) * 100$$

9. Análisis estadístico

En todos los casos las determinaciones experimentales se realizaron al menos por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina) (Di Rienzo et al., 2011). Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA).

Los resultados fueron comparados por el método de la mínima diferencia significativa test de Fisher's (LSD), con un nivel de significancia de 0,05 (Di Rienzo et al., 2002).

Resultados y Discusión

La integridad granular del almidón puede ser afectada por acción mecánica durante la molienda de los granos de trigo en la obtención de harinas, produciendo lo que se denomina almidón dañado (Hoseney, 1994d). El almidón dañado cambia su estructura granular y polimérica, lo que afecta directamente sus propiedades funcionales y reológicas (Faridi, 1990).

El almidón dañado de trigo ha sido foco de estudio principalmente debido a su importancia en harinas y procesos de panificación. En líneas generales, en los dos capítulos anteriores, diferentes aspectos del almidón dañado se evaluaron con el propósito de establecer una relación entre este parámetro y la calidad de los productos panificados, como así también, de encontrar un medio posible para contrarrestar sus efectos negativos sobre este tipo de productos.

A lo largo de este capítulo se describirán los efectos del daño mecánico sobre la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los gránulos de almidón, como así también, la influencia del contenido de almidón dañado sobre las propiedades del almidón. Estos aspectos se evaluaron sobre un sistema modelo, con la intención de identificar efectos del contenido de almidón dañado sobre las propiedades del almidón, independientemente de las condiciones de molienda, y controlar perfectamente las proporciones de almidón dañado.

Se prepararon cuatro muestras de almidón de trigo con diferente contenido de almidón dañado como sistema modelo, la muestra AD1 con 3,7%, AD2 con 8,1%, AD3 con 12,4% y AD4 con 22,8% de almidón dañado; según se describió en materiales y métodos.

1. Distribución de tamaño de partícula

Los gránulos de almidón en el trigo presentan una distribución de tamaño bimodal, en la que se pueden encontrar gránulos grandes y lenticulares y pequeños y esféricos (Baum y Bailey, 1987). La distribución de tamaño de partícula de las muestras de almidón inmediatamente después de entrar en contacto con el agua (tiempo inicial de hidratación) y luego de 3 h de hidratación se muestra en la Figura (3.2). En ambas condiciones, todas las muestras mostraron una distribución bimodal característica de los gránulos de almidón de trigo (Jay-Lin, 2009).

En la muestra AD1, se observaron las dos fracciones principales de gránulos de almidón, gránulos tipo B (1,3-4,4 μm) y gránulos tipo A (5,01-60,3 μm). El gradual incremento del contenido de almidón dañado causó un desplazamiento de las curvas hacia mayores diámetros de partículas, un solapamiento de ambas poblaciones de partículas y una disminución de la altura de ambos picos (Figura 3.2 A). Los parámetros de distribución de tamaño tales como la distribución de volumen $d50$ y $d90$, y el diámetro medio *De Brouckere* ($D4,3$) incrementaron ($p \leq 0,05$) por efecto del nivel de almidón dañado en el sistema.

El parámetro $d50$ incrementó de $20,2 \pm 0,5$ a $23,6 \pm 0,9$; $d90$ de $33,9 \pm 0,8$ a $46,0 \pm 1,2$ y el $D4,3$ de $21,4 \pm 0,6$ a $26,2 \pm 1,0$. Los resultados obtenidos indicaron que el 90% de los gránulos en la muestra AD1 presentaron un tamaño menor a 33,9, mientras que, el 90% de los gránulos de la

muestra AD4 presentaron un valor menor a 46,0. El diámetro medio *De Brouckere* ($D4,3$) es el diámetro de volumen medio de las partículas, por lo tanto, los incrementos observados en este parámetro reflejaron el aumento de tamaño de los gránulos de almidón en la población de la muestra AD4 respecto a AD1.

No se registraron alteraciones ($p \leq 0,05$) sobre el diámetro medio *Sauter* ($D3,2$), relacionado con el diámetro del área superficial media de las partículas, ni sobre la distribución de volumen $d10$.

En la población de gránulos tipo B, el volumen relativo de las partículas con menor diámetro disminuyó como consecuencia del desplazamiento de los picos generado por la presencia del almidón dañado. Por otro lado, el diámetro de la población de las partículas que representan el pico máximo incrementó por efecto del almidón dañado. El pico máximo de la muestra AD1, AD2 y AD3 se registró entre 2,5-2,9 μm , mientras que, para la muestra AD4 fue entre 2,9-3,3 μm . Además, se observó una disminución en el porcentaje de volumen de las partículas que representan el pico máximo en esta población de gránulos como consecuencia del incremento en el almidón dañado.

En la población de gránulos tipo A, se observó un aumento en el tamaño de las partículas, debido al desplazamiento de las curvas, y una reducción en el porcentaje de volumen de las partículas asociadas con el pico máximo. El pico máximo de la muestra AD1 se registró entre 19,9-22,9 μm , mientras que, el pico de las muestras AD2, AD3 y AD4 se registró entre 22,9-26,3 μm . Es importante destacar que, el porcentaje de volumen de las partículas con mayor diámetro (40 a 90 μm) incrementó gradualmente con el incremento del contenido de almidón dañado en el sistema.

El patrón de comportamiento de los gránulos de almidón en las cuatro muestras evaluado luego de 3 h de hidratación (Figura 3.2 B) presentó similares características al descrito previamente. El hinchamiento de los gránulos de almidón causado por la absorción de agua causó una disminución del pico máximo de ambas poblaciones de gránulos, y un desplazamiento de las curvas hacia diámetros mayores, comparado con lo observado a tiempo inicial de hidratación. Estos efectos fueron más pronunciados en las muestras con menor contenido de almidón dañado. En todos los casos se registró un mayor solapamiento entre las dos poblaciones de gránulos, comparado con lo registrado a un menor tiempo de hidratación. Las muestras ricas en almidón dañado presentaron un mayor grado de solapamiento entre las poblaciones de partículas. Asimismo, no se observaron modificaciones sobre los parámetros de distribución de tamaño tales como la distribución de volumen $d50$ y $d10$, el diámetro medio *De Brouckere* ($D4,3$) y el diámetro medio *Sauter* ($D3,2$). Sin embargo, el parámetro $d90$ incrementó ($p \leq 0,05$) de $46,6 \pm 0,8$ a $52,5 \pm 1,2$ con el contenido de almidón dañado en el sistema.

A partir de la distribución de tamaño de los gránulos, es posible afirmar que los incrementos en el contenido de almidón dañado en el sistema causan una mayor heterogeneidad granular, disminuciones graduales sobre el volumen relativo de las partículas de menor tamaño e incrementos sobre el diámetro y volumen relativo de las partículas más grandes. Los cambios en la distribución de

tamaño registrados en el instante que los gránulos de almidón entraron en contacto con el agua, pueden ser atribuidos a la gran capacidad de absorción de agua que tienen los gránulos de almidón dañados (Bushuk, 1998). Este comportamiento característico y propio que presentan los gránulos dañados de almidón está relacionado con el daño físico que causa la molienda sobre su estructura, lo cual facilita su hidratación e hinchamiento instantáneo. En este sentido, Tester (1997) sugirió que el daño físico sobre los gránulos de almidón facilita su hinchamiento en presencia de agua debido a que las fuerzas que previenen la absorción de agua de los gránulos son destruidas como consecuencia del daño mecánico. Por lo tanto, es posible que las modificaciones sobre la superficie granular causadas por efecto de la molienda puedan ser las responsables de la rápida hidratación e hinchamiento que presentan estas partículas. Teniendo en cuenta que durante la molienda se aplican principalmente fuerzas de cizalla, es posible que el daño mecánico producido por esta operación produzca una descamación sobre la superficie granular, lo que genera un incremento en la capacidad de hidratación e hinchamiento de los gránulos.

Las tendencias observadas en los perfiles de tamaño granular como consecuencia de un mayor tiempo de contacto de las muestras en agua fueron similares a las descritas a tiempo inicial. El diámetro de las partículas continuó incrementando, como así también, la heterogeneidad granular, lo que indica que los gránulos en el sistema continuaron absorbiendo agua e hinchándose durante las 3 h de hidratación. Esto sugiere que los gránulos con sus superficies intactas o menos alteradas fueron los responsables del cambio de tamaño registrado por la absorción de agua durante este periodo de tiempo. En relación a esto, numerosos autores han demostrado que el daño inducido sobre los gránulos durante la molienda genera un rango de fracciones almidonosas de diferentes características, las cuales incluyen gránulos nativos, gránulos nativos con algo de su estructura cristalina alterada, gránulos dañados con mayor capacidad absorber agua e hincharse en ausencia de calor y material soluble de bajo peso molecular (Morrison et al., 1994; Tester et al., 1994; Morrison y Tester, 1994; Tester y Morrison, 1994; Karkalas et al., 1992).

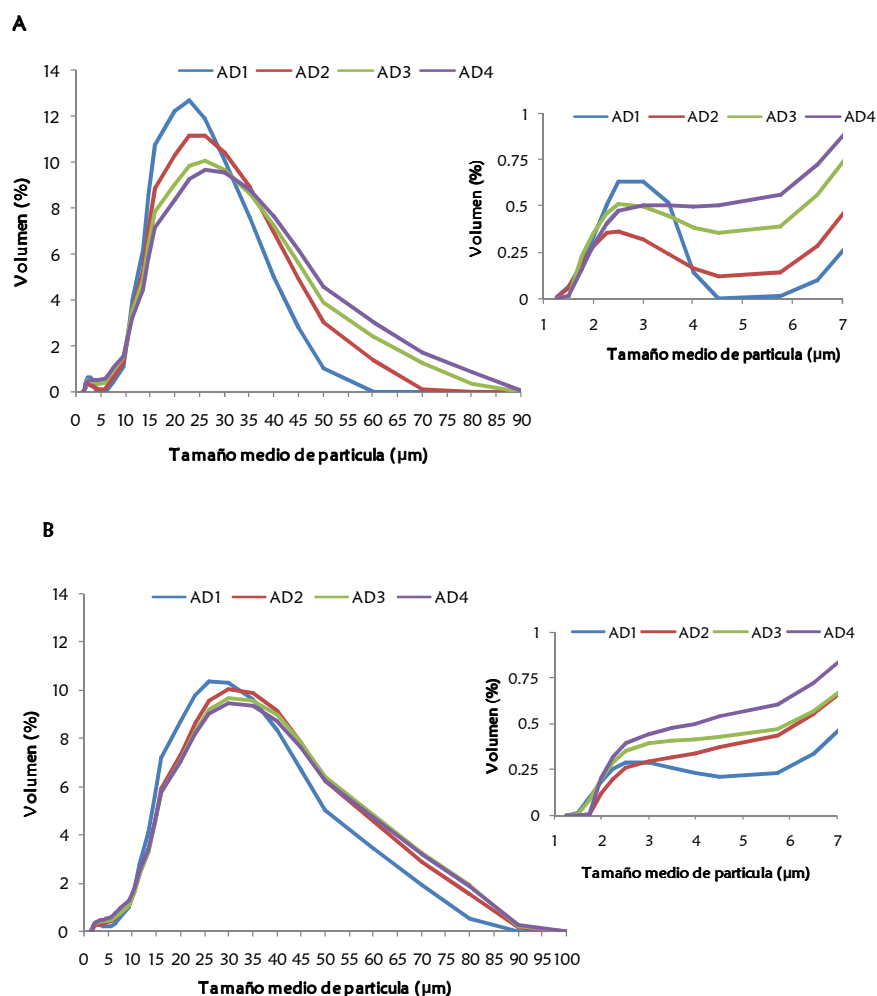


Figura 3.2: Efecto del contenido de almidón dañado sobre la distribución de tamaño de partícula. A: Tiempo inicial, B: 3 h de hidratación.

2. Gelatinización espontánea del almidón dañado

Cuando los gránulos de almidón son calentados a una determinada temperatura en presencia de agua, la estructura nativa de los gránulos es distorsionada, produciéndose una transición irreversible desde una estructura ordenada a una desordenada y la liberación de amilosa al medio. Este proceso fisicoquímico que sufren los gránulos de almidón se denomina gelatinización (Parker y Ring, 2001; Jenkins y Donald, 1998; Liu y Lelievre, 1993; Cooke y Gidley, 1992).

Los gránulos de almidón dañado, a diferencia de los gránulos nativos, tienen la capacidad de absorber agua y de gelatinizar espontáneamente sin absorción de calor. En relación a esto, se ha demostrado que este tipo de gelatinización presenta las mismas características que la gelatinización causada por calor (Tester, 1997; Morrison et al., 1994). El material lixiviado durante la gelatinización del almidón depende de la composición granular, la arquitectura, las dimensiones de los gránulos, la extensión del daño y la temperatura a la cual se calienta el sistema en exceso de agua (Tester, 1997). En este sentido, resulta muy dificultoso separar la incumbencia de cada uno de estos parámetros en el

proceso de lixiviación. El material que difunde fuera de los gránulos dañados durante la gelatinización espontánea se superpone con el material lixiviado por parte de los gránulos nativos que gelatinizan cuando se los calientan, lo que impide diferenciar la contribución que tienen en el sistema la naturaleza y cantidades del material lixiviado durante el proceso de gelatinización espontánea.

La presencia de almidón dañado modificó las proporciones de material lixiviado y la relación amilosa/amilopectina durante la gelatinización fría de los gránulos dañados. La cantidad de material que difundió fuera de los gránulos dañados durante la gelatinización espontánea aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) con el incremento en el contenido de almidón dañado de las muestras (~7 veces entre AD1 y AD4) (Tabla 3.3).

La proporción de amilosa en el material lixiviado durante la gelatinización espontánea, disminuyó significativamente con el aumento en el porcentaje de almidón dañado en el sistema (Tabla 3.3). Estos resultados demuestran que el material lixiviado durante la gelatinización fría de los gránulos de almidón se torna proporcionalmente más rico en amilopectina cuando incrementa el almidón dañado en el sistema. Estos resultados están de acuerdo con lo publicado por Tester (1997), quien concluye que los gránulos de almidón físicamente dañados facilitan la lixiviación de la amilopectina al medio. En este estudio, el autor demostró que a partir del daño mecánico de los gránulos de almidón se producen fracciones insolubles tales como, gránulos nativos, fragmentos de gránulos nativos con estructura ordenada los cuales no se hidratan durante la gelatinización espontánea, fragmentos de gránulos con pérdida del orden estructural los cuales pueden hidratarse en agua fría, y material soluble (fragmentos solubles de amilopectina). En relación a esto, Leman et al. (2006), Morrison y Tester (1994) y Morrison et al. (1994) han demostrado que el daño mecánico sobre los gránulos de almidón causa principalmente una reducción de tamaño de los polímeros de amilopectina. Asimismo, estos autores han sugerido que el daño mecánico promueve la ruptura de los enlaces α -1,4 glicosídicos de los polímeros de almidón, lo que genera la obtención de dextrinas GP 50-80 y GP 20-30 derivadas de la amilopectina. Por lo tanto, es posible que la fracción de amilopectina en el material lixiviado se vea incrementa debido a un aumento en la proporción de fracciones de amilopectina de menor tamaño molecular derivadas de una mayor proporción de gránulos dañados.

Tabla 3.3. Amilosa lixiviada y material lixiviado durante la gelatinización espontánea de los gránulos de almidón.

Muestras	Amilosa (%)	α -glucanos totales lixiviados (%)
AD1	83,9 c	0,14 a
AD2	26,0 b	0,31 b
AD3	20,5 ab	0,54 c
AD4	17,9 a	1,18 d

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

3. Propiedades de flujo de las suspensiones de almidón

Una dispersión de almidón gelatinizado puede ser considerada como un material formado por gránulos hinchados y fragmentos granulares dispersos en una matriz continua de amilosa (Noel et al., 1993; Morris, 1990; Eliasson, 1986; Evans y Haisman, 1979). Las propiedades de la fase dispersa (gránulos hinchados), la fase continua (amilosa), y las interacciones establecidas entre ambas fases son aspectos importantes a considerar ya que determinan las características reológicas de este tipo de sistema.

Las suspensiones de almidón sin calentar presentan características totalmente diferentes a las dispersiones de almidón gelatinizado, ya que los gránulos se encuentran simplemente dispersos en el seno del fluido, comportándose como esferas rígidas. Por lo tanto, las propiedades reológicas características de las pastas de almidón son muy diferentes a las que presenta una suspensión de almidón sin gelatinizar (Rao, 1999a).

En la industria de los alimentos el almidón es muy utilizado como un agente espesante y gelificante. Por lo que, durante el procesamiento las dispersiones de almidón son sometidas a etapas combinadas de calentamiento y deformaciones de cizalla, lo que afecta su comportamiento reológico y las características del producto final. Es por esto que los cambios en la viscosidad de las materias primas en un proceso deben ser cuidadosamente considerados, ya que las modificaciones en la capacidad de fluir de los sistemas pueden alterar los regímenes de flujo, las variables de proceso y por consiguiente, la calidad de los productos finales. En este sentido, la composición de la materia prima también puede causar variaciones en el perfil reológico de las dispersiones de almidón.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se caracterizó el efecto del almidón dañado en el comportamiento de flujo de las suspensiones de almidón en agua sin gelatinizar, y de esta manera se evaluaron las características estructurales del sistema.

Las suspensiones de almidón en agua no calentadas mostraron una relación no lineal entre el esfuerzo de cizalla vs velocidad de cizalla, lo que indica que estos sistemas se comportan como un fluido no-newtoniano (Figura 3.3). Los fluidos newtonianos por definición presentan una relación

lineal entre el esfuerzo de cizalla y la velocidad de cizalla, y además interceptan la curva en el cero. Por lo tanto, todos los fluidos que no presentan este comportamiento son denominados no-newtonianos (Steffe, 1996a).

Los sistemas fluidos sometidos a incrementos y seguidamente a disminuciones en la velocidad de cizalla pueden generar un área de histéresis. El área de histéresis de un material está asociada con la dependencia del tiempo que presente la estructura del fluido frente al efecto de cizalla. Los materiales que no presentan histéresis bajo estos efectos, se los clasifica como no dependientes del tiempo, lo que significa que su estructura no es alterada bajo estas condiciones (Steffe, 1996a). En todas las muestras se observó un área de histéresis (comprendida entre la rampa 1 y rampa 2), lo que sugirió que las suspensiones de almidón no gelatinizadas se comportan como fluidos dependientes del tiempo. Además, en todos los casos, estas suspensiones presentaron un comportamiento del tipo tixotrópico, debido a que estos sistemas fluidos perdieron parte de estructura original luego de la desestructuración causada por efecto del cizallamiento. Como consecuencia de este comportamiento, el área registrada se produjo en sentido horario (Figura 3.3).

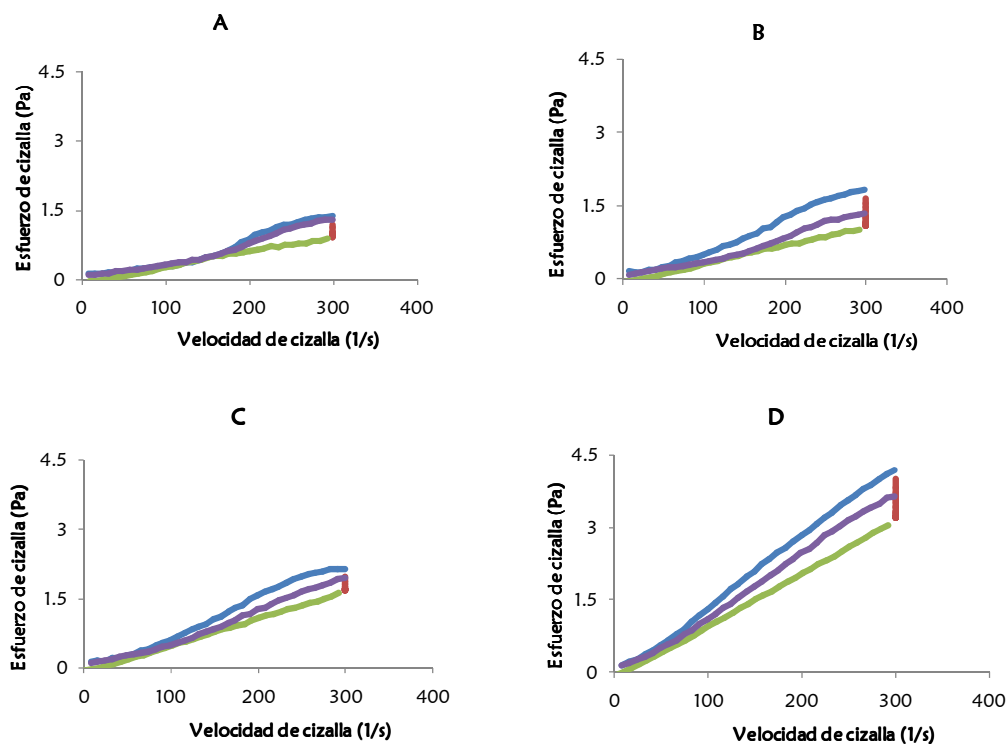


Figura 3.3: Comportamiento de flujo de las suspensiones de almidón sin gelatinizar. **A:** AD1, **B:** AD2, **C:** AD3 y **D:** AD4. (---) rampa 1, (---) rampa de mantenimiento, (---) rampa 2 y (---) rampa 3.

Numerosos autores (Giboreau et al., 1994; Christianson y Bagley, 1984; Evans y Haisman, 1979) han informado que las dispersiones de almidón gelatinizadas, obtenidas bajo diferentes

condiciones de temperatura y tiempo, presentan un comportamiento del tipo no-newtoniano que puede exhibir umbral de fluencia. Además de esto, Harrod (1989), Bagley y Christianson (1982) y Doublier (1981) han observado un leve comportamiento tixotrópico en las dispersiones de almidón de trigo gelatinizadas caracterizadas a 25 °C. En relación a estos aspectos, Ellis et al. (1989) concluyeron que el comportamiento reológico dependiente del tiempo de las dispersiones de almidón gelatinizado podría ser atribuido a la estructura continua formada por los α -glucanos lixiviados consolidada durante el enfriamiento del sistema.

El comportamiento de flujo de las cuatro suspensiones de almidón se describió mediante el modelo de la ley de la potencia. En todos los casos, los valores de índice de comportamiento de flujo (n) fueron mayores a la unidad, lo que indica que este tipo de sistema se comporta como un fluido dilatante no-newtoniano bajo las condiciones de estudio (Tabla 3.4). Este mismo comportamiento ha sido observado en varios estudios realizados sobre almidón de trigo durante los primeros estadios del proceso de gelatinización (Okechukwu y Rao, 1995; Dail y Steffe, 1990a,b; Bagley y Christianson, 1982). En general, el comportamiento de flujo dilatante puede explicarse debido a un incremento en el tamaño de la unidad estructural como resultado del cizallamiento. En los sistemas de almidón en agua, el comportamiento dilatante ha sido atribuido a la rigidez de los gránulos, que es suficiente como para resistir el efecto del cizallamiento, y también a las altas concentraciones, suficientes como para causar la aglomeración de partículas (Christianson y Bagley, 1984). El flujo de suspensiones de partículas rígidas a altas concentraciones sería imposible sin una expansión del volumen que provea espacio suficiente como para permitir que continúe el movimiento de las partículas, por lo que es posible que el arreglo estructural de las partículas del sistema pueda ser interrumpido o sufrir re-arreglos que generen un incremento en el volumen, lo que se registra como un comportamiento dilatante (Hoffman, 1982).

Las suspensiones de almidón gelatinizadas han sido bien descritas por Rao (1999). La transición de un comportamiento de flujo dilatante a pseudoplástico tixotrópico de los sistemas de almidón ocurre progresivamente con el incremento del tiempo y la temperatura durante el proceso de gelatinización. En este sentido, la gelatinización del almidón puede ser definida como un proceso de transición entre estos comportamientos reológicos dependientes del tiempo.

El coeficiente de consistencia (K) incrementó ($p \leq 0,05$) como consecuencia de la presencia del almidón dañado, mientras que no se registraron cambios significativos sobre el índice de flujo (n) (Tabla 3.4). Las curvas obtenidas al graficar la viscosidad vs velocidad de cizalla (Figura 3.4) mostraron un aumento en la viscosidad de las suspensiones debido al incremento del almidón dañado. Los cambios registrados sobre el coeficiente de consistencia (K) y la viscosidad pueden ser explicados en términos de la gelatinización espontánea que sufren los gránulos dañados. Con estos resultados queda demostrado que los gránulos dañados de almidón pueden absorber agua, hincharse y por

consiguiente, lixiviar amilosa y amilopectina al medio, lo que deriva en el incremento de la viscosidad del sistema.

Tabla 3.4. Efecto del contenido de almidón dañado sobre el comportamiento de flujo de las suspensiones.

Parámetros de ajuste	Modelo de la Ley de la Potencia			
	AD1	AD2	AD3	AD4
K (Pa)	0,0013 a	0,0014 a	0,0022 b	0,0058 c
n	1,16 ab	1,18 b	1,17 ab	1,11 a
r ²	0,98	0,99	1,00	1,00

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

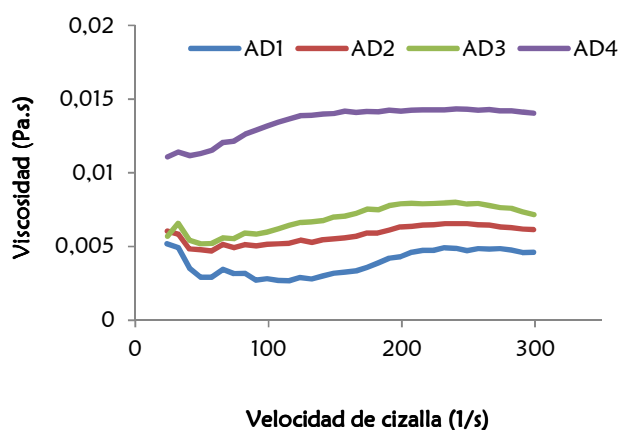


Figura 3.4: Efecto del contenido de almidón dañado sobre la viscosidad de las suspensiones de almidón no gelatinizadas.

El contenido de almidón dañado en las muestras causó modificaciones ($p \leq 0,05$) sobre el área de histéresis. Las suspensiones con mayor contenido de almidón dañado presentaron una mayor área de histéresis que las suspensiones preparadas con la muestra AD1 y AD2 (Tabla 3.5). El área de histéresis es una medida de la extensión de la tixotropía del sistema (Steffe, 1996a), por lo tanto, estos resultados sugieren que la estructura de estas suspensiones se vuelven más dependientes del tiempo a causa del incremento del contenido de almidón dañado.

Tabla 3.5. Efecto del nivel de almidón dañado sobre el área de histéresis de las suspensiones no calentadas de almidón.

Muestra	Área de Histéresis (Pa.s ⁻¹)
AD1	59,2 a
AD2	131,4 ab
AD3	184,5 b
AD4	178,4 b

Letras diferentes indican diferencias significativas
($p \leq 0,05$) (ANOVA)

Teniendo en cuenta los efectos observados sobre el perfil de la distribución de tamaño de partícula, el material lixiviado durante la gelatinización espontánea y el comportamiento de flujo de las muestras analizadas, es posible asumir que los cambios del comportamiento reológico de las suspensiones no calentadas de almidón causados por los gránulos dañados están relacionados con la extensión del hinchamiento de los gránulos de almidón y con la cantidad y proporción de amilosa y amilopectina lixiviadas durante el proceso. La gelatinización espontánea que experimentan los gránulos dañados resulta en suspensiones conteniendo gránulos hinchados inmersos en una solución macromolecular. El número de gránulos hinchados es mayor a mayores proporciones de almidón dañado, y de esta manera las suspensiones se vuelven más ricas en material lixiviado, especialmente en la fracción de amilopectina. En este sentido, el incremento en el contenido de almidón dañado resulta en una mayor fracción de volumen ocupada por los gránulos hinchados que contribuyen a la viscosidad. El incremento en la proporción de amilopectina está especialmente relacionado con el incremento de la viscosidad debido a su tamaño y diferencias estructurales, en relación al polímero de amilosa.

Los resultados sugieren que el material lixiviado en el sistema tiene la capacidad de formar una estructura de matriz suspendida, y que, por lo tanto, estas suspensiones poseen una matriz más estructurada. Consecuentemente, los cambios en la estructura del sistema y los incrementos en la extensión de la tixotropía pueden estar asociados a las diferencias en la estructura que causan los gránulos hinchados y la matriz suspendida en la que se encuentran inmersos.

Las suspensiones de almidón no gelatinizadas evaluadas mostraron un comportamiento de flujo tixotrópico dilatante, y en función de las observaciones realizadas, es posible concluir que la presencia de almidón dañado en estos sistemas resulta en un comportamiento de flujo intermedio entre el comportamiento de flujo de suspensiones de almidón en los primeros estadios de la gelatinización y las pastas de almidón gelatinizadas (dilatante a pseudoplástico tixotrópico).

4. Evaluación de la dependencia en el tiempo

Cuando un fluido tixotrópico es cizallado a una velocidad constante, se genera un progresivo deterioro de su estructura interna (Abu-Jdayil y Mohameed, 2004). El comportamiento tixotrópico dependiente del tiempo de las suspensiones de almidón no gelatinizadas expuestas a una velocidad de cizalla constante se describió mediante el modelo de Weltman (Weltman, 1943) (Figura 3.5). En el modelo de Weltman el parámetro de ajuste A es comúnmente asociado con el umbral de fluencia del sistema, mientras que, el parámetro de ajuste B está relacionado con la extensión de la tixotropía del sistema. En todos los casos, se registraron valores negativos para la constante B, lo que se relaciona con fluidos tixotrópicos (Rao, 1999a), y en acuerdo con los datos registrados anteriormente. El incremento en el contenido de almidón dañado afectó las propiedades de flujo dependientes del tiempo de las suspensiones de almidón no calentadas. Las constantes A y B asociadas a la suspensión preparada con AD1 fueron de 1,21 Pa y -0,004 Pa, respectivamente. El incremento en el contenido de almidón dañado en el sistema causó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) sobre ambos parámetros de ajuste (Tabla 3.6).

El efecto registrado sobre la constante A se interpretó como un incremento en el umbral de fluencia del fluido, por lo tanto, el almidón dañado causó un incremento sobre el mínimo esfuerzo necesario para poner en movimiento a las suspensiones de almidón. El umbral de fluencia de las suspensiones de almidón incrementó debido al aumento de volumen de los gránulos de almidón y del material lixiviado al medio a causa de la gelatinización espontánea. Dado que, el umbral de fluencia es una medida de la fuerza con la que las partículas interaccionan en una red, un incremento en este parámetro se asocia a un sistema más estructurado.

El impacto del almidón dañado sobre el parámetro de ajuste B se relacionó con un cambio en la velocidad de desestructuración del sistema, lo que sugiere que las suspensiones con mayor almidón dañado se desestructuran más rápidamente frente al efecto de la cizalla constante.

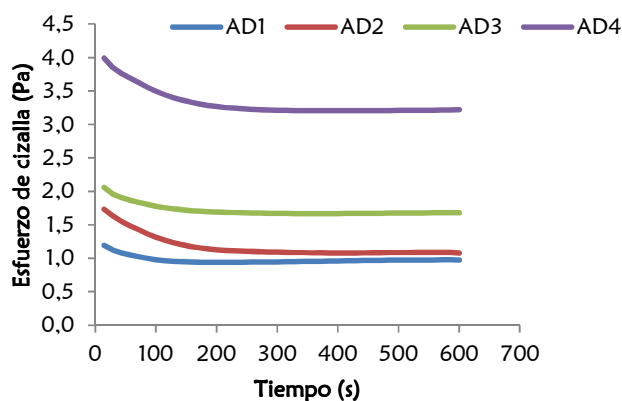


Figura 3.5: Efecto del contenido de almidón dañado sobre el comportamiento tixotrópico de las suspensiones de almidón no gelatinizadas

Tabla 3.6. Efecto del contenido de almidón dañado sobre el comportamiento tixotrópico de las suspensiones no gelatinizadas de almidón.

Parámetros de ajuste	Modelo de Weltman			
	AD1	AD2	AD3	AD4
A (Pa.s)	1,21 a	1,92 ab	2,61 b	4,49 c
B (Pa)	-0,042 a	-0,14 b	-0,16 b	-0,19 b
r²	0,53	0,90	0,94	0,90

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

5. Perfil de viscosidad

Cuando las suspensiones de almidón en agua son calentadas por encima de la temperatura de gelatinización, se registra un incremento de la viscosidad del sistema. Las pastas de almidón, consideradas como materiales compuestos de una fase continua (amilosa) interceptada con gránulos, poseen propiedades que dependen de numerosos factores, como las propiedades de la fase continua, la fracción de volumen, la deformabilidad de las partículas y las interacciones entre la fase dispersa y la continua (Biliaderis, 2009).

El contenido de almidón dañado afectó el perfil de viscosidad de las muestras de almidón gelatinizadas (Figura 3.6), al igual que lo observado en los dos primeros capítulos. Los perfiles de viscosidad revelaron que los incrementos en el contenido de almidón dañado produjeron una disminución gradual y significativa ($p \leq 0,05$) del pico de viscosidad (PV), viscosidad media (VM), viscosidad final de la pasta (VF), *breakdown* y *setback* (Tabla 3.7). El aumento en el nivel de almidón dañado de 3,7% (AD1) a 22,8% (AD4) causó una reducción del 32,1%; 30,4% y 33,1% sobre PV, *breakdown* y *setback*, respectivamente. Estos resultados sugieren que los gránulos de almidón dañado hinchados e hidratados durante la gelatinización en agua fría, fueron menos resistentes durante la cocción y más deformables frente al efecto de cizalla. Consecuentemente, los gránulos dañados gelatinizados se desintegraron más fácilmente que los gránulos nativos y debido a esto sólo contribuyeron parcialmente al incremento de la viscosidad durante el calentamiento. El efecto de almidón dañado en el perfil de viscosidad es comparable al efecto de la disminución de la concentración de almidón, ya que bajo estas condiciones hay un mayor nivel de agua libre y una menor proporción de gránulos hinchados ocupando espacio y contribuyendo así a la viscosidad. Es decir, que los incrementos en el contenido de almidón dañado resultan en una menor fracción de volumen ocupada por gránulos nativos hinchados responsables del aumento de la viscosidad del sistema.

Los cambios registrados en el *breakdown* y *setback* se relacionaron con la viscosidad máxima alcanzada. Las reducciones en ambos parámetros causadas por el incremento en el contenido de almidón dañado se asociaron a los cambios en las características de las pastas formadas. En el punto

de máxima viscosidad, la estructura del sistema está representada por gránulos hinchados, fragmentos de gránulos y material soluble de diferente peso molecular, inmersos en una red tridimensional formada principalmente por amilosa.

La viscosidad de la pasta al final de la determinación depende de concentración de amilosa lixiviada, del volumen que ocupan los gránulos de almidón hinchados, de la rigidez de los gránulos dispersos y de las interacciones establecidas entre los gránulos y la fase continua, y del grado de reasociación de las moléculas de amilosa. Por lo tanto, las reducciones en los valores de viscosidad final sugieren un mayor grado de desintegración granular y por consiguiente, una menor fracción de volumen ocupada por la fase dispersa y una fase continua enriquecida en fracciones de amilopectina.

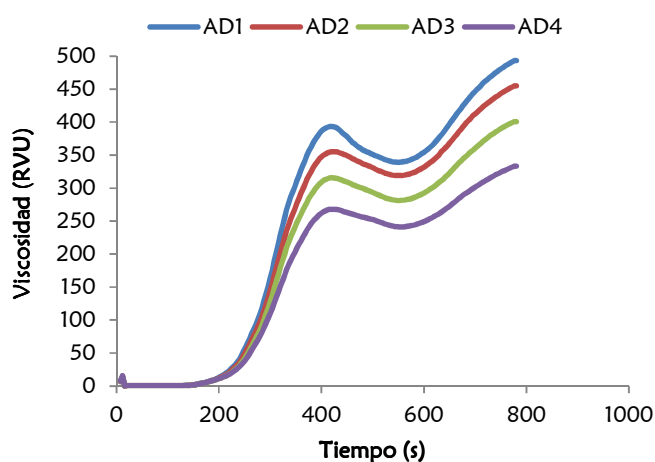


Figura 3.6: Efecto del contenido de almidón dañado sobre el perfil de viscosidad

Tabla 3.7. Efecto del contenido de almidón dañado sobre el perfil de viscosidad

Muestra	PV (RVU)	VM (RVU)	VF (RVU)	Breakdown (RVU)	Setback (RVU)
AD1	380,3 d	321,6 d	476,5 d	58,7 c	154,9 c
AD2	343,3 c	289,4 c	439,5 c	53,9bc	150,1 c
AD3	305,1 b	258,2 b	387,3 b	46,9 ab	129,2 b
AD4	259,2 a	218,3 a	321,9 a	40,8 a	103,6 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

PV: pico de viscosidad, VM: viscosidad media, VF: viscosidad final

6. Caracterización térmica

Las temperaturas y la entalpía de los procesos de gelatinización y retrogradación están relacionadas con las características estructurales del gránulo de almidón, y particularmente con el orden cristalino en los gránulos. Por lo tanto, las propiedades de gelatinización y retrogradación del almidón son

afectadas por las modificaciones que pudieran producirse sobre la estructura de los gránulos (Singh et al., 2003).

6.1 Efecto del agua sobre el proceso de gelatinización de muestras con diferente contenido de almidón dañado

En términos generales, los perfiles de calorimetría diferencial de barrido de todas las muestras mostraron un pico endotérmico entre los 60 y 70 °C característico de la gelatinización del almidón (endoterma-G), y con las sucesivas reducciones en la cantidad de agua en el sistema se observó una segunda endoterma acoplada a la primera, la endoterma de fusión (endoterma-M) (Figura 3.7), comportamiento que se describió en el capítulo anterior. El efecto de la reducción del agua sobre las transiciones que sufre el almidón durante el calentamiento en agua ha sido analizado por numerosos autores (Banks et al., 2007; Vermeylen et al., 2005; Ferrero et al., 1996 y Biliaderis et al., 1986). En todos los casos, el área de la endoterma de gelatinización del almidón disminuyó como consecuencia de las limitaciones de agua en el medio, mientras que simultáneamente, se registraron incrementos del área de la endoterma de fusión.

En los perfiles térmicos de todas las muestras se observó una endoterma adicional a mayores temperaturas (100-110 °C), la cual fue atribuida a la fusión del complejo amilosa-lípido. En la mayoría de los almidones de cereales este complejo muestra una temperatura de fusión entre 100-130 °C (Biliaderis, 2009; Jay-Lin, 2009). Los lípidos en los gránulos de almidón se encuentran sobre la superficie granular y dentro del gránulo de almidón. Los lípidos superficiales son fácilmente extraíbles, sin embargo, la extracción de los lípidos internos es mucho más compleja. Por lo que, aunque el contenido de lípidos en las muestras de almidón analizadas no fue detectable, la endoterma registrada a altas temperaturas en los perfiles térmicos se asoció a la disociación del complejo amilosa-lípido. Con la reducción gradual del contenido de agua en el sistema, el área de esta endoterma fue desapareciendo hasta prácticamente no ser detectada. Se ha reportado que la desorganización del complejo amilosa-lípido es influenciada por el contenido de agua. A elevados porcentajes de agua, una transición simple y cooperativa es observada, sin embargo, a medida que el contenido de agua disminuye la temperatura del pico aumenta y una segunda endoterma a mayores temperaturas se desarrolla progresivamente (Biliaderis, 2009).

La cantidad de agua presente en el sistema afectó la entalpía de gelatinización (ΔH_g) de las cuatro muestras de almidón (Tabla 3.8). En todos los casos, se registraron incrementos ($p \leq 0,05$) en los valores de entalpía de gelatinización hasta que la cantidad de agua alcanzó una fracción de volumen de 0,51. Sin embargo, la disminución gradual de agua a partir de este valor causó una reducción ($p \leq 0,05$) progresiva de este parámetro. Las fracciones de volumen mayores a 0,7 produjeron un pico de gelatinización simétrico, al igual que lo observado por Banks et al. (2007), Vermeylen et al. (2005), Ferrero et al. (1996), Biliaderis et al. (1986). No obstante, la progresiva reducción de agua, hasta una fracción de volumen de 0,51, promovió el desarrollo de la endoterma

de fusión, lo que afectó la forma del pico de gelatinización. Por lo tanto, los incrementos en la entalpía de gelatinización detectados se relacionaron con la aparición de la endoterma-M. Las posteriores reducciones de agua en el sistema causaron una disminución sobre la entalpía de gelatinización de las muestras, debido a la paulatina disminución de la endoterma de gelatinización y simultáneo incremento de la endoterma de fusión.

La temperatura de inicio de la gelatinización (T_0) no se modificó ($p \leq 0,05$) por la reducción de agua en las muestras AD1, AD2 y AD3, al igual que lo descrito en el capítulo 2. La muestra AD4 registró un significativo ($p \leq 0,05$) incremento de T_0 cuando se alcanzó una fracción de volumen de 0,37 y 0,35 (Tabla 3.8) lo que se asoció con la desaparición de la endoterma de gelatinización. Bajo estas proporciones de agua, las regiones cristalinas sin la adecuada humedad funden, y como consecuencia, sólo se registra la endoterma de fusión.

La temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}) y el rango de temperatura de este proceso (ΔT_g) incrementaron ($p \leq 0,05$) como resultado de las reducciones de agua en el sistema (Tabla 3.8). Únicamente se registró una disminución ($p \leq 0,05$) sobre estos parámetros en la muestra AD4 en las fracciones de volumen de 0,37 y 0,35. El incremento de T_{end} ha sido explicado en términos de la disociación retardada de las regiones cristalinas del almidón (Ferrero et al., 1996; Donovan y Mape 1980), es decir, se atribuyeron a la aparición de la endoterma-M.

Estos resultados indican que la disminución en las proporciones de agua afecta en forma similar el proceso de gelatinización en muestras con diferente nivel de almidón dañado.

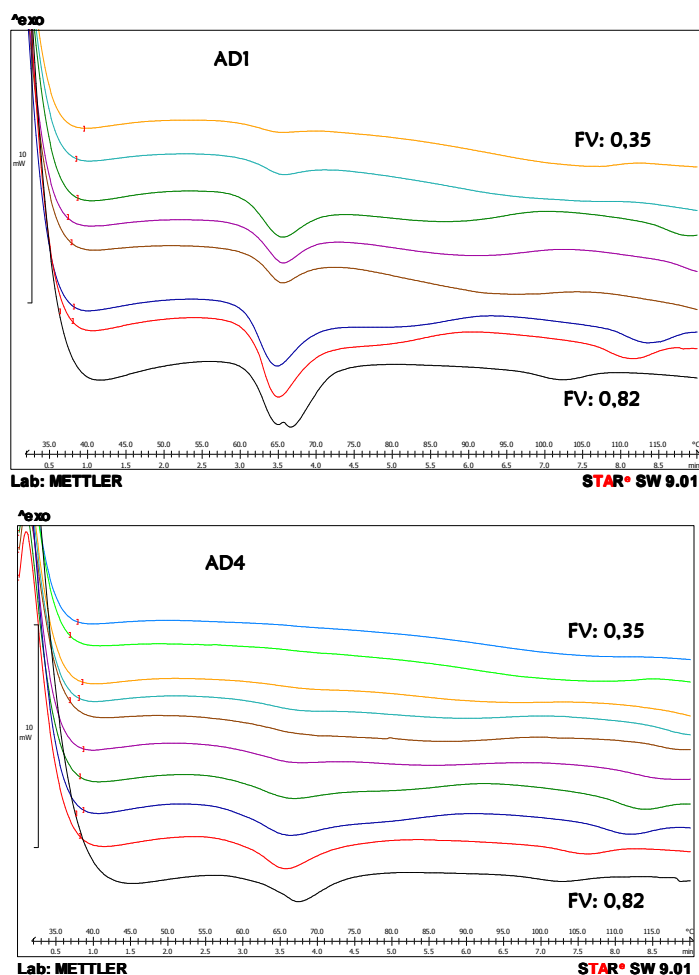


Figura 3.7: Perfil térmico de las muestras AD1 y AD4 a las diferentes proporciones de agua evaluadas.

6.2 Efecto del contenido de almidón dañado a diferentes proporciones de agua sobre el proceso de gelatinización

La entalpía de gelatinización (ΔH_g) disminuyó ($p \leq 0,05$) con el incremento en el contenido de almidón dañado cuando la fracción de agua cambió entre 0,82 y 0,48 (Tabla 3.8). A partir de la fracción de volumen 0,43 se registró un comportamiento diferente, a esta proporción de agua el ΔH_g no se vio afectado ($p \leq 0,05$) por el almidón dañado, aunque con las subsiguientes reducciones de agua (Fv 0,37 y 0,35) se registraron incrementos ($p \leq 0,05$) sobre este parámetro hasta AD3, mientras que con el aumento de gránulos dañados en AD4 se registró una disminución de la entalpía ($p \leq 0,05$). Las disminuciones en la entalpía de gelatinización registradas acuerdan con los resultados reportados por Jovanovich et al. (2003). La pérdida parcial de la integridad granular cuando el almidón de trigo es sometido a fuerzas de cizalla o compresión durante la molienda puede producir una reducción en la temperatura de transición y entalpía de la gelatinización de los gránulos de almidón mecánicamente dañados (Biliaderis, 2009). En relación a esto, Stevens y Elton (1971) han atribuido las diferencias encontradas sobre la entalpía de gelatinización de harinas de trigo a variaciones en el nivel de daño

mecánico. Los cambios sobre la entalpía de gelatinización pueden estar relacionados con la gelatinización espontánea que sufren los gránulos de almidón dañados (Morrison et al., 1994). En este sentido, únicamente los gránulos nativos con sus superficies intactas o los gránulos con superficies menos alteradas podrían contribuir a la entalpía de proceso medida. Las disminuciones en la entalpía de gelatinización, también han sido relacionadas con reducciones en la cristalinidad relativa del almidón, ya que la entalpía de gelatinización es una medida de la cristalinidad, y es un indicador de la pérdida del orden molecular dentro del gránulo (Hoover y Vasanthan, 1994; Cooke y Gidley, 1992; Tester y Morrison, 1990).

Es importante destacar que la cantidad de agua y el contenido de almidón dañado afectaron simultáneamente la entalpía de gelatinización del almidón. La interacción entre ambas variables fue altamente significativa ($p < 0,0001$) lo que indica que estos factores no actuaron independientemente.

La temperatura de inicio de la gelatinización (T_0) no presentó una clara tendencia con el incremento del contenido de almidón dañado entre las Fv 0,82-0,51. Entre las Fv 0,50-0,43 no se observaron modificaciones ($p \leq 0,05$) sobre este parámetro, mientras que, para las Fv 0,37 y 0,35 el aumento de gránulos dañados aumentó T_0 . En relación a AD4, este parámetro fue menor ($p \leq 0,05$) respecto a las demás muestras a fracciones de volumen de agua entre 0,7-0,5, y mayor ($p \leq 0,05$) para las fracciones de volumen 0,37 y 0,35. Las reducciones sobre T_0 observadas en la muestra con mayor contenido de almidón dañado coinciden con lo reportado por Morrison et al. (1994), quienes demostraron una disminución sobre T_0 en muestras dañadas de almidón de trigo y maíz, y atribuyeron este comportamiento a un cambio en la estructura cristalina de la fracción de gránulos que no tuvieron la capacidad de gelatinizar espontáneamente y que forman parte de la fracción de almidón que da origen a la endoterma de gelatinización. Por otro lado, los incrementos sobre T_0 observados principalmente en la muestra AD4 para las fracciones de volumen 0,37 y 0,35 están relacionados con la desaparición de la endoterma de gelatinización y la aparición de la endoterma de fusión a mayores temperaturas.

A partir de los resultados obtenidos, se observó que las variaciones en el contenido de almidón dañado no afectaron ($p \leq 0,05$) la temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}) y el rango de temperatura del proceso de gelatinización (ΔT_g) a todos los niveles de agua analizados. Sin embargo, la muestra AD4 mostró una caída ($p \leq 0,05$) en el rango de temperatura de gelatinización para la fracción de volumen 0,37 y 0,35, nuevamente, este comportamiento diferenciado en esta muestra se debe a la ausencia de la endoterma de gelatinización en los termogramas.

Tabla 3.8. Parámetros de gelatinización de las muestras analizadas.

Muestras	Fv	Gelatinización			
		ΔH_g (J/g)	T_0 (°C)	T_{end} (°C)	ΔT_g (°C)
AD1	0,82	6,8 c	60,3 ab	71,6 a	11,3 a
AD2		6,1 b	61,4 b	74,2 b	12,8 b
AD3		5,0 a	61,1 b	73,4 ab	12,2 ab
AD4		4,6 a	59,8 a	72,5 ab	12,7 b
AD1	0,70	7,9 c	61,0 b	71,2 a	10,2 a
AD2		6,7 b	62,0 c	73,8 c	11,8 b
AD3		6,7 b	61,0 b	72,4 b	11,4 b
AD4		5,6 a	58,7 a	73,6 c	14,9 c
AD1	0,60	8,0 c	60,4 b	85,9 c	25,5 c
AD2		6,6 b	61,3 c	75,5 a	14,2 a
AD3		6,7 b	60,6 b	76,1 a	15,6 a
AD4		5,8 a	57,8 a	79,7 b	21,9 b
AD1	0,56	7,8 c	59,9 b	89,4 a	29,5 a
AD2		7,4 bc	60,7 b	90,2 a	29,5 a
AD3		6,7 b	60,2 b	89,2 a	29,1 a
AD4		5,2 a	58,0 a	86,5 a	28,5 a
AD1	0,51	7,8 c	60,3 b	94,5 a	34,2 a
AD2		6,3 b	61,0 c	94,2 a	33,2 a
AD3		6,2 b	60,0 b	94,5 a	34,4 a
AD4		4,4 a	57,9 a	89,2 a	31,3 a
AD1	0,50	7,4 b	60,4 b	97,2 a	36,8 a
AD2		5,5 a	61,0 b	94,5 a	33,5 a
AD3		5,3 a	60,4 ab	96,0 a	35,6 a
AD4		4,3 a	59,2 a	98,0 a	38,8 a
AD1	0,48	6,5 b	60,7 a	100,0 a	39,2 b
AD2		6,1 b	61,0 a	99,6 a	38,6 ab
AD3		4,3 a	60,7 a	97,7 a	37,1 a
AD4		3,5 a	60,2 a	100,4 a	40,2 b
AD1	0,43	4,2 ab	61,0 a	103,6 a	42,6 a
AD2		4,3 b	61,2 a	103,9 a	42,6 a
AD3		3,3 a	60,6 a	102,9 a	42,3 a
AD4		3,3 a	59,2 a	103,5 a	44,3 a
AD1	0,37	2,1 a	60,8 a	109,7 a	48,9 b
AD2		2,5 c	59,7 a	112,6 a	52,9 b
AD3		3,4 c	59,7 a	110,7 a	51,0 b
AD4		1,7 b	81,0 b	110,0 a	29,0 a
AD1	0,35	2,2 a	60,2 ab	111,9 a	51,7 b
AD2		2,1 b	59,9 a	113,8 a	53,9 b
AD3		2,8 c	63,1 b	114,2 a	51,1 b
AD4		1,9 b	85,7 c	115,0 a	29,3 a

Fv: fracción de volumen de agua, ΔH_g : entalpía de gelatinización, T_0 : temperatura de inicio de la gelatinización, T_{end} : temperatura de finalización de la gelatinización, ΔT_g : rango de temperatura de gelatinización. Los valores de ΔH están expresados en J/g de almidón (10,5% humedad). Las comparaciones estadísticas se realizaron en función del contenido de almidón dañado para cada FV. Letras diferentes en una misma columna a cada FV indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

6.3 Efecto del agua sobre el proceso de retrogradación de muestras con diferente contenido de almidón dañado

Las interacciones moleculares que se establecen entre las moléculas de amilosa y amilopectina luego de la gelatinización durante el enfriamiento, se denominan retrogradación (Hoover, 2001).

Las muestras de almidón gelatinizadas con diferentes proporciones de agua se almacenaron por 9 días y se sometieron a un nuevo ensayo en el calorímetro diferencial de barrido para evaluar el efecto sobre la retrogradación de amilopectina. Los perfiles térmicos de las muestras retrogradadas presentaron dos endotermas, una primer transición entre los 42 y 77 °C, y una segunda entre los 98 y 119 °C. En las pastas o geles de almidón retrogradado las endotermas que se presentan a temperaturas menores a 100 °C son atribuidas a la fusión de los cristales de amilopectina (Liu y Thompson, 1998; Miles et al., 1985). El segundo pico se atribuyó a la fusión del complejo amilosa-lípido ya que este complejo muestra una temperatura de fusión entre 100-130 °C (Biliaderis, 2009; Jay-Lin, 2009). A medida que el contenido de agua disminuyó, la endoterma correspondiente a la disociación del complejo amilosa-lípido se fue reduciendo hasta desaparecer de los termogramas.

Las variaciones en el contenido de agua durante la gelatinización afectaron la entalpía de retrogradación de las muestras evaluadas luego de 9 días de almacenamiento. Como el agua es un plastificante de las regiones amorfas, el proceso de recristalización de las pastas de almidón es sensible al contenido de agua (Roos, 1995b; Slade y Levine, 1991). En presencia de elevadas proporciones de agua, las cadenas laterales de amilopectina presentan una suficiente movilidad. Este efecto junto a las moléculas de agua que residen entre las cadenas, reducen la tendencia a reasociarse de la amilopectina lo que reduce su capacidad de recristalización. Sin embargo, después de la gelatinización de los gránulos de almidón en condiciones de humedad reducida, las cadenas de amilopectina tienden a reasociarse más fácilmente entre sí, lo que resulta en una mayor proporción de amilopectina cristalizada. En condiciones muy limitadas de agua se supone que la menor proporción de cristalización está relacionada con una restricción en la movilidad de la cadenas polimérica y también debido a una heterogénea distribución de los polímeros en el sistema (Zhou et al., 2010). Numerosos estudios (Biliaderis, 2009; Zeleznak y Hoseneý, 1986; Longton y LeGrys, 1981), utilizando calorimetría diferencial de barrido, han demostrado la existencia de un máximo de retrogradación a contenidos de agua entre 35 y 45%, lo que confirma que el proceso de retrogradación es controlado por la cantidad de agua disponible durante el almacenamiento. Una curva característica en forma de campana se obtuvo al graficar la entalpía de retrogradación vs la fracción de volumen de agua (Figura 3.8). El análisis de las curvas muestra que existe un rango de humedad en el cual se produce un máximo de retrogradación, y además, claramente deja expuesto el hecho de que la retrogradación del almidón es controlada por la cantidad de agua presente durante el almacenamiento (Ferrero et al., 1996; Zeleznak y Hoseneý, 1986; Longton y LeGrys, 1981). En general, el máximo valor de la entalpía de retrogradación se registró para las fracciones de volumen de agua entre 0,45-0,58 (contenido de agua de 35 y 48% p/p), lo que se condice con lo informado. Las muestras AD1, AD2 y AD3 presentaron su máximo valor de entalpía de retrogradación para las fracciones de agua de 0,45-0,48, mientras que, la muestra AD4 lo hizo a una fracción de volumen de 0,56.

En las cuatro muestras, las reducciones en la proporción de agua no afectaron ($p \leq 0,05$) la temperatura de inicio de la retrogradación (T_{or}). Sin embargo, la temperatura de finalización de la retrogradación y rango de temperatura de la retrogradación (ΔT_r) incrementaron ($p \leq 0,05$) como consecuencia de las disminuciones de agua (Tabla 3.9). El rango de temperatura de fusión de la amilopectina recristalizada es un indicativo de la calidad y heterogeneidad de los cristales de amilopectina presentes. Los rangos amplios de retrogradación están relacionados con la presencia de una gran cantidad de cristales de estabilidad variable, mientras que, rangos más pequeños indican la presencia de cristales más homogéneos y de similar estabilidad (Fredriksson et al., 1998). Por esto, es posible inferir que las reducciones en la cantidad de agua derivaron en la formación de cristales de amilopectina más heterogéneos y de estabilidad variable durante el almacenamiento.

6.4 Efecto del contenido de almidón dañado a diferentes proporciones de agua sobre el proceso de retrogradación

La cantidad de agua y el contenido de almidón dañado afectaron simultáneamente la entalpía de retrogradación del almidón. La interacción entre ambas variables fue altamente significativa ($p < 0,0001$) lo que indica que estos factores no actuaron independientemente.

En términos generales, el incremento en el contenido de almidón dañado a todas las fracciones de volumen de agua causó un incremento ($p \leq 0,05$) sobre la entalpía de retrogradación de la amilopectina. Esta tendencia se registró para las muestras AD1, AD2 y AD3, ya que la AD4 presentó una caída de este parámetro, alcanzando valores similares a los registrados para la muestra AD1. No obstante, para la fracción de volumen de agua 0,82; 0,56 y 0,51 no se observaron diferencias significativas sobre la entalpía de retrogradación por efecto del almidón dañado (Tabla 3.9). Diferentes autores han sugerido que la fragmentación de la amilopectina y el contenido de agua poseen un rol crucial sobre las transiciones entálpicas. También, se ha informado que la amilosa puede llegar a potenciar la cristalización de la amilopectina durante la retrogradación, y que este efecto es influenciado por el agua residual presente en el sistema (Zhou et al., 2011; Fredriksson, et al., 1998). Leman et al. (2006) y Morrison y Tester (1994) han demostrado que el daño mecánico sobre los gránulos de almidón causa una reducción de las moléculas de amilopectina principalmente produciendo fragmentos de menor peso molecular. En este sentido, es posible que estos fragmentos resulten en la reducción del efecto plastificante del agua disponible en el sistema, lo que reduce la movilidad de las cadenas poliméricas y promueve su interacción, facilitando la asociación entre las cadenas de amilopectina.

Por otro lado, la disminución en la entalpía de retrogradación registrada para AD4 asociada con una menor capacidad de reordenamiento de las cadenas de amilopectina, puede estar relacionada con una excesiva producción de dextrinas que interfirieren en los puntos de unión entre las regiones de asociación polimérica, lo que obstaculiza la reasociación entre las moléculas y contribuye a la reducción de la fracción de amilopectina recristalizada.

Como se ha detallado en el capítulo 2, existe evidencia que sugiere que las dextrinas interfieren con la retrogradación de la amilopectina. No obstante, en contraste con esta concepción hay otras teorías que indican que son las modificaciones sobre los polímeros de almidón las responsables de los cambios registrados sobre la capacidad de recristalización del sistema. Por lo tanto, otro aspecto a considerar, que posiblemente contribuye con este efecto, podría estar relacionado con los cambios sobre las moléculas de amilopectina que resultan de la ruptura de algunas regiones de su estructura polimérica. Es posible que debido a la ruptura de las cadenas de amilopectina la estructura resultante sea más débil y menos rígida, lo que contribuye a una reducción en la capacidad de retrogradación del sistema.

El almidón dañado no afectó ($p \leq 0,05$) la temperatura de inicio de la retrogradación (T_0) a todos los niveles de agua analizados, aunque se registró una disminución ($p \leq 0,05$) de este parámetro en la muestra AD4 para las fracciones de volumen 0,37 y 0,35. Los aumentos en el nivel de almidón dañado no afectaron ($p \leq 0,05$) la temperatura de finalización de la retrogradación (T_{end}), ni tampoco el rango de temperatura de retrogradación (ΔT_r) (Tabla 3.9).

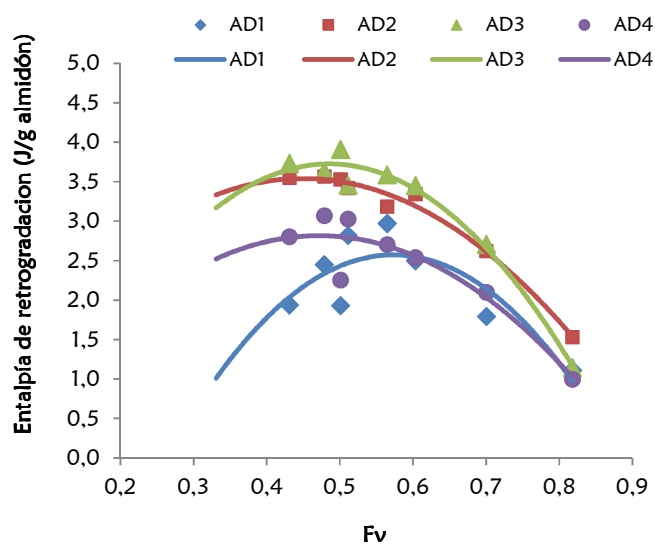


Figura 3.8: Efecto del agua sobre la entalpía de retrogradación de la amilopectina

Tabla 3.9. Parámetros de retrogradación de las muestras analizadas.

Muestras	Fv	Retrogradación			
		ΔH_r (J/g)	T_0 (°C)	T_{end} (°C)	ΔT_r (°C)
AD1	0,82	1,5 ab	44,2 a	61,0 a	16,7 a
AD2		1,9 b	44,0 a	63,3 b	19,3 a
AD3		1,1 ab	43,2 a	63,0 b	19,8 a
AD4		1,0 a	43,3 a	63,0 b	19,7 a
AD1	0,70	1,8 a	44,3 bc	63,5 a	19,2 a
AD2		2,6 b	44,8 c	63,7 a	18,9 a
AD3		2,7 b	42,9 ab	62,4 a	19,5 a
AD4		2,1 ab	42,2 a	62,2 a	20,0 a
AD1	0,60	2,5 a	43,8 a	64,6 a	20,8 a
AD2		3,3 b	42,8 a	66,2 b	23,4 a
AD3		3,5 b	44,0 a	65,7 ab	21,8 a
AD4		2,5 a	43,6 a	65,3 ab	21,7 a
AD1	0,56	3,0 a	44,2 a	66,0 a	21,8 a
AD2		3,2 a	43,3 a	67,0 a	23,7 a
AD3		3,6 a	44,0 a	66,5 a	22,5 a
AD4		3,1 a	43,4 a	66,7 a	23,3 a
AD1	0,51	3,1 a	42,4 a	70,4 a	28,0 a
AD2		3,4 a	45,6 a	70,1 a	24,5 a
AD3		3,5 a	44,7 a	69,3 a	24,6 a
AD4		3,3 a	43,9 a	68,9 a	24,9 a
AD1	0,50	2,3 a	42,6 a	68,6 a	26,0 a
AD2		3,5 b	43,8 a	70,3 b	26,6 ab
AD3		3,9 b	45,3 a	70,0 ab	24,7 a
AD4		2,3 a	42,9 a	71,5 b	28,6 b
AD1	0,48	2,2 a	43,9 b	69,4 a	25,5 a
AD2		3,6 c	44,8 bc	70,6 ab	25,8 a
AD3		4,1 d	45,4 c	70,0 ab	24,6 a
AD4		3,1 b	42,4 a	72,0 b	29,7 b
AD1	0,43	2,3 a	45,1 b	64,5 a	19,4 a
AD2		3,6 ab	45,8 b	72,4 b	26,6 b
AD3		4,1 b	46,1 b	71,8 b	25,7 b
AD4		3,2 ab	43,3 a	71,4 b	28,1 b
AD1	0,37	2,7 a	45,8 ab	74,5 a	28,7 ab
AD2		2,5 a	43,8 a	74,9 a	31,0 b
AD3		3,9 b	47,2 b	73,8 a	26,6 a
AD4		3,0 a	45,0 ab	74,3 a	29,3 ab
AD1	0,35	2,8 a	47,5 a	75,9 a	28,4 a
AD2		2,5 a	45,1 a	76,0 a	30,9 a
AD3		3,8 b	48,1 a	75,6 a	27,5 a
AD4		2,8 a	46,5 a	75,9 a	29,4 a

Fv: fracción de volumen de agua, ΔH_r : entalpía de retrogradación, T_0 : temperatura de inicio de la retrogradación, T_{end} : temperatura de finalización de la retrogradación, ΔT_r : rango de temperatura de retrogradación. Los valores de ΔH están expresados en J/g de almidón (10,5% humedad). Las comparaciones estadísticas se realizaron en función del contenido de almidón dañado para cada FV. Letras diferentes en una misma columna a cada FV indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

7. Parámetros del modelo de Flory-Huggins

La determinación experimental de la temperatura de fusión de materiales a bajos contenidos de agua es inaccesible debido a su degradación térmica. La adición de un plastificante como el agua

disminuye la temperatura de fusión, y este efecto es equivalente al que tiene el incremento de la temperatura a un determinado contenido de humedad (Parker y Ring, 2001; Biliaderis et al., 1986).

El modelo de Flory-Huggins ha sido aplicado con el propósito de obtener una descripción cuantitativa del proceso de gelatinización del almidón o de la temperatura de fusión del almidón, a partir de sistemas de almidón en agua (Parker y Ring, 2001). El modelo de Flory-Huggins establece una relación entre la temperatura de fusión (T_m) de un polímero cristalino, contenido en una mezcla de polímero-disolvente, y la fracción de volumen (ϕ) del diluyente (Flory, 1953). A partir de esta relación, es posible determinar la temperatura de fusión ideal de un polímero puro (T_m°), el calor de fusión por unidad repetida de glucosa (ΔH_u) y la constante del modelo denominada parámetro de interacción polímero-diluyente de Flory-Huggins (χ_{12}).

Mediante la ecuación de Flory-Huggins se relacionaron los valores de temperatura de finalización de la gelatinización registrados para cada muestra a todas las fracciones de volumen de agua. A partir de esto, se encontró que la temperatura de fusión del almidón puro y el parámetro de interacción de Flory-Huggins en la muestra AD1 fue de 452 °K y 0,34, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de valores reportados por otros autores (Habeych et al., 2009; Banks et al., 2007; Moates et al., 1998; Farhat y Blanshard, 1997; Whittam et al., 1990; Russell, 1987a; Donovan y Mape, 1980). La interacción entálpica entre los componentes de la mezcla (almidón-agua) se expresa a través del parámetro de interacción; un valor negativo o pequeño y positivo de este parámetro de interacción polímero-diluyente es característico de una mezcla estable (Rudin, 1999) e indica una interacción entálpica fuerte entre ambos. El calor de fusión por unidad de glucosa (ΔH_u) encontrado para la muestra AD1 fue comparable con otros valores informados (Habeych et al., 2009; Banks et al., 2007) y similar a la entalpía de fusión de la D-glucosa, la cual según valores reportados es de 30 kJmol⁻¹ (Moates et al., 1998).

El almidón dañado causó un incremento de la temperatura de fusión del polímero puro (T_m°) y del parámetro de interacción de Flory-Huggins polímero-diluyente (χ_{12}), y una disminución en el calor de fusión por unidad de glucosa (ΔH_u) (Tabla 3.10). El aumento en el parámetro de interacción de Flory-Huggins sugiere una disminución en la interacción entálpica establecida entre el almidón y el agua, y una disminución de la estabilidad de las mezclas. En este sentido, aunque las interacciones establecidas entre el polímero y el agua son más complejas que la simple interacción entre pares de moléculas vecinas que establece la teoría de Flory-Huggins, probablemente en estas condiciones la interacción mediada por enlaces del tipo puente hidrogeno entre polímeros se vea más favorecida que la interacción mediada por puente hidrogeno entre el polímero y el agua, y en consecuencia, el punto de fusión del polímero puro incrementa su valor.

Tabla 3.10. Efecto del almidón dañado sobre los parámetros de Flory-Huggins

Parámetros de ajuste	Modelo de Flory-Huggins			
	AD1	AD2	AD3	AD4
ΔH_u (KJ/mol)	37,9 c	20,3 ab	22,9 b	18,9 a
χ_{1-2}	0,34 a	0,59 bc	0,55 b	0,59 c
T_m (°K)	451,8 a	518,0 bc	498,4 b	528,8 c
r^2	0,96	0,93	0,95	0,95

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

8. Cinética de retrogradación

La cinética de retrogradación del almidón puede ser descripta a partir del modelo de Avrami (Jouppilaav et al., 1998; Bulkin et al., 1987; Russell, 1987b; Russell, 1983a; Russell, 1983b; Russell, 1983c; Eliasson, 1983; Germani et al., 1983; del Rosario y Pontiveros, 1983; Fearn y Russell, 1982; Longton y LeGrys, 1981; Colwell et al., 1969; McIver et al., 1968). La ecuación matemática que representa este modelo considera que la fracción de cristalización que está por ocurrir en el sistema es una función exponencial inversa del tiempo. Este modelo se desarrolló originalmente para describir el proceso de cristalización de un polímero a partir de su estado de fusión, es decir, cuando el valor inicial de nivel de cristalinidad es cero (Sharpless, 1966). A partir de esta ecuación se obtienen dos constantes de ajuste que describen la cinética del proceso de recristalización del polímero, el parámetro K, que representa la constante de velocidad (crecimiento cristalino), y el parámetro n, denominado exponente Avrami, que describe el tipo de crecimiento cristalino.

La cinética de retrogradación de la amilopeptina se evaluó como una función del contenido de almidón dañado, por lo que la fracción de volumen de agua se mantuvo constante en 0,56 debido a que esta fracción mostró los mayores valores de retrogradación (Figura 3.8). En todos los casos analizados, la entalpía de fusión de la amilopeptina incrementó ($p \leq 0,05$) más rápidamente durante los dos primeros días, que entre el segundo y décimo día de almacenamiento, manteniéndose relativamente constante ($p \leq 0,05$) a partir desde entonces (Tabla 3.11, Figura 3.9).

Se observó un aumento ($p \leq 0,05$) paulatino de la entalpía de fusión de la amilopeptina por efecto del almidón dañado hasta el día seis de almacenamiento. No se registraron diferencias al día ocho, sin embargo, a partir del décimo día esta tendencia de incremento se observó nuevamente ($p \leq 0,05$). Resultados similares se presentaron en el primer capítulo, donde se observó una influencia significativa del almidón dañado sobre el incremento en la proporción de la amilopeptina retrogradada durante los tres primeros días de almacenamiento. Los incrementos en la entalpía de fusión de la amilopeptina recristalizada indican una mayor velocidad de cristalización a tiempos cortos de almacenamiento en presencia de almidón dañado.

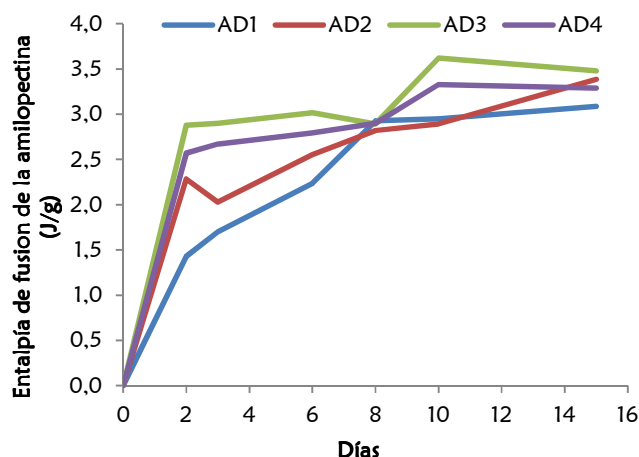


Figura 3.9: Efecto del contenido de almidón dañado sobre la entalpía de retrogradación de la amilopectina en función del tiempo de almacenamiento.

Tabla 3.11. Efecto del contenido de almidón dañado sobre la entalpía de retrogradación de la amilopectina en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento (Días)	Entalpía de fusión de la amilopectina (ΔH_f) (J/g)			
	AD1	AD2	AD3	AD4
2	1,43 a	2,29 b	2,88 d	2,57 c
3	1,70 a	2,03 b	2,90 c	2,67 c
6	2,24 a	2,56 ab	3,02 b	2,80 b
8	2,93 a	2,82 a	2,90 a	2,90 a
10	2,95 a	2,90 a	3,62 c	3,33 b
15	3,09 a	3,39 b	3,48 b	3,29 ab

Los valores de entalpía están expresados en J/g de almidón (10,5% humedad). Las comparaciones estadísticas se realizaron en función del contenido de almidón dañado. Letras diferentes en diferentes columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA).

En la Figura 3.10 se presentan las curvas de la fracción no retrogradada de almidón en función del tiempo sobre las que se aplicó el modelo de Avrami. La muestra AD1 registró un valor de exponente de Avrami (n) y una constante de velocidad (K) de 0,98 y 0,29 días^{-1} respectivamente (Tabla 3.12). El valor del exponente de Avrami para la muestra con menor contenido de almidón dañado fue cercano a 1, y este valor es similar al obtenido por Yaoqi et al. (2009) para almidón de arroz y por Mua y Jackson (1998) para una fracción de amilopectina de maíz. Russell (1987b) reportó valores de exponente de Avrami menores a la unidad para almidones con diferente contenido de amilopectina. Se han informado valores de exponente Avrami para almidón de trigo en el rango de 0,33 y 1,26, dependiendo del tiempo de almacenamiento y de la temperatura (Zhang y Jackson, 1992; Russell y Oliver, 1989; Longton y LeGrys, 1981). A pesar de la amplia variación de los valores

reportados para el exponente de Avrami, no se describen referencias para muestras con almidón dañado.

Un valor de exponente de Avrami $n = 1$ representa un crecimiento de cristales en forma de varillas a partir de una nucleación instantánea, $n = 2$ representa un crecimiento cristalino en forma de varillas a partir de una nucleación esporádica, $n = 3$ representa un crecimiento cristalino en forma de discos a partir de una nucleación esporádica o instantánea, y $n = 4$ representa un crecimiento cristalino esférico a partir de una nucleación esporádica o instantánea (McIver et al., 1968). De acuerdo con los resultados obtenidos, la recrystalización de la amilopectina en el almidón de trigo se produce a partir de una nucleación instantánea, seguida por un crecimiento cristalino en forma de varilla, ya que $n \leq 1$ (Tabla 3.12).

La constante de velocidad (K) está relacionada con la velocidad de nucleación de los cristales y el proceso de crecimiento cristalino (Del Nobile et al., 2003). Esta constante incrementó por efecto del contenido de almidón dañado (Tabla 3.12), lo que indica que incrementos en el contenido de almidón dañado promueven el proceso de nucleación y favorecen la velocidad del crecimiento cristalino.

El tiempo medio de cristalización ($t_{1/2}$) es un parámetro de cinética de cristalización, que evalúa el tiempo que transcurre desde el inicio de la cristalización hasta completar el 50% de este proceso. Los parámetros K y n correspondiente a cada muestra se utilizaron para calcular el valor de tiempo medio de cristalización ($t_{1/2}$). El tiempo medio de cristalización disminuyó con el incremento en el contenido de almidón dañado (Tabla 3.12). Los incrementos en velocidad de cristalización y los menores tiempos de vida media observados indican que el incremento de contenido de almidón dañado aumenta significativamente la velocidad de cristalización de la amilopectina en el sistema durante la retrogradación.

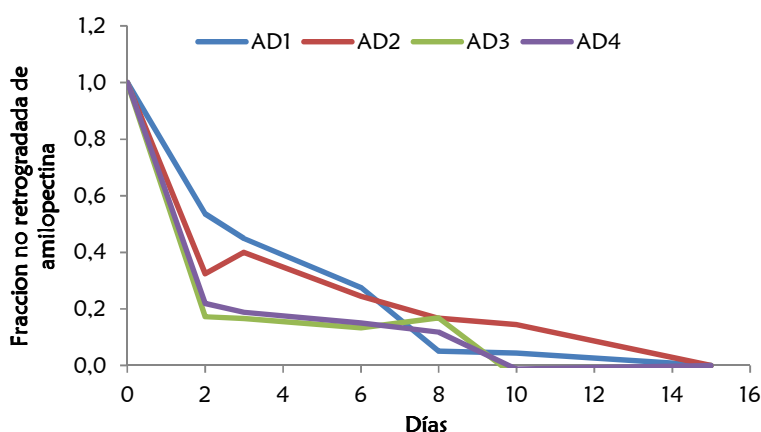


Figura 3.10: Efecto del contenido de almidón dañado sobre la fracción no retrogradada de amilopectina en función del tiempo de almacenamiento.

Tabla 3.12. Efecto del almidón dañado sobre los parámetros del modelo de Avrami

Parámetros de ajuste	Modelo de Avrami			
	AD1	AD2	AD3	AD4
Exponente Avrami (n)	0,98 c	0,50 b	0,37 a	0,43 ab
Constante de velocidad (k) (Días ⁻¹)	0,29 a	0,64 b	1,27 c	1,07 c
t _{1/2} (Días)	2,48 c	1,17 b	0,20 a	0,37 a
r ²	0,98	0,97	0,97	0,99

Letras diferentes en diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA).

El proceso de cristalización se lleva a cabo en tres etapas, nucleación (formación del núcleo), propagación (crecimiento del cristal) y maduración (perfeccionamiento del cristal y/o continuidad del crecimiento) (Roos, 1995a,b). La formación de una nueva entidad cristalina a partir de una solución se inicia a través del proceso de nucleación. La nucleación se define como la serie de procesos por los que las moléculas de un sistema se reorganizan en un grupo lo suficientemente grande como para tener la capacidad de crecer irreversiblemente a un tamaño más grande. La fuerza motriz necesaria para la nucleación y el crecimiento de un cristal se origina a partir de una supersaturación del sistema causada por una remoción del solvente o por una disminución en la temperatura del material fundido (Roos, 1995a,b). El proceso de nucleación implica la formación de una nueva fase dentro del sistema, lo que requiere de energía para que ocurra. Por lo tanto, el trabajo necesario para formar un grupo n de las moléculas es la diferencia entre la energía libre del sistema en sus estados final e inicial, más un término relacionado con la formación de una interface entre el núcleo y la solución. La velocidad de nucleación, es decir, el número de núcleos formados por unidad de tiempo por unidad de volumen, es prácticamente cero hasta que el sistema alcanza un valor crítico de sobresaturación, después del cual la velocidad aumenta de manera exponencial.

El crecimiento cristalino, seguido al proceso de nucleación, involucra principalmente la difusión de moléculas a través de la solución y la unión de estas a la superficie del núcleo, lo que deriva en un aumento en el tamaño del cristal. La velocidad del crecimiento cristalino es afectada esencialmente por el proceso de transporte de las moléculas y/o por el proceso de adhesión de las moléculas a la superficie, aunque otras variables, como por ejemplo la difusión del agua lejos de la superficie del cristal y la apropiada orientación de las moléculas en las superficies pueden causar alteraciones durante este proceso. El crecimiento global de los cristales va a estar determinado y controlado por la velocidad del proceso que ocurra más lentamente. El proceso de transporte dependerá de la velocidad del movimiento molecular, lo que se relaciona directamente con el coeficiente de difusión molecular, el cual disminuye con el incremento del tamaño molecular. Consecuentemente, las moléculas de mayor tamaño tenderán a difundir más lentamente que moléculas más pequeñas, lo que origina una alteración sobre este proceso (Mercier et al., 2002).

La retrogradación del almidón es un proceso que depende de la temperatura y el tiempo, e involucra la recristalización parcial de los componentes del almidón. Durante este proceso las moléculas de amilosa, por un lado, y de amilopectina por el otro, tienden a reasociarse formando una estructura ordenada. La recristalización de las moléculas de amilosa ocurre rápidamente después del enfriamiento del almidón gelatinizado, mientras que, la recristalización de la amilopectina es un proceso más lento e involucra la reasociación de las cadenas externas de las ramificaciones (Miles et al., 1985; 1984). El lento proceso de cristalización de estos polímeros de amilopectina se debe a su limitado movimiento molecular que restringe la formación de arreglos moleculares de estructura cristalina, debido a que se encuentran, en su mayoría, confinados dentro de los gránulos de almidón gelatinizados e hidratados.

En muestras de almidón de trigo molidas, Morrison y Tester (1994) han detectado una leve depolimerización de la amilosa después de someter al sistema a una severa molienda, sin embargo, a todos los niveles de molienda estudiados registraron fragmentos de bajo peso molecular provenientes de la molécula de amilopectina. Estos autores, también observaron que el tamaño de los fragmentos moleculares tendió a disminuir con el incremento en el tiempo de molienda, indicando además la ruptura de estos fragmentos. En el mismo sentido, Tester (2006) determinó que el proceso de molienda causa un desgaste sobre los gránulos de almidón, y además comprobó que a causa de este proceso se produce una fragmentación de las moléculas de amilopectina, que resulta en una mezcla de material de similares características a la amilosa y también en algunos fragmentos de amilopectina.

Como se ha descrito anteriormente, el movimiento molecular es fundamental para que el proceso de cristalización se lleve a cabo. Esta consideración junto con la evidencia de la fragmentación de las moléculas de amilopectina sugieren que el aumento de la cinética de recristalización debido al incremento en el contenido de almidón dañado está relacionado con la disminución del peso molecular de las moléculas de amilopectina. La reducción en el tamaño molecular está asociada con una mayor difusión de las moléculas, lo que favorece la nucleación. En este mismo sentido, las suspensiones gelatinizadas de almidón, como se ha detallado anteriormente, presentaron una menor viscosidad a causa del incremento del contenido de almidón dañado. Por lo tanto, si se considera que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional a la viscosidad del medio (Roos, 1995a,b), resulta evidente que esta condición pueda afectar la velocidad de cristalización de las moléculas en el sistema. Esta relación sugiere que el aumento de la cinética de recristalización también está asociado con la disminución de la viscosidad del sistema, ya que una menor viscosidad está relacionada con una mayor movilidad de las partículas en el medio.

9. Caracterización reológica de los geles de almidón

La caracterización reológica de los sistemas de almidón proporciona información cuantitativa de la estructura a nivel molecular. Las determinaciones reológicas que involucran pequeñas

deformaciones permiten evaluar las propiedades estructurales de estos sistemas sin perturbar o destruir su estructura interna (Lopes da Silva y Rao, 1999; Ferry, 1980).

Cuando las suspensiones de almidón gelatinizadas se enfrían pasan de ser un sistema líquido, donde los gránulos de almidón gelatinizados están dispersos en una matriz de amilosa, a transformarse en un gel, donde los gránulos hinchados se encuentran inmersos dentro una red de amilosa. Durante este proceso, una parte del agua del sistema es absorbida y retenida por los gránulos de almidón, y otra parte es atrapada e inmovilizada en la red de amilosa (Choi y Kerr, 2003).

Al aplicar una fuerza, los líquidos ideales fluyen y los sólidos perfectamente elásticos se deforman; los geles de almidón son materiales semisólidos viscoelásticos ya que presentan simultáneamente un comportamiento del tipo sólido (elástico) y un comportamiento del tipo líquido (viscoso) (Rao, 1999b). Para una estructura de gel con enlaces no permanentes, como los geles de almidón, las asociaciones fuertes entre las moléculas contribuyen al módulo elástico o de almacenamiento (G'), mientras que los enlaces débiles contribuyen al módulo viscoso o de pérdida (G'') (Biliaderis, 2009).

Las suspensiones de almidón gelatinizadas se enfriaron a temperatura ambiente durante 1 h, y posteriormente se determinaron las características reológicas del sistema. En general, las cuatro muestras presentaron un reograma de similares características (Figura 3.11), y en todos los casos se observó un predominio de la componente elástica sobre la viscosa en el rango de frecuencia analizado, lo que demuestra que estos sistemas son geles (Steffe, 1996b). No obstante, los módulos dinámicos (G' y G'') presentaron una leve dependencia con la frecuencia, observándose en todos los casos un ligero incremento de estos con el incremento de la frecuencia. Por lo tanto, todas las muestras mostraron un comportamiento reológico del tipo de un gel débil, ya que en un gel verdadero los módulos dinámicos no registran dependencia con la frecuencia (Steffe, 1996b). En los geles débiles hay una mayor dependencia de los módulos dinámicos con la frecuencia, lo que sugiere la existencia de procesos de relajación, y una menor diferencia entre los módulos, lo que indica que un menor porcentaje de la energía almacenada se recupera luego de la deformación (Lopes da Silva y Rao, 1999). Basado en el comportamiento macroscópico de los geles formados a partir de biopolímeros desordenados, es posible distinguir los geles verdaderos de los geles débiles. En este sentido, aquellos sistemas que pueden soportarse por sí mismos, como consecuencia del desarrollo de la red tridimensional organizada y con interacciones fuertes, son denominados "geles verdaderos", mientras que, aquellos sistemas que se caracterizan por tener una red entrecruzada menos organizada y con interacciones más débiles, las cuales fácilmente pueden ser desestabilizadas cuando se la somete a una tensión lo suficientemente alta, son denominados "geles débiles". (Lopes da Silva y Rao, 1999).

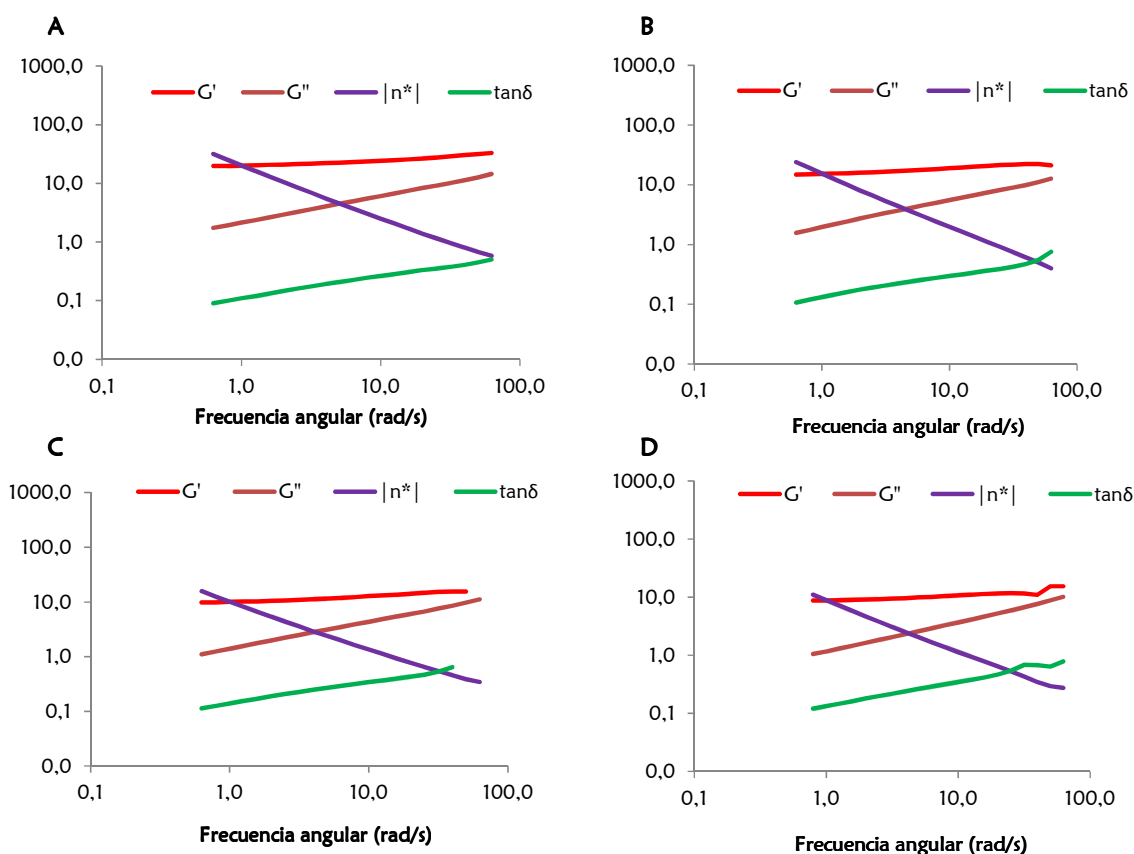


Figura 3.11: Efecto del contenido de almidón dañado sobre el perfil reológico de geles de almidón. **A:** AD1, **B:** AD2, **C:** AD3 y **D:** AD4.

El incremento del porcentaje de almidón dañado ocasionó una caída ($p \leq 0,05$) del módulo elástico (G'), del módulo complejo (G^*) y de la viscosidad compleja (η^*), sin embargo, no se registraron alteraciones ($p \leq 0,05$) sobre el módulo viscoso (G'') ni la tangente del ángulo delta ($\tan\delta$) (Tabla 3.13). Estos resultados indicaron que los aumentos en los niveles de almidón dañado produjeron geles menos elásticos y de menor resistencia. En los reogramas obtenidos para la muestra con mayor contenido de almidón dañado se observó una mayor proximidad entre los módulos elástico (G') y viscoso (G'') a altas frecuencias, lo que indica una mayor desestabilización de la estructura como consecuencia de la deformación. Debido a que el módulo elástico es proporcional al entrecruzamiento del sistema, el cual es determinado por las interacciones entre los polímeros, las reducciones registradas sobre el módulo elástico sugieren un menor entrecruzamiento de los polímeros en los geles con mayor proporción de almidón dañado.

Tabla 3.13. Efecto del contenido de almidón dañado sobre los parámetros reológicos de los geles de almidón.

Muestras	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)	n* (Pa.s)	tanδ
AD1	28,29 c	3,98 a	29,00 c	4,60 c	0,26 a
AD2	17,9 b	4,04 a	21,00 b	3,37 b	0,26 a
AD3	11,9 ab	3,88 a	12,33 a	1,97 a	0,29 a
AD4	10,15 a	3,29 a	12,50 a	1,93 a	0,29 a

Valores correspondientes a 1 Hz. Letras diferentes en diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA).

A nivel molecular, un gel está formado por una red continua de moléculas de polímero, la cual se mantiene estructurada a partir de entrecruzamientos o zonas de unión intercatenarias. Esta red es la principal responsable de la resistencia del sistema a cualquier deformación (comportamiento similar a un sólido), debido a que las cadenas poliméricas que se extienden a lo largo del gel son capaces de absorber la energía que se aplica durante una deformación. El almidón, como la mayoría de los biopolímeros, forma geles físicos estructurados por interacciones débiles del tipo puente hidrógeno. Por lo tanto, las redes poliméricas en el gel se forman por agregación física, donde es posible distinguir regiones con un orden localizado de la predominante red desordenada (Rao, 1999b).

Durante el proceso de gelificación, inicialmente se forman dobles hélices entre las moléculas de amilosa solubilizadas y se desarrolla una red continua, estas dobles hélices luego de algunas horas forman una estructura cristalina muy estable. La recristalización de las cadenas laterales cortas de amilopectina es un proceso mucho más lento que implica días o semanas, y ocurre dentro de los gránulos gelatinizados (Miles et al., 1985). Por lo tanto, la retrogradación de la amilosa determina principalmente la dureza inicial de un gel de almidón, mientras que, la retrogradación de la amilopectina determina el desarrollo a largo plazo de la estructura del gel.

Las propiedades reológicas de los geles de almidón dependen principalmente de las propiedades reológicas de la fase continua (amilosa), de la fracción de volumen ocupada por los gránulos, de la deformabilidad de los gránulos y de la interacción entre los gránulos de almidón y la red de amilosa (Ring et al., 1987; Eliasson, 1986). No obstante, dependiendo de la concentración de almidón los geles presentarán características reológicas diferentes debido al tipo de estructura que se establece. En un gel diluido la fracción de volumen ocupada por los gránulos de almidón es baja y por lo tanto la proporción de amilosa lo suficientemente alta como para formar un gel esencialmente de amilosa. Sin embargo, cuando la concentración de almidón es más elevada, los gránulos de almidón hinchados están estrechamente empaquetados y la amilosa sólo aparece como una capa delgada entre los gránulos formando un gel. Por lo tanto, en un gel de almidón concentrado la rigidez de los

gránulos hinchados va a determinar principalmente la dureza del gel en su conjunto, mientras que, las propiedades de la matriz de amilosa entre los gránulos hinchados serán de menor importancia en la determinación de las propiedades de deformación de este tipo de geles (Keetels et al., 1996).

A partir de lo expuesto, es posible sugerir que las propiedades reológicas de los geles de almidón evaluados estuvieron principalmente determinadas por las características de la matriz de amilosa formada ya que la caracterización reológica se llevó a cabo luego de 1 h de calentados y a que los geles analizados se prepararon a partir de dispersiones diluidas de almidón. Se entiende que los incrementos en el contenido de almidón dañado resultan en una mayor proporción de amilopectina y de fragmentos poliméricos de menor peso molecular dispersos en el medio acuoso, debido a la gelatinización espontánea que sufren los gránulos dañados de almidón y a la depolimerización mecánica de los gránulos causada durante la molienda, respectivamente. La amilosa que forma la fase continua de los geles es la responsable de aportar elasticidad y rigidez al sistema, por lo tanto, es posible que las disminuciones en la elasticidad y la menor resistencia de los geles registrada a causa del aumento del contenido de almidón dañado estén relacionadas con la presencia de estas moléculas. Probablemente las moléculas de amilopectina y los demás fragmentos moleculares obstaculizan los puntos de unión dentro de la red de amilosa, promoviendo una estructura más desordenada y débil, lo que deriva en una red menos elástica y estructurada. En este sentido, Sievert y Wursch (1993) observaron que el reordenamiento de las cadenas de amilosa es restringido en presencia de la amilopectina durante el enfriamiento de mezclas de amilosa y amilopectina que contuvieron un 78% de agua. En apoyo con estos resultados, Chung y Liu (2009) sugirieron que estructuras de cadena larga ramificada, ya sea de amilosa o amilopectina impiden la asociación de las cadenas de amilosa durante el enfriamiento.

Es probable, aunque en menor medida, que las diferencias registradas en los geles a causa del aumento en los niveles de almidón dañado también puedan estar asociadas con una menor fracción de volumen ocupada por gránulos de almidón hidratados e hinchados dentro de la red de amilosa en el gel. Como se propuso anteriormente, cuando se analizó el efecto del almidón dañado sobre el perfil de viscosidad durante el calentamiento, los gránulos dañados gelatinizados son menos resistentes durante el calentamiento en el periodo de formación de las pastas, y por lo tanto, probablemente estos gránulos dañados gelatinizados se rompen más fácilmente que los gránulos con sus superficies intactas o menos alteradas, no contribuyendo totalmente a la fracción de volumen ocupada por los gránulos gelatinizados en el gel. Una menor fracción de volumen efectiva de gránulos de almidón en el sistema se relaciona con una disminución de las interacciones entre los gránulos de almidón, lo que se asocia con un deterioro de la estructura general del sistema.

10. Análisis del perfil de textura de los geles de almidón

Los estudios de textura proveen información relativa de la estructura de un sistema y sus cambios debidos a la aplicación de una fuerza (Surowka, 2002). A partir de estos ensayos es posible evaluar las propiedades de la macroestructura de los geles de almidón. Los geles de almidón son sistemas que no se encuentran en equilibrio, es decir, muestran dependencia con el tiempo. Los cambios post gelatinización que conducen al incremento del orden molecular en el almidón, los cuales son descritos colectivamente como retrogradación, ejercen una fuerte influencia sobre la textura de los geles de almidón (Biliaderis, 2009; Levine y Slade, 1992). Ring et al. (1987) han sugerido que la firmeza inicial de los geles de almidón se debe a la formación de la matriz de amilosa, y que los sucesivos incrementos de la firmeza en el tiempo son causados por la cristalización reversible de amilopectina. La firmeza de un gel no sólo depende de las interacciones establecidas entre las moléculas de almidón durante la retrogradación, la extensión de las zonas de unión formadas y la rigidez de los gránulos gelatinizados también afectan a esta característica textural (Biliaderis, 2009).

En términos generales, los geles de almidón de las muestras presentaron un comportamiento diferente durante el almacenamiento. La firmeza de los geles AD1 incrementó ($p \leq 0,05$) durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo, la firmeza de los geles AD2 no mostró alteraciones ($p \leq 0,05$), mientras que los geles AD3 y AD4 disminuyeron ($p \leq 0,05$) su firmeza debido al paso del tiempo (Figura 3.12). En relación a la elasticidad de los geles, se registró que los geles AD1 y AD2 no sufrieron modificaciones ($p \leq 0,05$) sobre este parámetro durante el almacenamiento, a diferencia de los geles AD3 y AD4 que mostraron una disminución ($p \leq 0,05$) (Figura 3.12). Otro parámetro de textura determinado fue la masticabilidad, que se traduce como la fuerza requerida durante la masticación para desintegrar la estructura del material. Se observó un aumento ($p \leq 0,05$) de este parámetro durante el periodo de almacenamiento en los geles AD1, mientras que AD2 no acusó alteraciones ($p \leq 0,05$). Sin embargo, la masticabilidad de los geles AD3 y AD4 disminuyó ($p \leq 0,05$) durante el almacenamiento (Figura 3.12). Con estos resultados queda demostrado que el contenido de almidón dañado afecta las propiedades texturales de los geles de almidón, ya que las muestras mostraron un comportamiento diferente a lo largo del tiempo. En general, el incremento en el tiempo de almacenamiento produjo geles menos firmes y elásticos, y con una estructura general más fácilmente desintegrable en las muestras con mayor contenido de almidón dañado (AD3 y AD4).

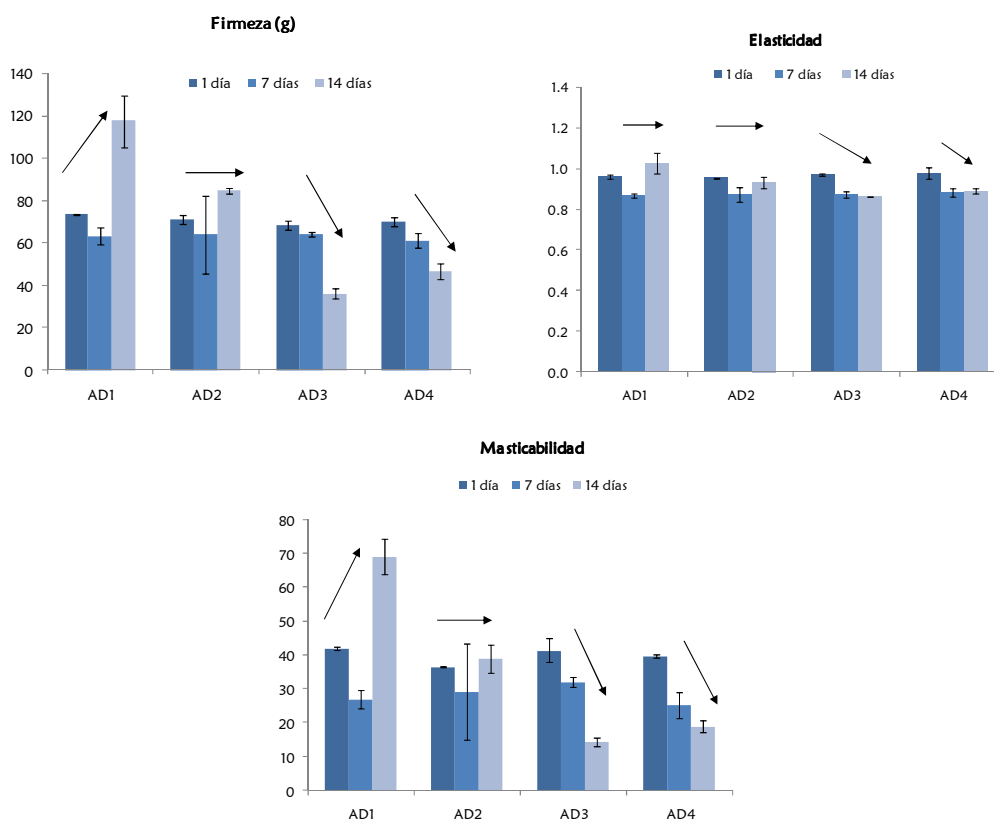


Figura 3.12: Efecto del almacenamiento sobre las propiedades texturales de los geles de almidón.

El incremento en el contenido de almidón dañado no afectó ninguno de los parámetros de textura de los geles de almidón a 1 y 7 días de almacenamiento. Sin embargo, a los 14 días de almacenamiento se observó que el aumento en el porcentaje de almidón dañado derivó en geles de menor firmeza, elasticidad y masticabilidad ($p \leq 0,05$).

Los geles analizados se prepararon a partir de suspensiones de almidón más concentradas que las empleadas para el análisis reológico a pequeñas deformaciones. Por lo tanto, en estos geles los gránulos gelatinizados se encuentran más próximos unos con otros en la estructura, por lo que la fracción de volumen ocupada por los gránulos cobra mayor importancia sobre las propiedades reológicas del sistema. Como consecuencia de esto, la deformación de estos geles más concentrados no sólo depende de la deformación de la red de amilosa entre los gránulos, sino también de la rigidez de los gránulos hinchados inmersos en la red.

El deterioro textural significativo de los geles con mayor contenido de almidón dañado a los 14 días de almacenamiento sugiere un deterioro estructural derivado de la presencia de almidón dañado. Como se ha propuesto anteriormente, es posible que el debilitamiento de la estructura que presentan estos geles esté relacionado con una menor fracción de volumen ocupada por los gránulos gelatinizados inmersos en la red de amilosa y con una red de amilosa más desordenada y menos

estructurada. En términos generales, estos geles parten con una estructura más debilitada, por lo que el tiempo de almacenamiento afectará a estas estructuras de una manera desigual.

Teniendo en cuenta que los geles no deberían diferenciarse fuertemente en la proporción de amilopectina retrogradada a los 14 días de almacenamiento, según los resultados discutidos anteriormente (Tabla 3.11), probablemente las alteraciones en sus propiedades texturales causadas por efecto del almidón dañado registradas a los 14 días estén relacionadas con una alteración en el reordenamiento de las cadenas poliméricas del sistema. Es posible que como resultado de una estructura en la que los gránulos se encuentran más empaquetados los cambios sobre la fase continua no resulten evidentes sino hasta periodos largos de almacenamiento, a diferencia de lo observado en los geles analizados bajo deformaciones oscilatorias. Por lo tanto, es probable que una modificación sobre el reordenamiento de los polímeros promueva a largo plazo una estructura de red más debilitada y por consiguiente menos resistente a las deformaciones. La menor rigidez de los gránulos dañados hinchados en los geles con mayor contenido de almidón dañado también contribuiría a una estructura menos rígida.

11. Capacidad de retención de agua de los geles de almidón

Durante el enfriamiento de una suspensión de almidón gelatinizado, las moléculas de amilosa y amilopectina comienzan a reasociarse, y este proceso es acompañado por un incremento gradual de la rigidez y una separación de fase entre el solvente y la matriz. La separación de las fases en el sistema promueve una disminución de la capacidad de retención de agua de los geles, y este fenómeno es conocido como sinéresis (Biliaderis, 2009). La sinéresis es habitual durante la retrogradación de los geles de la mayoría de los almidones nativos. El fenómeno de liberación de agua de los geles de almidón es habitualmente concebido como un proceso desfavorable, ya que tiende a deteriorar la calidad de los alimentos (Ribotta et al., 2007). Por lo tanto, cualquier condición que favorezca el proceso de retrogradación acelerará drásticamente la sinéresis del sistema, lo que derivará en un deterioro de la calidad.

En general, el agua asociada a polímeros presenta tres categorías según el tipo de interacciones que se establezcan entre ellos: agua libre, la cual se relaciona con la sinéresis, agua intermedia y agua ligada. Este comportamiento diferenciado del agua cuando se encuentra en contacto con una matriz polimérica puede ser atribuido a que ésta queda atrapada entre las cadenas de los polímeros debido a las fuertes interacciones entre grupos polares. En la formación de un gel el agua es necesaria para hidratar las moléculas de almidón y proveer un ambiente fluido en el cual los polímeros del almidón puedan agregarse para formar la estructura. El agua también actúa como plastificante, y por lo tanto afecta la movilidad de las moléculas de almidón. La interacción de los polímeros de almidón con el agua también determina como el agua es retenida dentro del gel, o sea como el agua es inmovilizada por las interacciones puente hidrogeno con los polímeros, o atrapada físicamente dentro la

estructura. Por lo tanto, el agua que se requiere para la formación de un gel en parte controla su estructuración, y además es también responsable de las características reológicas y la estabilidad de los geles (Choi y Kerr, 2003).

Como era de esperar, todos los geles mostraron un aumento ($p \leq 0,05$) del porcentaje de agua liberada durante el almacenamiento (Figura 3.13). El aumento de las interacciones entre los polímeros de almidón causó una disminución de las interacciones almidón-agua, promoviendo una mayor liberación del agua del sistema. Sin embargo, el incremento en el contenido de almidón dañado alteró la capacidad de retención de agua de los geles de almidón durante su almacenamiento. Los geles con mayor contenido de almidón dañado (AD3 y AD4) perdieron menos ($p \leq 0,05$) cantidad de agua luego de las 24 h de almacenamiento (Tabla 3.14). A los 7 días de almacenamiento la tendencia observada fue similar, aunque las diferencias entre los geles fueron menos marcadas, y finalmente luego de 14 días de almacenamiento la pérdida de agua de los cuatro geles fue similar. Estos resultados indican que el efecto del almidón dañado sobre la liberación de agua de los geles resulta menos significativo a lo largo del almacenamiento.

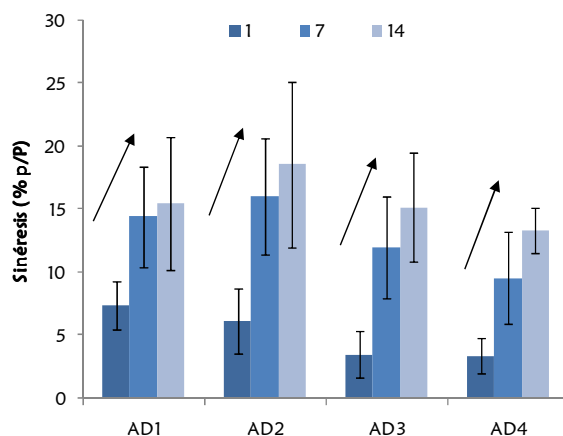


Figura 3.13: Efecto del almacenamiento sobre la sinéresis de los geles.

Tabla 3.14. Efecto del almidón dañado sobre la sinéresis de los geles durante el almacenamiento

Muestras	Sinéresis (%p/p)		
	Día 1	Día 7	Día 14
AD1	7,41 b	14,41 bc	15,49 ab
AD2	6,16 b	16,02 c	18,55 b
AD3	3,53 a	11,99 ab	15,16 a
AD4	3,37 a	9,55 a	13,31 a

Letras diferentes en diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA). Las comparaciones estadísticas se realizaron en función del contenido de almidón dañado

Se calculó el porcentaje de incremento de sinéresis (IS), determinado como el cambio en los valores de pérdida de agua con el almacenamiento en base a los valores iniciales. Se observó que luego de 7 y 14 días de almacenamiento, el incremento de sinéresis de los geles AD2, AD3 y AD4 fue mayor respecto al incremento registrado por la muestra AD1 (Tabla 3.15). Estos resultados indican que los geles con mayor contenido de almidón dañado tendieron a liberar agua más rápidamente durante este periodo de almacenamiento.

Como se ha discutido anteriormente, la presencia de almidón dañado produce geles con estructuras más débiles y con una red de amilosa menos estructurada, lo que se relaciona con una menor capacidad de entrapar agua en su sistema.

La presencia de almidón dañado también está asociada con una mayor proporción de moléculas en suspensión capaz de estructurar y de ligar más el agua, derivadas de la depolimerización y de la desintegración de los gránulos de almidón. Este efecto explicaría lo registrado a las 24 h de almacenamiento, donde la pérdida de agua de los geles con mayor almidón dañado es menor, ya que la firmeza de los geles a las 24 h no acusa diferencia entre los geles.

Tabla 3.15. Efecto del almidón dañado sobre el incremento de sinéresis de los geles durante el almacenamiento.

Muestras	Incremento de Sinéresis (%)	
	ISdía7	ISdía14
AD1	94,7	109,1
AD2	160,1	201,2
AD3	240,0	330,1
AD4	183,5	295,2

IS: Incremento de sinéresis

12. Conclusiones

Las variaciones en el contenido de almidón dañado afectaron la distribución de tamaño granular, ocasionando una mayor heterogeneidad y tamaño de los gránulos.

Se demostró que las suspensiones no calentadas de almidón exhiben un comportamiento de flujo tixotrópico-dilatante. La presencia de almidón dañado en el sistema promovió un aumento en el comportamiento tixotrópico y en el coeficiente de consistencia de estas suspensiones. El comportamiento reológico dependiente del tiempo de las suspensiones de almidón sin calentar resultó afectado, se registró un aumento en el esfuerzo mínimo necesaria para alcanzar el estado de movimiento en los fluidos y en el coeficiente tixotrópico.

En general, los cambios en el perfil reológico de las suspensiones de almidón sin calentar estuvieron relacionados con un aumento del tamaño granular y la lixiviación de α -glucanos como consecuencia del daño granular.

En cuanto a las suspensiones gelatinizadas de almidón, se registró una disminución sobre el perfil de viscosidad con los incrementos en el contenido de almidón dañado, lo que se relacionó con la desintegración de los gránulos gelatinizados causada durante la cocción y el cizallamiento. En este sentido, los gránulos de almidón dañados no contribuyeron al aumento de la viscosidad. Asimismo, las características de las pastas enfriadas determinadas por la fase dispersa y los gránulos inmersos resultaron afectadas.

El nivel de almidón dañado y la cantidad de agua afectaron simultáneamente la entalpía de gelatinización. En general los cambios entálpicos asociados a este proceso disminuyeron con el nivel de almidón dañado.

El modelo de Flory-Huggins sugirió una disminución en la interacción entálpica entre el almidón y el agua, y una disminución en la estabilidad de las mezclas de almidón-agua con el aumento del almidón dañado.

Los aumentos en el almidón dañado disminuyeron el contenido de agua que se relaciona con la máxima cantidad de amilopectina retrogradada y aumentaron significativamente el grado de retrogradación de la amilopectina durante los primeros días de almacenamiento y por lo tanto, la velocidad de cristalización de este polímero.

Como resultado de todo esto, las características reológicas y texturales de los geles de almidón se vieron alteradas por efecto de las variaciones en el contenido de almidón dañado. En este sentido, los geles mostraron una estructura más debilitada, lo que afectó el comportamiento durante el almacenamiento y la sinéresis de los geles.

Capítulo 4

*Efecto del daño mecánico sobre la
microestructura y topografía de la
superficie de los gránulos de almidón*

Materiales y Métodos

1. Muestras

A partir de almidón de trigo sin modificar (S5127 Sigma-Aldrich CAS Number 9005-25-8) (Tabla 4.1) se prepararon cuatro muestras de almidón de trigo con diferente contenido de almidón dañado (Tabla 4.2). Para lograr una mayor ruptura de los gránulos de almidón y así obtener muestras con diferentes porcentajes de almidón dañado, el almidón de trigo sin modificar fue tratado en un molino a disco Whisper Series Bench Top (Rocklabs, Nueva Zelanda) por diferentes tiempos. Durante la molienda del almidón la temperatura se monitoreó, no superando los 40 °C.

Tabla 4.1. Composición del almidón de trigo.

Almidón de trigo (Sigma-Aldrich)	
Amilosa ¹ (%)	31,1±0,89
Humedad ² (%)	10,5±0,25
Proteínas (%)	≤0,2*
Almidón dañado ³ (%)	3,7±0,2

1. Determinado por el kit de ensayo amilosa/amilopectina (Megazyme International, Irlanda)

2. Método 44-19, 44-01; AACC, 2000

3. Método 76-30A; AACC, 2000

*. Especificaciones del producto

Tabla 4.2. Muestras de almidón con diferente contenido de almidón dañado.

Muestra	Almidón dañado ¹ (%)	Humedad ² (%)
AD 1	3,7 a	10,5
AD 2	13,3 b	
AD 3	35,7 c	
AD 4	72,9 d	

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

1. Método 76-30A; AACC, 2000

2. Método 44-19, 44-01; AACC, 2000

2. Difracción de Rayos-X

La difracción de rayos X es una de las herramientas más utilizada para la caracterización de sólidos. Los sólidos cristalinos y semi cristalinos presentan patrones únicos de difracción de rayos X que son utilizados para su identificación. Los rayos X son radiaciones electromagnéticas de una longitud de onda (λ) cercana a 0,1 nm, longitud comparable a los espaciamientos moleculares en un cristal y cercana a la longitud de un átomo. Estas radiaciones se encuentran en la zona del espectro electromagnético entre los rayos gamma y los ultravioleta.

Las características cristalinas se evaluaron mediante un difractómetro de rayos X (X Pert PRO, PANalytical, Holanda). Los patrones de difracción fueron determinados utilizando una radiación de Cu ($\lambda = 0,154$ nm) y un tubo de rayos x (Philips PW3830) a 45 Kv y 40 mA. El barrido de ángulo de difracción (2θ) fue de $2-40^\circ$ a una velocidad de $0,03^\circ/s$. Para identificar la fase cristalina tipo A, tres picos con espaciamiento d de 5,8; 5,2 y 3,8 Å fueron analizados. Mediante deconvolución del difractograma, se cuantificó el área cristalina y amorfa utilizando el software PeakFit v4 (Peakfit, Jandel Scientific, San Rafael, EUA). Los picos correspondientes a la fase cristalina se analizaron con la forma pseudo-Voigt y la fase amorfa con la forma Gaussiana. La cristalinidad relativa se determinó como el cociente entre la intensidad integrada de la fase cristalina y la intensidad integrada de la fase amorfa (Ribotta et al., 2004) (Figura 4.1).



Figura 4.1: Curva característica obtenida por difracción de rayos X. La curva original es deconvolucionada a fin de obtener la fase amorfa y la fase cristalina. La curva de ajuste es integrada, y las áreas son comparadas.

3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para evaluar cualitativamente de daño microestructural causado por la molienda sobre la superficie de los gránulos de almidón se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se montaron sobre un portamuestra y se recubrieron con una fina capa de oro (30 nm espesor) mediante un sistema de recubrimiento por pulverización catódica. Para realizar las observaciones se utilizó un microscopio de barrido electrónico Supra 55 VP (Carl Zeiss Co., Alemania) a un potencial de aceleración de 1 Kv. Las observaciones se realizaron mediante un detector de electrones secundarios "SE" y un detector "In Lens" característico de este microscopio. Las fotografías se tomaron utilizando un software de captura automática de imágenes. Se obtuvieron imágenes con magnificaciones 7000x-48000x.

4. Microscopía ambiental electrónica de barrido (ESEM)

Esta técnica microscópica no requiere de ningún tipo de preparación de muestra, por lo tanto, el análisis de la microestructura de la superficie de los gránulos de almidón pudo realizarse sin los efectos derivados del recubrimiento con oro necesario en la técnica de SEM. Las observaciones se realizaron en un microscopio ambiental electrónico de barrido XL-30 (Philips, EUA) a un potencial de aceleración de 25 Kv. Las observaciones se realizaron mediante un detector de electrones secundarios. Las micrografías se capturaron en 32 bits (RGB) (712 x 484 píxels) se almacenaron en formato TIFF. Se obtuvieron imágenes diferentes magnificaciones. Se obtuvieron imágenes con magnificaciones de 1500x-10000x.

En esta técnica, el brillo y el contraste son variables importantes que deben ser controladas durante la adquisición de las imágenes; por lo tanto, los valores de estos parámetros se mantuvieron constantes en todas las muestras al momento de la adquisición de las imágenes. Esta condición permitió que el análisis de textura de imágenes y la cuantificación de las diferencias microestructurales entre las muestras pudiera ser efectuado correctamente.

5. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La topografía de la superficie de los gránulos de almidón a micro y nano escala se determinó a partir de microscopía de fuerza atómica (AFM). Las observaciones se realizaron en un microscopio de fuerza atómica di-Multimode V conectado a un microcontrolador di-Nanoscope V (Veeco, EUA).

Para llevar adelante esta determinación se escanearon pequeñas secciones de los gránulos con puntas de nitruro de silicio (MPP-11100-10 model, Bruker, EUA) con una frecuencia de resonancia entre 300-400 kHz y una constante de resorte entre 20-80 Nm⁻¹. Entre siete y nueve gránulos de almidón diferentes de cada tratamiento se escanearon usando el modo “*tapping*” o intermitente a una velocidad de escaneo de 1 Hz. Este modo es el más utilizado en campos de la ciencia de alimentos y biología, ya que reduce significativamente la fuerza que ejerce la punta sobre la muestra, y en consecuencia el daño que pudiera generarse (Yan et al., 2007).

A partir del software NanoScope v 7.30 (Veeco, EUA), se obtuvieron los gráficos topográficos 3D y 2D, los cambios de altura en la topografía de las imágenes y las imágenes de amplitud de error de la superficie de los gránulos. Luego de un estudio preliminar, se determinó que los campos de observación (FOVs) entre 15 μm x 15 μm a 0,25 μm x 0,25 μm fueron los más adecuados para el análisis ya que permitieron observar los detalles con mayor claridad sin ruido de la imagen.

Todas las imágenes se recogieron en color RGB tamaño 512x512 píxeles (formato TIFF). Todos los análisis se realizaron en aire a temperatura ambiente. Con el propósito de comparar la información numérica, la escala de altura fue la misma en las imágenes comparadas.

La microscopía de fuerza atómica proporciona parámetros cuantitativos de altura (R) los cuales son descriptores de la rugosidad de la superficie. La rugosidad media (Ra) y la raíz cuadrada de

la rugosidad media (R_q) son calculadas a partir de las imágenes topográficas de AFM. Los parámetros R_a y R_q describen el promedio aritmético de los valores absolutos de las desviaciones de altura de la superficie determinada a partir del plano medio, y la raíz cuadrada de la desviación de altura media del perfil medido. La rugosidad media (R_a) es el perfil medio absoluto, sin hacer distinción entre picos y valles, sin embargo, la raíz cuadrada de la rugosidad media (R_q) es más sensible a los picos y valles que la rugosidad media. Ambos parámetros de altura (R) se midieron a partir de imágenes topográficas escaneadas a $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$.

6. Análisis de textura de las imágenes de microscopía

Las técnicas de procesamiento de imágenes se han desarrollado con el fin de caracterizar cuantitativamente las superficies debido a que en general las técnicas microscópicas proveen únicamente información a nivel cualitativo con respecto a las microestructuras. La textura de las imágenes es una característica que es representada por la disposición espacial de los niveles de gris de los píxeles de la imagen (Jackman y Sun, 2013; Du y Sun, 2004). En función de esto, las imágenes pueden ser analizadas mediante técnicas de procesamiento de imágenes, y las características físicas (tamaño y morfología) y las propiedades de textura (rugosidad y heterogeneidad) pueden ser determinadas (Arzate-Vázquez et al., 2012; Perea-Flores et al., 2012; Pérez et al., 2009). A partir del análisis de imágenes, descriptores como la dimensión fractal, que proporciona un parámetro numérico de la morfología y textura de los objetos con estructuras complejas e irregulares, y parámetros de textura han sido utilizados con el propósito de explicar los cambios en la estructura de los materiales alimenticios durante o como consecuencia de su procesamiento (Pérez-Nieto et al., 2010; Quevedo et al., 2010; Kerdpiboon y Devahastin, 2007).

La geometría fractal ha sido utilizada como herramienta en el estudio de diversos elementos provenientes de la naturaleza debido a que la presencia de formas geométricas no regulares es lo que comúnmente se observa en este contexto. En los últimos años, la aplicación de esta herramienta matemática ha contribuido en la descripción y comprensión de fenómenos que tienen lugar en diferentes áreas tales como la física, las ciencias médicas y biológicas, ingeniería, informática, ciencias de los materiales, así como en la climatología, geografía, cartografía y la ciencia de los alimentos (Santa cruz-Vázquez et al., 2007).

Los descriptores fractales han sido utilizados como parámetros eficientes para evaluar la morfología irregular y la rugosidad de los objetos y superficies (Gumeta et al., 2011; Arzate-Vázquez et al., 2011; Pérez Nieto, 2010; Kerdpiboon y Devahastin, 2007; Quevedo et al., 2002, 2008, 2010). Por esta razón, la dimensión fractal de perímetro (DFp) y la dimensión fractal de superficie (DFs), como así también, descriptores texturales como la entropía y homogeneidad, fueron seleccionados para evaluar cuantitativamente el efecto de la molienda sobre la microestructura superficial de los gránulos de almidón.

Las imágenes obtenidas a partir de ESEM y AFM se procesaron y analizaron mediante el programa Image J v 1.45s (National Institutes Health, EUA) para obtener los parámetros de textura.

6.1 Análisis de las imágenes de microscopía ambiental electrónica de barrido (ESEM)

Para analizar las imágenes en 2D provenientes de ESEM se realizó una selección de una fracción de la imagen de interés (gránulos individuales), una conversión de las imágenes de color RGB (32 bits) a escala de grises (8 bits), una segmentación y, finalmente una binarización a través del umbral en el nivel de gris. Para determinar la dimensión fractal de perímetro (DFp), se utilizó la función “Contorno” de Image J en cada gránulo de almidón aislado. Esta operación elimina todos los píxeles negros excepto los que forman el borde de los gránulos (Figura 4.2). A partir de las imágenes del perímetro de los gránulos se calculó la dimensión fractal de perímetro (DFp) de los gránulos de almidón a través del método estándar de conteo de cajas mediante el *plugin* Fraclac v2.5e (Image J v 1.45s) (Karperien et al., 2005) (Figura 4.3). Los valores de DFp describen la complejidad o la rugosidad del contorno de la superficie de los gránulos de almidón. Por lo tanto, valores grandes de DFp se traducen en gránulos con márgenes más irregulares (Papagianni, 2006; Kenkel y Walker, 1996).

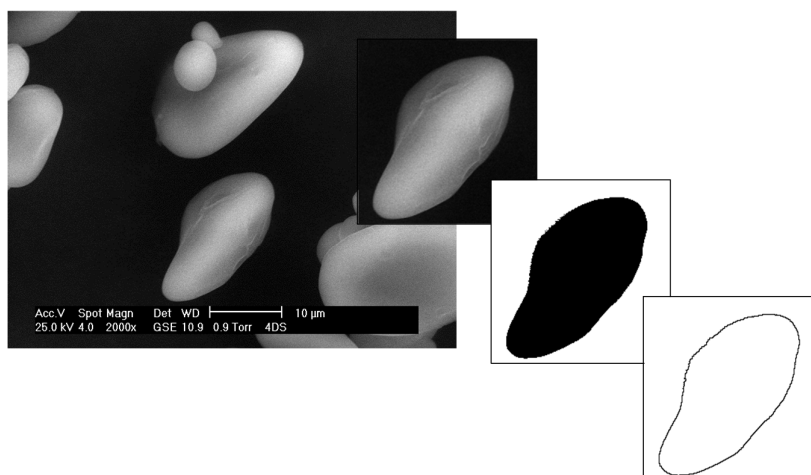


Figura 4.2: Fotografía ESEM de los gránulos de almidón, mostrando la selección de un gránulo, el gránulo seleccionado transformado en imagen binarizada y el perímetro del gránulo.

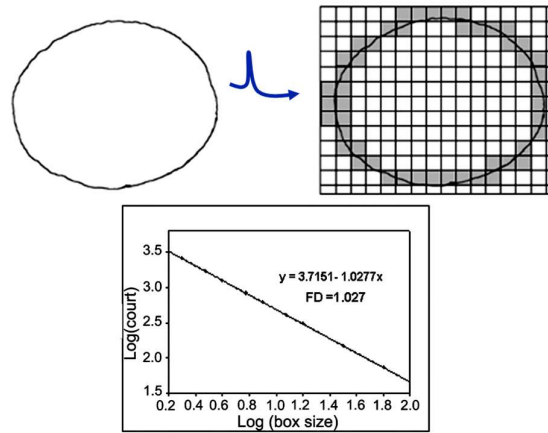


Figura 4.3: Determinación de la dimensión fractal de perímetro (DFp) del contorno de la imagen de un gránulo mediante el método estándar de conteo de cajas.

6.2 Análisis de las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para analizar las imágenes provenientes de AFM se realizó una conversión de las imágenes a color RGB (32 bits) a escala de grises (8 bits). A las imágenes obtenidas se les aplicó los algoritmos de Matriz de Co-Ocurrencia en escala de grises (GLCM por sus siglas en inglés, *Gray Level Co-Occurrence Matrix*) y de Conteo de cajas diferencial (SDBC por sus siglas en inglés, *Shifting Differential Box Counting*) para obtener los parámetros texturales (Wen-Shiung et al., 2003; Haralick et al., 1973). A partir de esto, se obtuvo la dimensión fractal superficial (DFs), mediante el algoritmo SDBC, y la homogeneidad (H) y entropía (E), a partir del algoritmo GLCM. La metodología del procesamiento de imágenes se llevó a cabo usando el programa Image J v 1.45s.

La Matriz de Co-Ocurrencia en escala de grises (GLCM) es un algoritmo estadístico de segundo orden que compara dos píxeles vecinos a un determinado tiempo y compila la frecuencia a la cual diferentes niveles de grises pueden ser encontrados dentro de un área restringida (Gosselin et al., 2008). Por otro lado, el algoritmo de Conteo de cajas diferencial (SDBC) se basa en un gráfico de superficie de intensidad, el cual es generado a partir de imágenes en escala de grises, graficando las coordenadas de los píxeles (x,y) y su respectivo nivel de gris en el eje z (Quevedo et al., 2008; Weng-Shiung et al., 2003).

La homogeneidad (H) es un parámetro textural que representa la invariancia local de los píxeles en el campo de visión, por lo tanto, valores altos de H pueden ser asociados a imágenes monótonas u homogéneas. La entropía (E) es otro parámetro textural, y a diferencia de la homogeneidad mide el desorden o aleatoriedad de las imágenes, es un indicativo de la complejidad dentro de un campo de visión, por lo tanto, imágenes más complejas están asociadas con valores de entropía más altos (Mendoza et al, 2007; Haralick et al, 1973).

7. Análisis estadístico

En todos los casos las determinaciones experimentales se realizaron al menos por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina) (Di Rienzo et al., 2011). Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA).

Los resultados fueron comparados por el método de la mínima diferencia significativa test de Fisher's (LSD), con un nivel de significancia de 0,05 (Di Rienzo et al., 2002).

Resultados y Discusión

La integridad granular de los gránulos de almidón es afectada por acción mecánica durante la molienda de los granos de trigo en la obtención de harinas. El nivel de daño de los gránulos de almidón depende de la textura de los granos de trigo y de la técnica y condiciones de molienda (Hoseney, 1994d).

La superficie externa de los gránulos de almidón es la primera barrera ante procesos como la hidratación y el ataque enzimático. Por lo tanto, las alteraciones ocasionadas sobre esta barrera superficial afectan el comportamiento reológico y las propiedades funcionales de los sistemas de almidón. Por esta razón, la naturaleza de la superficie granular y sus modificaciones tienen efectos significativos sobre las propiedades del almidón (Pérez et al., 2009).

Los análisis cualitativos realizados han demostrado que varios carbohidratos y especies lipídicas forman parte de la composición elemental de la región externa (1–2 nm de profundidad) de los gránulos nativos de almidón de trigo, entre otros. Estudios cuantitativos complementarios han demostrado que la capa superficial (5–10 nm de profundidad) del 90% de los gránulos de almidón de cereales está compuesta principalmente por hidratos de carbono, aunque también se ha informado que un 5% de la superficie granular está compuesta por proteínas, además de que pueden tener hasta un 5% de lípidos (Pérez et al., 2009).

La superficie de los gránulos está compuesta principalmente por moléculas de amilopectina, las cuales presentan características estructurales y propiedades funcionales que difieren de la amilopectina interna (Atkin et al., 1998). Los conglomerados (*clusters*) de amilopectina de la superficie se agrupan dando un aspecto de nódulos elevados (*blocklets*) sobre la superficie de los gránulos de almidón y se ha sugerido que su tamaño contribuye a la resistencia que presentan los gránulos de almidón debido a los niveles locales de estructura cristalina (Pérez et al., 2009).

La morfología y la topografía de superficie es una importante característica física de los productos sólidos y tiene impacto no sólo en las propiedades sensoriales de un producto final, sino también, en su comportamiento durante la elaboración, almacenamiento y uso (Aguilera, 2000). La caracterización del estado, naturaleza y estructura de la superficie de los gránulos de almidón ha sido algo limitada, sin embargo, en los últimos años se ha realizado un progreso sustancial en lo que a esto respecta mediante el análisis de imágenes realizado por microscopía electrónica. Mediante este tipo de metodología se han logrado importantes avances en lo que concierne a la arquitectura de la superficie granular (Pérez et al., 2009).

Hasta el momento no se ha establecido claramente el efecto que causa el daño físico sobre las características de la superficie granular. No obstante, Hoseney (1994d) se refirió a los gránulos de almidón dañado como gránulos de almidón partidos. En este sentido, Sluimer (2005a) describió a los gránulos de almidón dañado como gránulos rotos, partidos, agrietados o deformados como consecuencia de las fuerzas aplicadas durante la molienda.

A lo largo de este capítulo se describirán las consecuencias que ocasiona el daño mecánico sobre la integridad estructural de la superficie de los gránulos de almidón. Con el propósito de identificar el efecto que produce el daño mecánico sobre la microestructura y la topografía de la superficie de los gránulos de almidón, se emplearon cuatro muestras de almidón de trigo, obtenidas bajo las mismas condiciones pero a diferentes tiempos de molienda. Las muestras fueron AD1 con 3,7% (almidón nativo), AD2 con 13,3%; AD3 con 35,7% y AD4 con 72,9% de almidón dañado; según se ha descrito en materiales y métodos.

1. Cristalinidad

Los gránulos de almidón están formados por dos polisacáridos, amilosa y amilopectina, y debido al arreglo estructural de ambas moléculas, los gránulos de almidón nativos presentan características de un sólido semicristalino. La amilosa y la amilopectina están dispuestas con sus ejes longitudinales de manera perpendicular a la superficie del gránulo, lo que da origen a la estructura en forma de anillos concéntricos o capas propia de los gránulos de almidón. En este arreglo molecular se pueden distinguir dos tipo de capas, cristalinas y amorfas, las cuales se disponen de manera alternada. Las láminas cristalinas están compuestas principalmente de amilopectina, específicamente por las dobles hélices de las cadenas laterales de amilopectina, y en esta matriz algunas moléculas de amilosa se encuentran dispersas. Las láminas amorfas se originan en los puntos de ramificación de la amilopectina y están constituidas especialmente por amilosa, las cuales se acomodan entre las ramificaciones de la amilopectina formando doble hélices. El arreglo radial de la amilopectina es la base de esta estructura, y son las cadenas cortas de amilopectina, las que en definitiva, determinan el nivel de cristalinidad de los gránulos de almidón (Pérez et al., 2009).

Los patrones de difracción de las cuatro muestras de almidón se correspondieron con el patrón de difracción tipo A relacionado a los almidones de cereales (Figura 4.4). Los principales picos del patrón de difracción tipo A (2θ) son a los 15° y 23° , además de un doblete a los 17° y 18° aproximadamente. La forma en la que las dobles hélices de las moléculas de amilopectina están empaquetadas y organizadas en el gránulo de almidón determina el tipo de polimorfo cristalino, por lo tanto, debido a que en la fase cristalina del almidón de trigo las dobles hélices están densamente empaquetadas en una red del tipo monocíclica, este almidón presenta un patrón de difracción tipo A. La longitud de las cadenas de amilopectina es un factor determinante en los polimorfos cristalinos, por lo tanto, el tipo de patrón de difracción también dependerá de la longitud promedio de sus cadenas de amilopectina. Debido a que estas presentan en promedio una longitud de cadena corta, el almidón de trigo exhibe un patrón de difracción tipo A (Maningat et al., 2009).

Las intensidades de los picos en los difractogramas disminuyeron con el nivel de almidón dañado (Figura 4.1). Estos resultados indican la pérdida del orden estructural de los gránulos de almidón. En acuerdo con estos resultados se ha demostrado que la cristalinidad medida por difracción

de rayos-X, calorimetría diferencial de barrido y resonancia magnética nuclear del estado sólido depende de la severidad de las condiciones de molienda y el tiempo de molienda (Biladieris, 2009).

El grado de cristalinidad total del almidón, determinado a partir de la separación e integración de las áreas bajo los picos amorfos y cristalinos, disminuyó con el incremento del contenido de almidón dañado. El grado de cristalinidad total para la muestra AD1 (almidón nativo) fue de 39,3%; y este valor se redujo a 35,4 %, 31,2% y 12,7% para las muestras AD2, AD3 y AD4, respectivamente, lo que indica que el gránulo dañado pierde cristalinidad por la acción mecánica. Morrison et al. (1994) registraron un comportamiento similar y sugirieron que el daño mecánico de los gránulos de almidón causa una progresiva pérdida del orden. Estos autores observaron que la cristalinidad determinada mediante difracción de rayos-x y el contenido de doble hélice de la amilopectina disminuye con el incremento en el contenido de almidón dañado, y a partir de esto propusieron que un nuevo material amorfo se origina a partir del daño mecánico, el cual debería distinguirse del almidón amorfo de los gránulos de almidón nativos.

La pérdida de la cristalinidad de los gránulos de almidón observada se condice con la disminución en los valores de entalpía de gelatinización descritos en los capítulos anteriores. La entalpía de gelatinización de los gránulos de almidón involucra diferentes eventos termodinámicos, hinchamiento de los gránulos y fusión de cristales (procesos endotérmicos) e hidratación y reordenamiento de las cadenas poliméricas (procesos exotérmicos) (Biladieris, 2009).

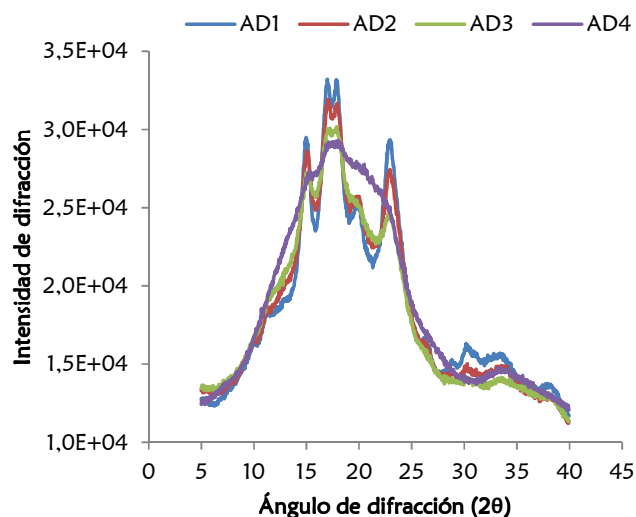


Figura 4.4: Efecto del daño mecánico sobre la cristalinidad del almidón.

2. Microscopía de barrido electrónico

La microscopía de barrido electrónico (SEM) ha sido y es en la actualidad una herramienta muy utilizada para estudiar las características estructurales y la arquitectura de los gránulos de almidón.

Esta técnica microscópica ha demostrado ser muy valiosa a la hora de estudiar la superficie de los gránulos de almidón y su estructura interna, a pesar de que la adquisición de las imágenes involucra alto vacío y técnicas de preparación de muestra que tienden a dañar o alterar la estructura de los gránulos (Pérez et al., 2009). La microscopía de barrido electrónico ambiental (ESEM) es una variante de la microscopía de barrido electrónico convencional que trabaja con vacío moderado y proporciona la opción de trabajar con las muestras húmedas y sin recubrimiento, lo que minimiza la alteración de la estructura de las muestras analizadas.

Una desventaja de las técnicas SEM y ESEM es que el análisis morfológico obtenido de las imágenes es únicamente de carácter cualitativo. A pesar de esto, mediante las imágenes obtenidas es posible extraer información cuantitativa mediante técnicas de procesamiento de imágenes. Con este procedimiento es posible obtener información respecto a las características físicas (tamaño y morfología) y a las propiedades texturales (rugosidad y heterogeneidad) (Arzate-Vázquez et al., 2012; Perea-Flores et al., 2012; Pérez et al., 2009). Los descriptores como la dimensión fractal (DF) y otros parámetros texturales proveen información cuantitativa sobre la morfología y textura de los objetos con estructuras complejas e irregulares. De este modo, cuando las técnicas de microscopía y el análisis de imágenes se utilizan juntos, se convierten en una herramienta aún más poderosa para evaluar la microestructura.

Las imágenes de SEM mostraron la presencia de gránulos de almidón grandes y lenticulares y pequeños y esféricos, los que se corresponden con los gránulos tipo-A y tipo-B, respectivamente. En las imágenes de la muestra de almidón nativo (AD1) se pudo observar que la superficie de los gránulos de almidón fue lisa y plana, aunque se detectaron algunos relieves o marcas las cuales se asociaron con puntos donde los gránulos pudieron haber estado en estrecho contacto con otro (Tester et al., 1994) (Figura 4.5). Sin embargo, en las imágenes de las muestras AD2, AD3 y AD4, se observó que la superficie de los gránulos pasó de tener aspecto liso y pulido a áspero y de apariencia escamosa, como consecuencia del proceso de molienda (Figura 4.5). En acuerdo con estas observaciones, Tester et al. (1994) informaron que como consecuencia de la molienda las superficies granulares se volvieron distorsionadas, ásperas y con numerosos cúmulos, y en este sentido, observaron pocos gránulos intactos luego de este proceso. Es importante destacar que los efectos observados sobre los gránulos tipo A y B fueron similares, no se registraron diferencias aparentes entre ambos tamaños como consecuencia de la molienda.

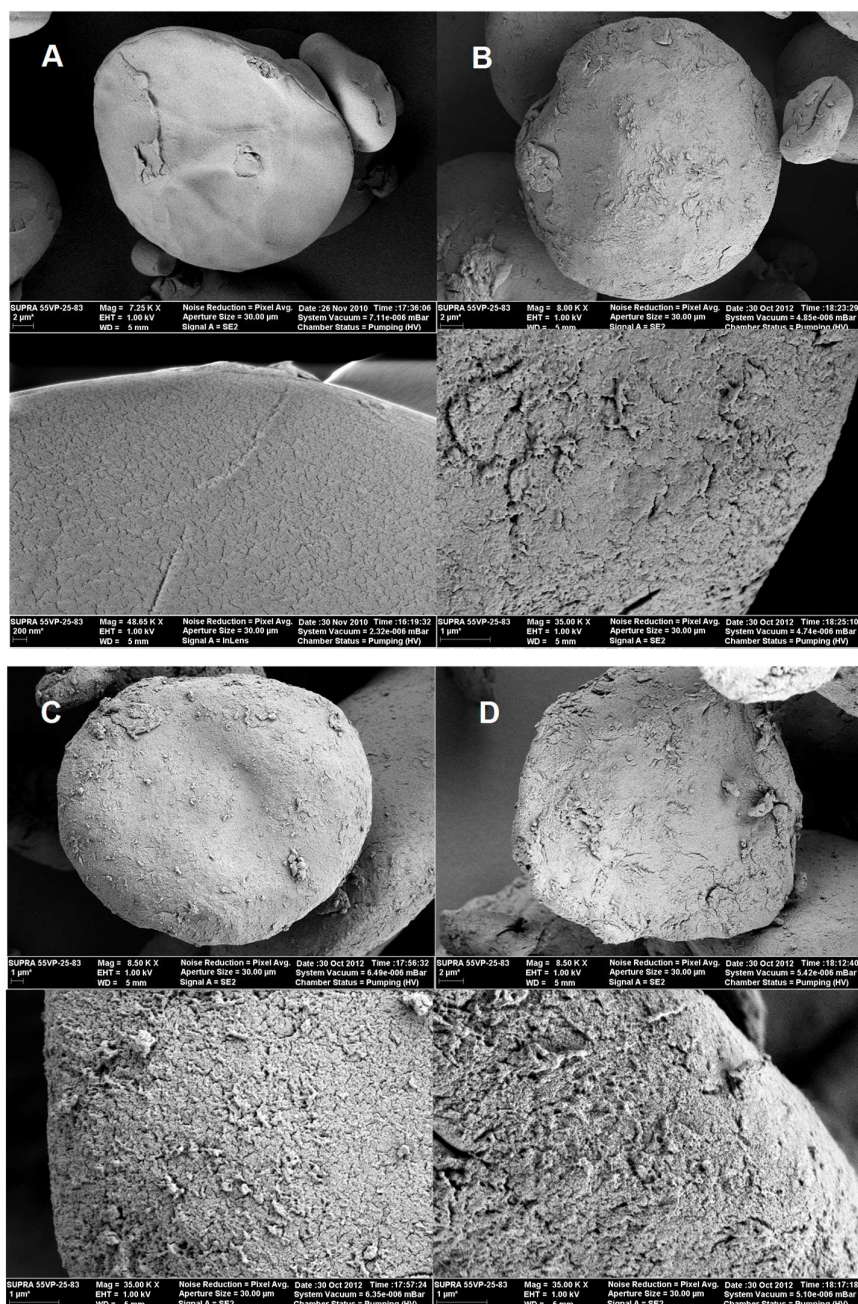


Figura 4.5: Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM). A: AD1, B: AD2, C: AD3 y D: AD4.

Al igual que con las imágenes de SEM, mediante las imágenes de ESEM se logró distinguir los diferentes tipos de gránulos (tipo A y B) en todas las muestras y las propiedades superficiales similares a lo observado a partir de SEM (Figura 4.6). Asimismo, las imágenes de mayor magnificación (Figura 4.7) mostraron que los gránulos afectados por la molienda se tornaron más distorsionados, menos uniformes e irregulares.

A partir del tratamiento y análisis de las imágenes digitales obtenidas por ESEM se extrajo información cuantitativa respecto al grado de irregularidad del contorno de los gránulos de almidón

mediante la determinación del parámetro de dimensión fractal de perímetro (DFp). El incremento en el contenido de almidón dañado afectó los valores de DFp calculados para los gránulos de almidón de cada muestra. Como consecuencia del daño mecánico se registró un incremento de este parámetro, lo que se relaciona con un incremento en la irregularidad de los contornos granulares y con superficies granulares más complejas (Perez-Nieto et al., 2010; Kerdpi boon y Devahastin, 2007) (Tabla 4.3).

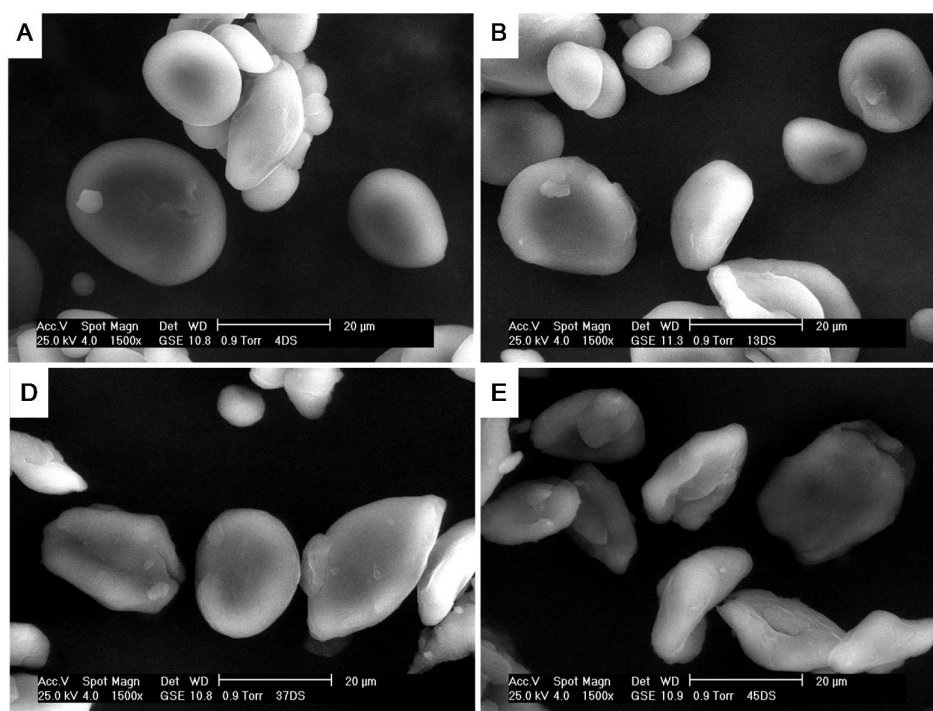


Figura 4.6: Micrografías de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). A: AD1, B: AD2, C: AD3 y D: AD4.

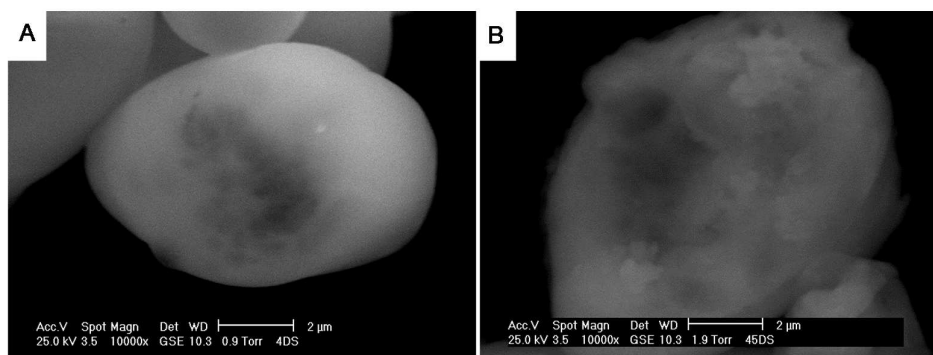


Figura 4.7: Micrografías de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). A: AD1 y B: AD4.

Tabla 4.3: Parámetro textural de los gránulos de almidón.

Muestras	Parámetro textural
	DFp
AD1	1,02 a
AD2	1,02 a
AD3	1,03 b
AD4	1,04 b

DFp: Dimensión fractal de perímetro. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Las observaciones y los resultados obtenidos demuestran que los fenómenos de fricción y erosión de la superficie granular generados durante el procedimiento mecánico de molienda producen la deformación de los gránulos de almidón. En las muestras evaluadas no se observaron gránulos quebrados o partidos, lo que sugiere que los gránulos sufren un proceso de desgaste o erosión de la superficie como resultado de las fuerzas de cizalla aplicadas durante la molienda. Tester (2006) y Stark y Lynn (1992) para justificar sus observaciones propusieron que el daño mecánico causado por la molienda produce el desgaste o la abrasión de la superficie granular, lo que queda confirmado a partir de los resultados obtenidos.

3. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una de las técnicas más novedosas en lo que respecta a la adquisición de imágenes relacionadas con estudios de superficie (Pérez et al., 2009; Kirby et al., 1995). Su gran ventaja sobre otros métodos es la posibilidad del uso de materiales biológicos sin procesar y sin la presencia de ninguna interferencia en la microestructura de la superficie (Juszczak et al., 2003). A diferencia de la técnica SEM, mediante AFM es posible obtener una imagen tridimensional de la topología de la superficie del material y alcanzar resoluciones moleculares o incluso atómicas. En general, las resoluciones verticales se encuentran en la región de 1-2 Å (0,1 hasta 0,2 nm) y las resoluciones laterales en la zona de 10 Å (1 nm) o menos. Por lo tanto, dicha resolución acoplada con la necesidad mínima de preparación de la muestra ofrece una muy buena alternativa para el estudio de los gránulos de almidón (Pérez et al., 2009).

La técnica AFM ha tenido limitadas aplicaciones en esta área, no obstante, ha demostrado ser una exitosa herramienta en la investigación de almidón, ya que permitió revelar importantes y novedosos conocimientos sobre la estructura de los gránulos de almidón y su organización molecular. Uno de los hallazgos más importantes sobre la superficie granular ha sido la identificación de los denominados *blocklets*, que son protuberancias superficiales que se repiten sobre la superficie de los gránulos de almidón y que poseen entre 50 y 450 nm de diámetro (Pérez et al., 2009).

Las imágenes de AFM de los gránulos de la muestra AD1 fueron similares a las reportadas por otros autores (Szymońska et al., 2003; Krok et al., 2000), y al igual que lo demostrado por microscopía electrónica, se pudo observar que las superficies de los gránulos de almidón nativo fueron lisas y pulidas, y se observaron algunas marcas sobre la superficie granular relacionadas con los sitios de estrecho contacto entre los gránulos (Figura 4.8 A). Las imágenes AFM de las muestras AD2, AD3 y AD4 (Figura 4.8 B-D) demostraron que sus superficies se volvieron más distorsionadas, menos uniformes, irregulares y con numerosas depresiones de diferente forma y tamaño como consecuencia del daño mecánico causado por la molienda. Al igual que lo observado en las imágenes SEM, los efectos causados por la molienda sobre los gránulos tipo A y B fueron comparables.

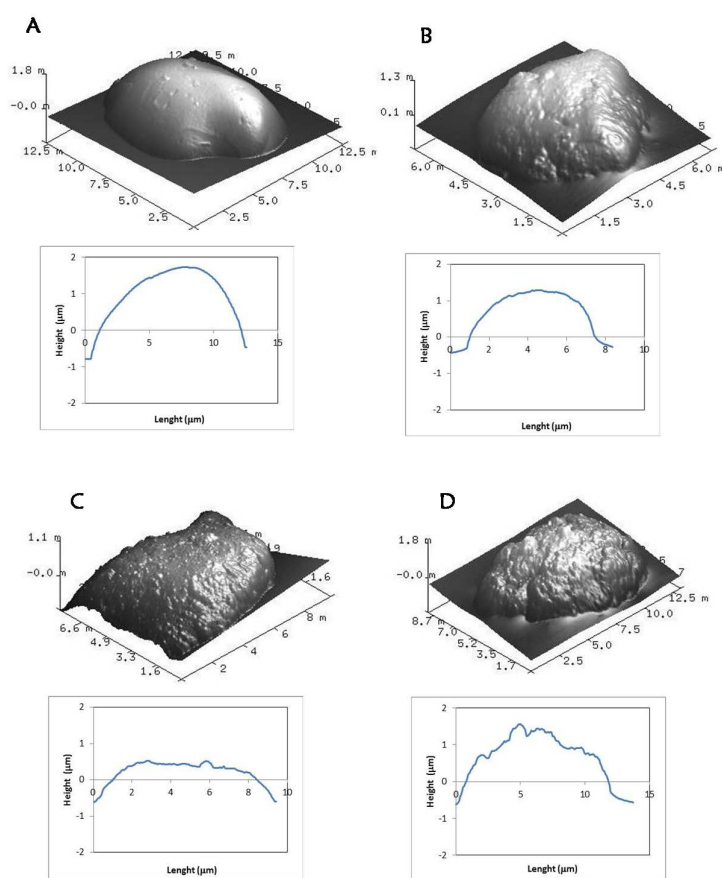


Figura 4.8: Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM) en 3D y sección de las superficies de los gránulos de almidón. A: AD1, B: AD2, C: AD3 y D: AD4. La escala de las imágenes es en nanómetros (nm).

El perfil de altura (análisis de sección) de las superficies de los gránulos confirmó la dimensión de las irregularidades superficiales, las cuales aumentan gradualmente con el nivel de almidón dañado (Figura 4.9). Los parámetros de rugosidad, R_a y R_q se estimaron a partir de imágenes topográficas escaneadas de $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$, ya que estas superficies de exploración fueron las regiones más

grandes que resultaron sin interferencia de fondo. Las muestras AD2, AD3, y AD4 presentaron valores más altos ($p \leq 0,05$) de los parámetros Ra y Rq, respecto a lo encontrado para la muestra AD1 (Tabla 4.4). Esto demuestra que las superficies granulares se tornan más rugosas con el aumento del tiempo de molienda y consecuente incremento en el contenido de almidón dañado en el sistema. No se han informado valores de Ra y Rq para almidones de cereales, por lo que no es posible comparar los valores registrados con datos bibliográficos.

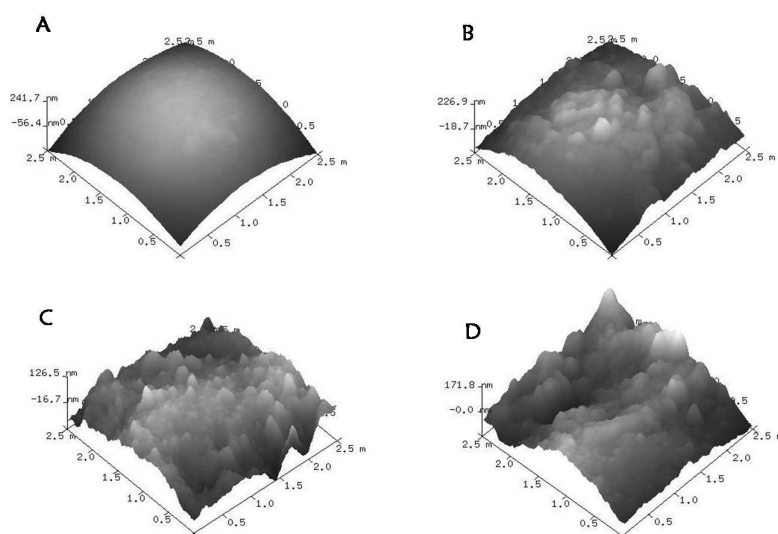


Figura 4.9: Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM) en 3D ($2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$) de los gránulos de almidón. A: AD1, B: AD2, C: AD3 y D: AD4. La escala de las imágenes es en nanómetros (nm).

A partir del tratamiento y análisis de las imágenes digitales obtenidas por microscopía de fuerza atómica se estimaron parámetros texturales como: el grado de irregularidad de la superficie de los gránulos de almidón, mediante la determinación del parámetro de dimensión fractal superficial (DFs); la homogeneidad (H), que representa la homogeneidad local y mide la uniformidad textural de la imagen; y la entropía (E), que evalúa el desorden o aleatoriedad de las imágenes y es un indicativo de la complejidad de la imagen (Mendoza et al., 2007; Fernández et al., 2005; Haralick et al., 1973). Los parámetros texturales se valoraron a partir de imágenes topográficas de las superficies de los gránulos de almidón escaneadas a $2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$.

Los gránulos dañados (AD2, AD3 y AD4) presentaron mayores valores de entropía (E) y menores valores de homogeneidad (H) ($p \leq 0,05$), respecto a la muestra AD1 (Tabla 4.4). Ambos parámetros indican que la molienda causó una disminución de la uniformidad y un aumento de la complejidad de las superficies. La dimensión fractal de superficie (DFs) incrementó con el contenido de almidón dañado ($p \leq 0,05$), por lo tanto, los gránulos dañados presentaron un mayor grado de irregularidad superficial respecto a los gránulos nativos. Una imagen con una textura suave o uniforme

presenta poca o ninguna variación en el brillo, mientras que una imagen que presenta una textura áspera o heterogénea muestra una alta variación en la escala de grises. Los valores de DFs cercanos a 2 están asociados a superficies suaves, mientras que, los valores cercanos a 3 están relacionados con un alto grado de rugosidad de las superficies (Arzate-Vázquez et al., 2012; Quevedo et al., 2008). Las alteraciones sobre las características texturales estimadas para las muestras de almidón se traducen en un aumento de la complejidad estructural de las superficies granulares como consecuencia del daño mecánico durante la molienda.

Las muestras con mayor contenido de almidón dañados mostraron superficies granulares más complejas y menos uniformes a nivel cualitativo y cuantitativo, comparado con la superficie lisa y plana de la muestra de almidón nativo. Teniendo en cuenta estos resultados, es posible concluir que la erosión causada como consecuencia del proceso de molienda es la responsable de los cambios registrados sobre la microestructura de la superficie de gránulos dañados de almidón.

Tabla 4.4. Parámetros texturales de los gránulos de almidón.

Parámetros texturales	AD1	AD2	AD3	AD4
Rq	14,2 a	36,5 b	44,9 b	58,2 c
Ra	11,3 a	28,9 b	34,9 b	46,5 c
H	0,72 b	0,68 ab	0,59 a	0,59 a
E	5,9 a	6,2 ab	6,4 b	6,4 b
DFs	2,05 a	2,07 a	2,10 b	2,13 b

Ra y Rq: Parámetros de rugosidad de superficie calculados de las imágenes AFM de $2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$. H: Homogeneidad, E: Entropía, DFs: Dimensión fractal de superficie determinados a partir de las imágenes AFM de $2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$ mediante análisis de textura de imágenes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Para profundizar respecto a los efectos que causa el daño mecánico sobre la estructura de la superficie granular se analizaron imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica a un mayor nivel de magnificación, $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$ (Figura 4.10). Las imágenes topográficas de las superficies de los gránulos de almidón nativos (AD1) mostraron una apariencia textural con protuberancias semiesféricas, y se observaron numerosos nódulos de 40 a 100 nm de diámetro elevados sobre la superficie (Figura 4.11). En estas imágenes se observaron ondulaciones, es decir estructuras con el aspecto de granos y numerosos nódulos elevados. En el caso de la muestra de almidón nativo, otros autores han informado resultados similares respecto a las características texturales (Ohtani et al., 2000; Baldwin et al., 1998). Baldwin et al. (1998) indicaron que las superficies de los gránulos de almidón de trigo presentaron protuberancias formadas por estructuras de 10-50 nm y otras estructuras de mayor tamaño, entre los 50 a 300 nm de diámetro. En relación a esto, Juszcak et al. (2003) examinaron mediante AFM la superficie de los gránulos de almidón de diferentes cereales e informaron la presencia de estructuras sobresalientes de la superficie granular de tamaño inferior a

200 nm. Estas estructuras han sido designadas con el nombre de *blocklets*. Estos se definieron como fragmentos terminales de los conglomerados de amilopectina, y dependiendo del origen botánico del almidón, su estructura semiesférica puede medir entre 20-500 nm de diámetro (Gallant et al., 1997) (Figura 4.12). Los almidones que presentan polimorfismo A, como el almidón de trigo, poseen *blocklets* de 20-100 nm de diámetro (Pérez et al., 2009).

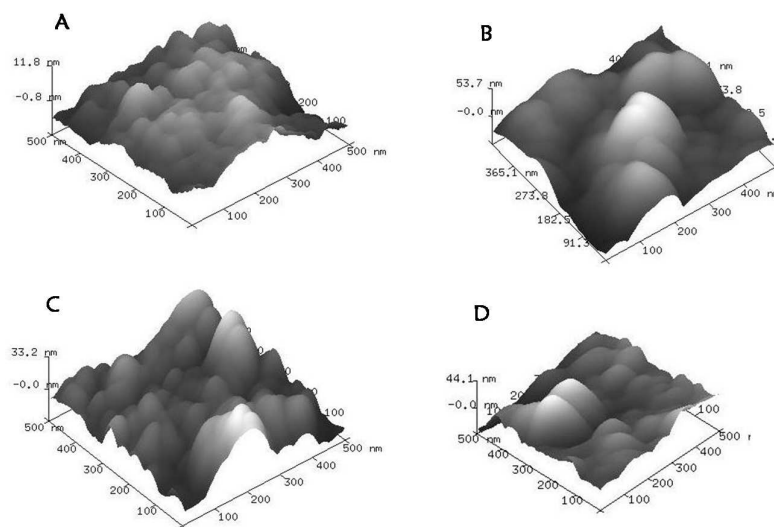


Figura 4.10: Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM) en 3D de alta resolución (500 nm x 500 nm) de los gránulos de almidón. A: AD1, B: AD2, C: AD3 y D: AD4. La escala de las imágenes es en nanómetros (nm).

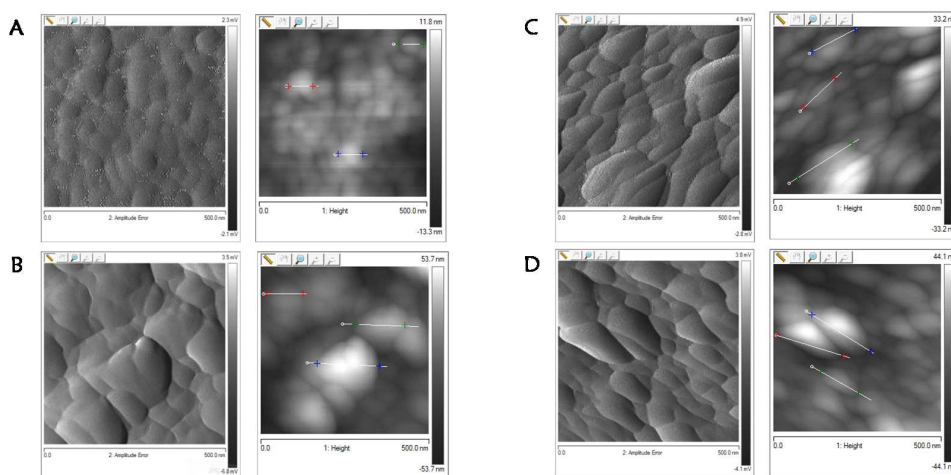


Figura 4.11: Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM) de alta resolución (500 nm x 500 nm). Sección de las superficies de los gránulos de almidón. A: AD1, B: AD2, C: AD3 y D: AD4.

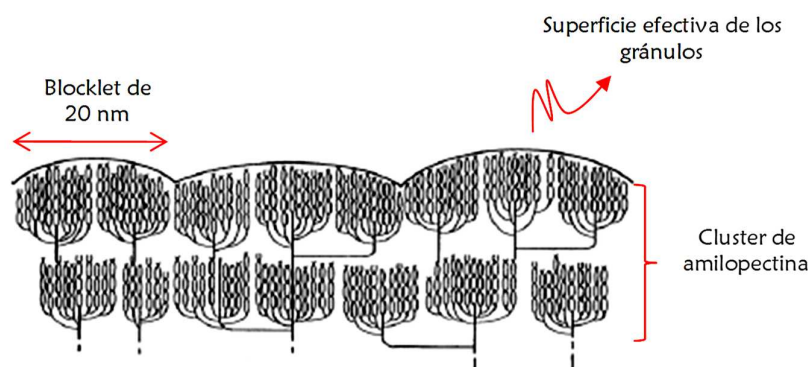


Figura 4.12: Diagrama esquemático del modelo de superficie granular. Estructuras nodulares elevadas (*blocklet*) constituidas por los conglomerados (*clusters*) de amilopectina de las capas más externas de los gránulos de almidón.

La apariencia de los nódulos de la superficie de los gránulos de almidón cambió significativamente como consecuencia del daño mecánico causado por la molienda. Las imágenes de AFM mostraron que los nódulos de las muestras AD2, AD3 y AD4 fueron menos esféricos y más elongados (Figura 4.11). La longitud del eje más extenso de los nódulos alargados osciló entre 82-186 nm, 129-196 nm y 113-212 nm para las muestras AD2, AD3 y AD4, respectivamente. También se observó que estas protuberancias presentaron una mayor altura respecto a las observadas en los gránulos nativos (Figura 4.10).

Los resultados obtenidos mediante el análisis con AFM demostraron que el daño mecánico derivado del proceso de molienda produce modificaciones estructurales sobre la superficie granular del almidón, las cuales modifican el nivel estructural de los *blocklets* en la superficie.

En función de los resultados obtenidos es posible indicar que la fricción y el cizallamiento de los gránulos de almidón producido durante la molienda promueven la erosión de las regiones exteriores y una deformación de las protuberancias nanométricas superficiales.

La estructura interna de los gránulos de almidón y la morfología general de los *blocklets* ha sido analizada por numerosos autores y caracterizada por medio de microscopía de fuerza atómica (Morris et al., 2005; Ridout et al., 2002; Ridout et al., 2003; Ridout et al., 2004; Ridout et al., 2006). Estos estudios han demostrado que la estructura interna de los gránulos de almidón es heterogénea y que en algunas regiones los gránulos están formados por *blocklets* duros dispersos en una matriz de un material más blando, mientras que en otras regiones, la matriz en la cual los *blocklets* se encuentran inmersos contiene una delgada y rígida estructura de red. En función de esto, es posible que la fricción mecánica durante la molienda, tenga un mayor impacto sobre las regiones que presentan una menor rigidez y genere una mayor erosión en estas zonas, ya que las estructuras más blandas oponen una

menor resistencia. Lo que coincide con la diferencia de altura que presentaron las protuberancias en las muestras con daño mecánico respecto a los gránulos nativos

La resistencia que presentan los gránulos de almidón a diferentes condiciones externas pareciera estar relacionada y determinada por varios factores, sin embargo, el tamaño de los *blocklets* y el grado de cristalinidad local en la superficie, puede jugar un papel importante en la resistencia de los gránulos a los ácidos y a la hidrólisis enzimática (Pérez et al., 2009). En este sentido, el tamaño de los *blocklets* puede, por lo tanto, desempeñar un papel en la resistencia relativa de las capas más externas de los gránulos. En este sentido, es posible sugerir que, debido a una alteración de la estructura cristalina de los conglomerados (*cluster*) de amilopectina que dan origen a los nódulos de la superficie, los gránulos de almidón dañados mecánicamente pueden gelatinizar espontáneamente en agua, y como resultado de este efecto presentar una mayor susceptibilidad a la hidrólisis enzimática. En relación con esto, es probable que los fragmentos de amilopectina producidos durante la depolimerización mecánica de los gránulos de almidón, que fue informada por Morrison y Tester (1994) y Morrison et al., (1994), sean el resultado de la ruptura de moléculas de amilopectina que forman parte de estos conglomerados en las capas exteriores de los gránulos de almidón.

Asimismo, las disminuciones en la cristalinidad derivadas del efecto del daño mecánico de los gránulos pueden estar asociadas con la alteración de la estructura cristalina de estas regiones granulares.

4. Conclusiones

El daño físico causado a la superficie granular por el proceso de molienda dio lugar a gránulos de almidón con superficies irregulares, rugosas y menos uniformes, lo que produjo una reducción de la cristalinidad. El daño mecánico resultó comparable entre los gránulos tipo A y B.

La caracterización micro y nano estructural de gránulos de almidón por medio de técnicas de microscopía y análisis de imágenes proporcionó información cualitativa y cuantitativa relevante que permitió caracterizar los efectos del proceso de molienda sobre la superficie de los gránulos de almidón. Los resultados obtenidos, indicaron que el proceso mecánico produjo modificaciones estructurales a escala nanométrica sobre la superficie de los gránulos de almidón. Además, estos resultados contribuyen a la comprensión de las relaciones estructura-propiedades de los gránulos de almidón, las cuales son de importancia para el control de calidad de productos alimenticios a base de almidón.

Capítulo 5

*Efecto mitigante de las enzimas sobre los
problemas de calidad derivados del uso de
harinas de trigo con diferentes contenidos
de almidón dañado*

Materiales y Métodos

1. Muestras

Se utilizaron cinco harinas de trigo pan a partir de molienda industrial que presentaron un amplio rango de contenido de almidón dañado. La molienda de los granos de trigo para la obtención de las harinas se llevó a cabo en el Molino Carlos Boero Romano S.A (San Francisco, Córdoba, Argentina), cuya capacidad de molienda es de 210 t/día.

Debido a que las harinas se obtuvieron a partir de diferentes lotes de granos, fue necesaria una caracterización a nivel de composición para corroborar que las mismas se diferenciaron principalmente en el contenido de almidón dañado. La composición de las harinas se muestra en la Tabla 5.1. Las harinas se diferenciaron principalmente en el contenido de almidón dañado. El contenido de proteínas y gluten húmedo y seco ($p \leq 0,05$) fue similar. Con el mismo propósito, se determinó la actividad enzimática de la α -amilasa propia de las harinas (Tabla 5.2). En todos los casos se registraron valores de *Falling number* mayores a 300 s, lo que indica una baja actividad amilásica en las harinas.

Tabla 5.1. Composición de las harinas de trigo

Muestra	Almidón dañado ¹ (%)	Proteínas ² (%)	Humedad ³ (%)	Gluten húmedo ⁴ (%)	Gluten seco ⁴ (%)
H9AD	8,90 a	9,43 a	13,21 a	30,10 a	10,68 a
H10AD	10,13 b	10,55 b	13,15 a	29,60 a	10,96 a
H11AD	11,07 c	9,99 a	12,96 a	28,42 a	10,43 a
H14AD	14,30 d	9,71 a	13,49 a	29,63 a	10,76 a
H15AD	15,03 d	9,53 a	13,14 a	28,56 a	10,42 a

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

1. Método 76-30A; AACC, 2000

2. Método 46-13; AACC, 2000

3. Método 44-19, 44-01; AACC, 2000

4. Método 38-10; AACC, 2000

Tabla 5.2. Actividad de la α -amilasa en las harinas de trigo

Muestras	<i>Falling Number</i> (s)
H9AD	490 b
H10AD	407 a
H11AD	416 a
H14AD	489 b
H15AD	453 ab

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Método 56-81 B; AACC, 2000

2. Enzimas

Las enzimas empleadas fueron α -amilasa (ALF) (Fungamyl 4000BG) (4000 FAU/g), amilasa maltogénica (AMM) (Novamyl 10000BG) (10000 MANU/g) y amiloglucosidasa (AMG) (AMG 3300BG) (3300 AGU/g). Los tres aditivos enzimáticos utilizados fueron de grado alimenticio. Para los ensayos las dosis empleadas fueron las dosis máximas y el doble de las dosis mínimas, recomendadas por el fabricante (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Dosis de enzimas.

Enzima	Dosis mínimas y máximas (g / 100 g de harina)
ALF	0,0002 - 0,0006
AMM	0,002 - 0,01
AMG	0,01 - 0,015

3. Calidad de las harinas

3.1 Índice de Sedimentación en Dodecil Sulfato de Sodio (IS-SDS)

El índice de sedimentación en SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) se determinó de acuerdo al Método AACC 56-70 (AACC, 2000), modificado según Dick y Quick (1983) según lo descrito anteriormente

3.2 Perfil de Capacidad de Retención de Solventes (SRC) (Solvent Retention Capacity) (Método 56-11, AACC, 2000)

La capacidad de retención de solventes se determinó de acuerdo al Método AACC 56-11 (AACC, 2000), anteriormente descrito.

4. Caracterización del almidón

4.1 Análisis de la Viscosidad

Las propiedades de viscosidad se determinaron a través de un Viscoanalizador Rápido (RVA series 4500, Perten instruments). Para la determinación se utilizó el método de perfil de pasting STD1 (Método 76-21; AACC, 2000), como se describió en capítulos anteriores.

El pico de viscosidad (PV), la viscosidad media (VM), viscosidad final (VF), “*breakdown*” (PV – VM) y “*setback*” (VF – VM) se determinaron a partir de las curvas de perfil de viscosidad.

4.2 Propiedades térmicas del almidón

Las transiciones de estado sufridas por el almidón durante el calentamiento en agua se registraron mediante un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC823e Calorimeter Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza), con software STARe Default DB V9.00 (Mettler Toledo, Schwerzenbach,

Suiza) Para este ensayo, se pesó $5,0 \pm 0,5$ mg de harina en cápsulas calorimétricas de aluminio de 40 μ l y posteriormente a cada cápsula se le adicionó agua (1:3 harina:agua). Las cápsulas se sellaron herméticamente y se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente antes de ser sometidas al análisis.

Durante el ensayo, las cápsulas se calentaron desde 25 °C hasta 120 °C a una velocidad de 10 °C/min. A partir de los gráficos de flujo de calor versus temperatura se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}), temperatura de pico (T_p), y cambio de entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g).

5. Productos no fermentados (Galletitas dulces)

5.1 Evaluación de las propiedades reológicas de las masas

La dureza de las masas y el carácter viscoelástico se evaluó mediante un ensayo de compresión a través de un texturómetro Instron (Universal Testing Machine, modelo 3342, EUA). El ensayo de compresión involucró la aplicación de una deformación (ϵ) constante y normal durante un intervalo de tiempo, y se registró el esfuerzo (σ) en función del tiempo durante la aplicación y eliminación de la deformación.

Cuando un material viscoelástico es sometido a un esfuerzo, sufre una deformación instantánea y luego continúa deformándose en función del esfuerzo aplicado. Posteriormente, cuando el esfuerzo es removido, parte de la forma original es recobrada (componente elástica) y parte se pierde (componente viscosa).

Las masas se prepararon según lo indicado en el Micrométodo III descrito por Finney et al. (1950) con modificaciones (León et al., 1996) y dejaron reposar por 1 h a 22 ± 2 °C. Posteriormente, se cortaron piezas cilíndricas de masa de 31 mm de diámetro y 9 mm de altura aproximadamente. Las piezas cilíndricas de masa se sometieron a un test de compresión mediante una sonda de 35 mm de diámetro bajo las siguientes condiciones: celda de compresión de 5 kg; velocidad del cabezal 0,5 mm/s; deformación máxima 30%. Una vez alcanzado el valor de compresión requerido, se evaluó la relajación del material durante 120 s a deformación constante.

Para evitar la deshidratación de la masa y minimizar la fricción durante la determinación reológica las masas se lubricaron con vaselina. En cada ensayo se midieron tres réplicas de la misma masa.

Para caracterizar las curvas de relajación de las masas, se utilizó un modelo reológico de tres elementos, el cual es una combinación en paralelo de un elemento de Maxwell (elemento viscoso más un resorte, en serie) y un resorte residual:

$$\sigma(t) = \sigma_1 * e^{(-t/\lambda)} + \sigma_{rr}$$

donde el primer término de la ecuación representa la componente viscoelástica del sistema (modelo de maxwell) y el segundo la componente puramente elástica del modelo (resorte residual).

En las curvas de relajación se pueden distinguir 2 regiones principales, la porción inicial que muestra una gran pendiente (deformación) y la segunda zona que tiene la pendiente menor la que tiende a un valor de equilibrio residual (relajación). En el medio de esta última región, una parte de la curva presenta un comportamiento intermedio entre las dos regiones anteriores (Yadav et al., 2006) (Figura 5.1).

Los parámetros del modelo se estimaron por ajuste de los datos experimentales mediante el software SIGMAPLOT 10 (Systat Software, Inc., Alemania). A partir de las siguientes ecuaciones se obtuvieron los parámetros para caracterizar el sistema:

$$\sigma_1 = E_1 * \epsilon_0$$

$$\lambda_1 = \eta_1/E_1$$

$$\sigma_{rr} = E_r * \epsilon_0$$

donde E representa el módulo elástico de los elementos elásticos, E_1 módulo elástico de Maxwell y E_r módulo elástico en el equilibrio, ϵ_0 la deformación aplicada (constante) y λ el tiempo de relajación, siendo este último parámetro una constante de tiempo relacionada con la viscosidad newtoniana. Los módulos elásticos son parámetros que se utilizan para cuantificar la rigidez o fuerza de un material.

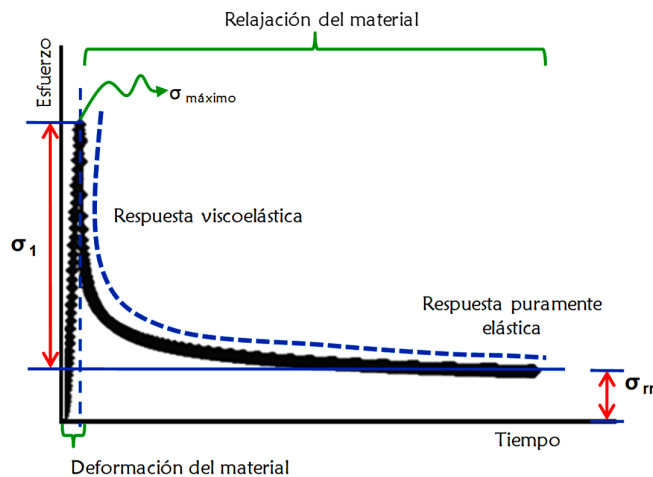


Figura 5.1: Curva típica de relajación de un material viscoelástico.

5.2 Elaboración y calidad de las galletitas

5.2.1 Método de elaboración

Se elaboraron galletitas según el Micrométodo III descrito por Finney et al. (1950) con modificaciones (León et al., 1996), empleado por el centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo (CIMMYT), como se detalló en el primer capítulo.

Las galletitas se hornearon a 180 °C por 10 min en un en un horno eléctrico de convección forzada Pauna-Cst (Argentina). Seis galletitas se obtuvieron en cada lote de producción y las galletitas más homogéneas se seleccionaron para la determinación de la calidad

5.2.2 Evaluación de la calidad de las galletitas

Factor Galletita

La calidad de las galletitas se determinó mediante el factor galletita (FG), según lo descrito en el primer capítulo. (León et al., 1996).

Color de la superficie (Método 14-22; AACC, 2000)

Para las determinaciones de color se utilizó un espectrofotómetro de reflectancia (CM-700d/600d Konica Minolta, EUA) para obtener un valor específico de color basado en la cantidad de luz reflejada de la superficie del producto utilizando 8 mm de apertura de la medición y un iluminador D65. Las mediciones se realizaron 24 h después del horneado de las piezas panarias. Para la calibración de espectrofotómetro se utilizó un plato estándar blanco. A cada galletita se le efectuaron 3 mediciones de color en la superficie y se informó el valor promedio. Se utilizó el sistema Cie-Lab (C.I.E., 1986) (Figura 5.2), que define cada color a partir de tres coordenadas denominadas L^* , a^* y b^* . Estas magnitudes 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 Brimelou, 2002). La coordenada L^* recibe el nombre de luminosidad, y a^* y b^* son las coordenadas colorimétricas que forman un plano perpendicular a la luminosidad, siendo, a su vez, perpendiculares entre sí. El corte del eje L^* con el plano que forman a^* y b^* es el punto acromático. El valor a^* es una medida de la intensidad de color rojo-verde, valores positivos se relacionan con el rojo y negativos con el verde. De la misma forma, los valores de b^* que son una medida de la intensidad de color amarillo-azul, los positivos indican amarillo y negativos azul. Los valores de L^* se encuentran en el rango de 0 a 100, mientras que los de a^* y b^* que son componentes cromáticos del rojo al verde y del azul al amarillo y varían entre -120 a 120, respetivamente (Papadakis et al., 2000).

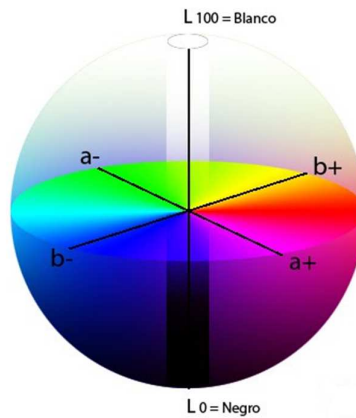


Figura 5.2: Representación gráfica del espacio Cie-lab.

Estructura de la superficie de las galletitas

La estructura superficial de las galletas se evaluó a través de análisis de imagen. Las galletitas fueron escaneadas (HP Scanjet G3010, EUA) y las imágenes se analizaron con el programa Image J v 1.45s (National Institutes Health, EUA). Se seleccionó un área circular (ROI) representativa de la parte central de cada galletita. Las secciones seleccionadas a color se convirtieron en imágenes en escala de grises (8-bits). La imagen seleccionada fue segmentada por un valor de gris para crear una imagen binaria mediante el algoritmo *Renyi Entropy* (Kapur et al., 1985). De este modo, todos los píxeles con nivel de gris por encima del umbral se mostraron en blanco y fueron considerados superficie no agrietada; a su vez, los píxeles con nivel de gris por debajo del umbral se mostraron en negro y fueron considerados superficie agrietada (Figura 5.3). A partir del análisis de las imágenes se obtuvo:

- Fracción de área (FA): que corresponde a la fracción de grieta en la superficie de la galletita.
- Dimensión fractal de la textura superficial (D): parámetro que caracteriza la irregularidad superficial de las galletas. Se calculó a través de el algoritmo “conteo de cajas” (*Fractal Box count*) mediante *plugin Fractal Count* del programa Image J.

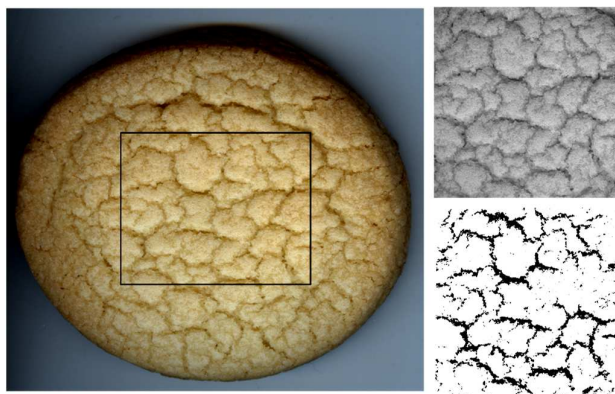


Figura 5.3: Fotografía de una galletita, mostrando el área seleccionada (ROI). A la derecha: el área seleccionada en una escala de gris y su imagen binarizada. En negro las grietas marcadas en la superficie de la galletita.

Firmeza

La firmeza de las galletitas se evaluó a las 24 h de horneadas con un texturómetro Instron (Universal Testing Machine, modelo 3342, EUA). Se realizó una prueba de quiebre de tres puntos. Para ejecutar el ensayo, las galletitas se colocaron sobre dos soportes paralelos, separados por una distancia de 3,6 cm. Una sonda del tipo HDP/3PB (filo de cuchillo) se utilizó para ejercer una fuerza de compresión sobre las galletitas hasta producir su quiebre. La velocidad de desplazamiento fue de 0,5 mm/s. A partir de este ensayo se obtuvieron gráficos de fuerza vs deformación. Mediante el software BluehillR 2.27 (Instron, EUA) se obtuvo la dureza de la galletita expresada como la fuerza máxima requerida para fracturar la galletita (Menjivar y Faridi, 1994) (Figura 5.4).

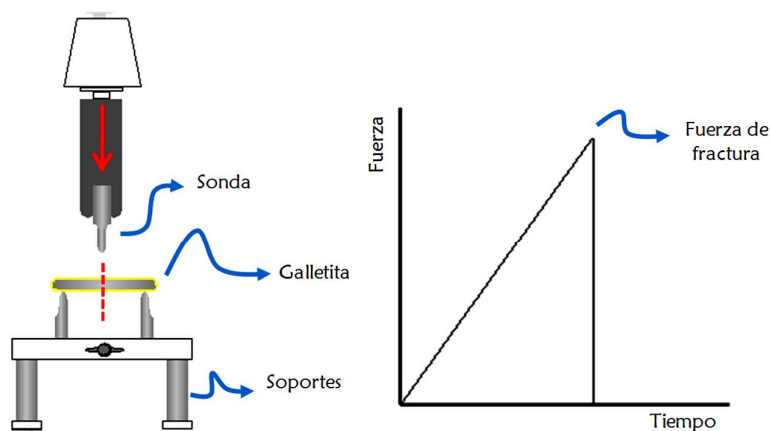


Figura 5.4: Representación gráfica del ensayo de fractura de galletitas

Contenido de humedad de la galletitas (Método 44-15 A, AACC, 1995)

El contenido de humedad se determinó por diferencia de pesada antes y después de calentar $2,00 \pm 0,01$ g de galletita desgranada a 130 ± 2 °C durante 1 h en estufa isotérmica de calentamiento eléctrico con circulación de aire forzado.

6. Productos fermentados (Pan)

6.1 Caracterización del comportamiento reológico de las masas durante la fermentación

Los cambios reológicos producidos durante la fermentación de las masas se evaluaron mediante un Reofermentómetro CHOPIN (Modelo F3, Francia), dispositivo que simula el proceso de fermentación de una masa panaria. El ensayo consiste en la determinación simultánea de la altura de la masa, la producción de gas durante la fermentación y la retención de gas bajo condiciones controladas. A partir de esta determinación se obtienen dos curvas: “Curva de desarrollo de la masa”, la cual indica la altura máxima de la masa desarrollada durante la fermentación, y “Curva de retención gaseosa”, a partir de la cual es posible determinar un coeficiente de retención gaseosa.

Durante el proceso de fermentación el equipo evalúa el desarrollo de la masa (altura) mediante un sensor óptico, y determina la presión de gas que hay adentro del recinto de medición del equipo de manera directa e indirecta. La presión directa es la presión total de gas (aire+CO₂) en la cuba donde se desarrolla el ensayo, mientras que la presión indirecta es la presión del aire en la cuba. Durante la fermentación, la levadura produce gas, y mientras la masa lo retiene aumenta la presión en la cuba (presión de la atmósfera que es aire). Cuando la masa ya no puede soportar la presión, las celdas colapsan y liberan el CO₂ a la atmósfera de la cuba, y en la medida que se continúe produciendo CO₂ la presión del recinto aumenta (aire+CO₂). El dispositivo determina mediante la presión directa e indirecta la proporción de CO₂, es decir, el gas producido por las levaduras y cuanto de este gas pudo ser retenido por la masa antes de permeabilizarse.

Para las determinaciones se elaboraron masas a partir de las harinas H9AD y H15AD sin el agregado de enzimas, y con la harina H15AD se formularon masas con el agregado de las enzimas α -amilasa (ALF), amilasa maltogénica (AMM) y amiloglucosidasa (AMG), y las mezclas de ALF+AMG, en las dosis mínimas y máximas recomendadas. Las masas se prepararon con 200 g de harina; 2,4 g de levadura liofilizada; 4 g sal de mesa (ClNa) y 120 g de agua. Los ingredientes se mezclaron (2 min) y amasaron (9 min) (amasadora Kitchen Aid 525 watts, EUA), y 200 g de las masas resultantes se utilizaron para llevar a cabo el ensayo. Para el ensayo, la masa (200 g) se colocó en la cuba y sobre ella un peso de 2 kg. Posteriormente, todo el dispositivo se introdujo en el reofermentómetro durante 3 h a 28,5 °C (Figura 5.5).

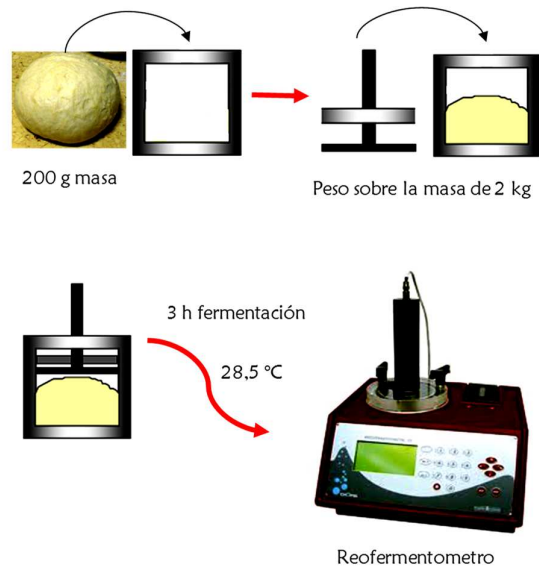


Figura 5.5: Esquema del procedimiento de análisis en el Reofermentómetro.

Para cada ensayo se obtuvo la curva de desarrollo de masa y curva de retención gaseosa, a partir de las cuales se determinaron los siguientes parámetros (Figura 5.6):

- Curva de desarrollo de la masa:

Hm: altura máxima que la masa es capaz de adquirir durante la fermentación.

T1: el tiempo que le toma al sistema alcanzar la altura máxima.

h: la altura de la masa al final del proceso de fermentación.

- Curva de retención gaseosa:

Hm': presión del recinto en su punto máximo.

T1': tiempo que tarda el sistema alcanzar la máxima presión.

Tx: momento en el que la masa se torna permeable al gas por efecto de la presión.

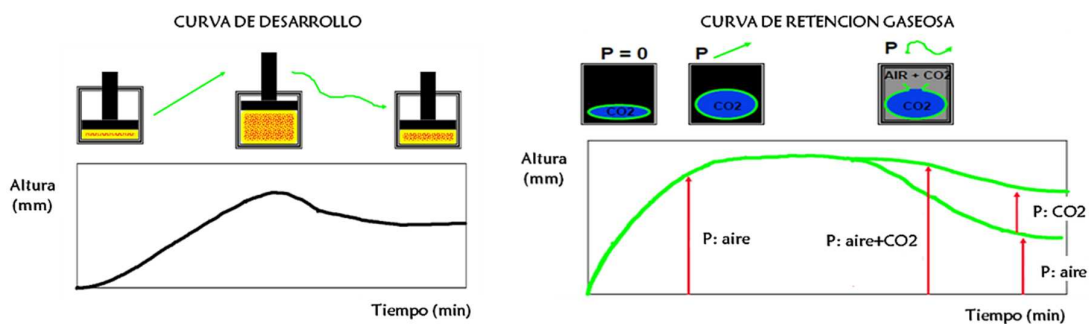


Figura 5.6: Curvas producidas durante la evolución de la masa durante la fermentación

6.2 Optimización de la formulación de elaboración de pan a partir de harinas con diferentes contenidos de almidón dañado mediante el uso de enzimas

6.2.1 Diseño experimental

Para evaluar el efecto sinérgico de la combinación de almidón dañado y de las enzimas sobre los parámetros de calidad del pan se utilizó como herramienta de análisis estadístico la metodología de superficie de respuesta, la cual ha sido ampliamente utilizada en el desarrollo y optimización de productos de cereales (Gallagher et al., 2003; Ylimaki et al., 1988; Toufeili et al., 1994). La metodología de superficie de respuesta permite evaluar la contribución relativa de las variables sobre los parámetros predictivos del producto y determinar los niveles óptimos de los ingredientes a utilizar (Crowley et al., 2001).

Para llevar adelante este proceso se seleccionaron las siguientes variables de diseño:

- Contenido de almidón dañado: Se utilizó la harina H9AD, H11AD y H14AD
- α -amilasa (ALF) (Fungamyl 4000BG): Dosis mínima 0,0002 y dosis máxima 0,0006 g/100g harina.
- Amiloglucosidasa (AMG) (AMG 3300BG): Dosis mínima 0,01 y dosis máxima 0,015 g/100g harina.

Las enzimas utilizadas como variables fueron elegidas de acuerdo a los resultados obtenidos de los análisis reológicos, y los niveles de ambas variables fueron definidos teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante y ensayos previos. Los niveles del contenido de almidón dañado fueron seleccionados con el propósito de cubrir un rango normal y elevados de este parámetro para harinas de trigo comerciales (Colombo et al., 2008; Salim et al., 2007).

Para determinar las combinaciones de las variables se aplicó el diseño experimental *de Box-Behnken*. A partir de esto, el efecto de los tres factores (enzimas y almidón dañado) se evaluó en combinación en 16 panificaciones sobre los parámetros de calidad del pan, como el volumen específico de pan, relación de forma, firmeza y estructura de la miga, y color de la corteza de los panes. En la Tabla 5.4 se presenta el diseño experimental.

A partir del diseño experimental se obtuvieron las ecuaciones de regresión y las superficies de respuesta para cada uno de los parámetros de calidad evaluados utilizando como herramienta de análisis estadístico la metodología de *Regresión de superficie de respuesta* (Statgraphics plus 5.0, EUA).

Tabla 5.4. Diseño experimental

Muestra	Alfa amilasa*	Amiloglucosidasa*	Almidón dañado (%)
1	0,0002	0,0125	8,9
2	0,0004	0,01	8,9
3	0,0004	0,015	8,9
4	0,0006	0,0125	8,9
5	0,0002	0,015	11,1
6	0,0002	0,01	11,1
7	0,0004	0,0125	11,1
8	0,0004	0,0125	11,1
9	0,0004	0,0125	11,1
10	0,0004	0,0125	11,1
11	0,0006	0,01	11,1
12	0,0006	0,015	11,1
13	0,0002	0,0125	14,3
14	0,0004	0,01	14,3
15	0,0004	0,015	14,3
16	0,0006	0,0125	14,3

* Dosis de enzimas en g/100g harina

6.2.2 Elaboración y calidad de los panes

Método de elaboración

Los panes se elaboraron mediante la metodología de pan de molde utilizada en programas de mejoramiento de trigo según norma IRAM 15858-1, con algunas modificaciones. Se utilizó una formulación base: 100% de harina de trigo, 3% de levadura prensada, 1% de sal y 58,5% de agua. La levadura y la sal se disolvieron previamente en agua, en forma separada. La temperatura del agua se calculó para obtener una masa final a 27 ± 1 °C. Los ingredientes fueron mezclados y amasados durante 10 min (amasadora MPZ, Argentina). Seguidamente se llevó a cabo la fermentación durante un total de 80 min: la masa se colocó en la cámara de fermentación (Pauna-Cst, Argentina) a 30 °C y 98% de HR, transcurridos los primeros 45 min se desgasificó la masa manualmente sobre la mesada. Posteriormente se llevó nuevamente a la cámara de fermentación. El proceso de desgasificación se repitió después de dos periodos de 15 y 20 min de fermentación. Seguidamente, la masa fue laminada con una sobadora Mi-Pan vf roller (Mi-Pan, Argentina) con dos rodillos de 50 x 12,7 cm y dividida en trozos de 150 g. Los trozos de masa se moldearon en una armadora (Braesa, Brasil), se colocaron en moldes y se llevaron a la cámara de fermentación durante 75 min a 30 °C y 98% de HR. Finalmente, las piezas se hornearon a 215 °C por 20 min en un horno de convección forzada Pauna-Cst (Argentina) previa vaporización de agua en la superficie de las piezas de pan.

Las hogazas de pan recién horneadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 2 h y posteriormente las piezas frescas de pan se guardaron en bolsas de polietileno y se almacenaron a 25 °C hasta el momento de su análisis.

Evaluación de la calidad

Determinación del volumen específico (Método 10-05; AACC, 2000)

El volumen de las piezas de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza, después de 24 h de horneados. El volumen específico (cm^3/g) se obtuvo dividiendo el volumen de la muestra por su peso.

Relación de forma

La relación de forma de cada pieza de pan se calculó como el cociente entre el alto y el ancho de la pieza.

Color de la corteza (Método 14-22; AACC, 2000)

La determinación de color de la corteza de pan se realizó según lo descrito en incisos anteriores.

Estructura de la miga

Las características estructurales de la miga se evaluaron, mediante análisis de imagen utilizando el software Image J v 1.45s (National Institutes Health, EUA). Para realizar este análisis, las rodajas de pan (2,5 cm de espesor) se escanearon mediante un escáner (HP Scanjet G3010, EUA). De la parte central de las rodajas de pan, se seleccionó manualmente un área (ROI) de igual tamaño en todos los panes. Las secciones seleccionadas fueron representativas de la estructura de la miga de cada rodaja. Las imágenes a color se convirtieron en imágenes escala de grises (8-bits) y luego se segmentaron a partir de un valor de gris para crear una imagen binaria. El valor umbral de gris para la segmentación de las imágenes se realizó en forma automática con el software descrito. A partir de esto, todos los píxeles con nivel de gris por encima del umbral se mostraron en blanco y se consideraron paredes alveolares (miga de pan), mientras que, los píxeles con nivel de gris por debajo del umbral se mostraron en negro y se consideraron áreas vacías (alveolos o celdas de gas). En cada imagen se asignó la categoría de objeto (celdas de gas) a aquellas zonas de la imagen que tenían una intensidad de gris entre 0 y el valor umbral (Figura 5.7). Del análisis de las imágenes se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Fracción de área (FA): es la fracción del área ocupada por alvéolos con respecto a la total.
- Perímetro: es el perímetro promedio de los alvéolos.
- Circularidad: es la circularidad media de los alvéolos.
- Diámetro de Feret: es el diámetro mayor promedio de los alvéolos.
- Dimensión fractal de la textura superficial (D): es un parámetro numérico relacionado con la morfología y textura de los objetos, y evalúa la complejidad e irregularidad de las estructuras. Se

calculó a través del algoritmo “conteo de cajas” (*Fractal Box counting*) mediante *plugin Fractal Count* del programa Image J v 1.45s.

- Uniformidad: relación entre el número de alvéolos con una superficie menor a 4 mm² y el número de alvéolos con una superficie mayor a 4 mm².

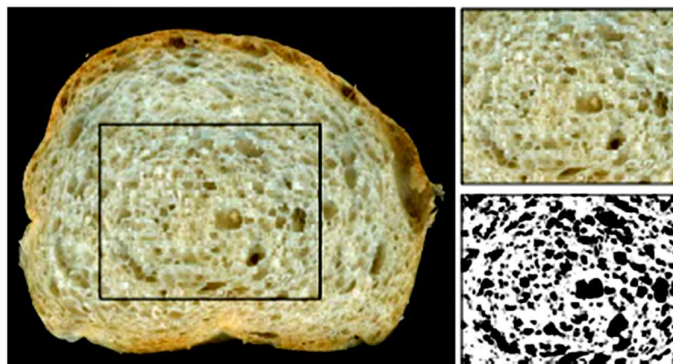


Figura 5.7: Fotografía de una rodaja de pan, mostrando el área seleccionada (ROI). A su lado el área seleccionada transformada en imagen binarizada. En blanco la miga de pan y en negro los alvéolos.

Textura de la miga (Método 74-09; AACC, 2000)

La firmeza de la miga de pan se evaluó luego de 24 h de horneadas las piezas de pan mediante un texturómetro INSTRON (Universal Testing Machine, modelo 3342, EUA). Rodajas de pan de 2,5 cm de espesor se sometieron a un test de compresión mediante una sonda de 25 mm de diámetro bajo las siguientes condiciones: celda de compresión de 5 kg; velocidad del cabezal 100 mm/min; deformación máxima 40%. Mediante el software Bluehill[®] 2.27 (Instron, EUA) se obtuvo la dureza de la miga expresada como la fuerza requerida para comprimir la muestra hasta el 40% de su espesor original.

6.2.3 Optimización de la formulación

El cálculo de las condiciones en la que se combinan los factores para una respuesta optimizada se determinó a partir del procedimiento de optimización de múltiples respuestas (Statgraphics plus 5.0, EUA) a través de la función de conveniencia (*desirability function*) (Ferreira et al., 2007), una vez establecida la contribución relativa de las variables sobre los parámetros predictivos de calidad de pan. La función de conveniencia es un método que asigna una "puntuación" a un conjunto de respuestas y elige la combinación de factores que maximizan esa puntuación para alcanzar la conveniencia global máxima.

Se realizaron dos cálculos de condiciones óptimas:

- *Optimización 1:* se calculó el nivel de almidón dañado, α -amilasa y amilogucosidasa con el propósito de obtener una pieza de pan maximizando el volumen específico y la relación de forma, minimizando la firmeza y manteniendo el color de la corteza dentro de los valores $L^* =$

65 a^* = 11 y b^* = 31 (valores de color intermedios definidos a partir del rango de valores obtenidos experimentalmente).

- *Optimización 2:* se calculó el nivel de α -amilasa y amilogucosidasa con el propósito de obtener una pieza de pan a partir de una harina con 14,3% almidón dañado, maximizando el volumen específico y la relación de forma, minimizando la firmeza y manteniendo el color de la corteza dentro de los valores L^* = 65 a^* = 11 y b^* = 31 (valores de color intermedios definidos a partir del rango de valores obtenidos experimentalmente).

Una vez determinados los niveles de los factores para las respuestas óptimas se realizaron los ensayos de panificación y se determinaron las características de los panes obtenidos con el propósito de corroborar los valores predichos por las ecuaciones para las variables de respuesta: volumen específico de pan, relación de forma, color de la corteza y firmeza. Para la optimización 1 se utilizó la harina H10AD y para la optimización 2 la harina H14AD.

Las panificaciones (Método IRAM 15858-1) y las determinaciones de volumen específico (Método 10-05; AACC, 2000), relación de forma, color de la corteza (Método 14-22; AACC, 2000) y firmeza (Método 74-09; AACC, 2000) se realizaron según lo descrito en los incisos anteriores.

Envejecimiento de las piezas de pan obtenidas a partir de la optimización 2

El efecto del almacenamiento sobre los panes elaborados según la optimización 2 se determinó mediante los cambios en la firmeza de la miga y la cantidad de amilopectina retrogradada.

Se elaboraron panes (Método IRAM 15858-1) con la harina H14AD sin el agregado de α -amilasa y amilogucosidasa (control) y con el agregado de las enzimas (dosis según optimización 2) y se evaluó la textura de la miga y cantidad de amilopectina retrogradada a los 0, 1, 2, 3 y 8 días de almacenamiento a 22 ± 2 °C.

Textura de la miga (Método 74-09; AACC, 2000)

La firmeza de la miga de los panes se determinó mediante un texturómetro INSTRON (Universal Testing Machine, modelo 3342, EUA), según se describió previamente en este capítulo.

Retrogradación de la amilopectina en la miga

La recristalización de la amilopectina se evaluó a través de en un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC823e Calorimeter Mettler Toledo con software STARe Default DB V9.00 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza).

Para evaluar el proceso de retrogradación de la amilopectina en el tiempo, se utilizó miga de pan procedente de los panes almacenados por 0, 1, 2, 3 y 8 días. Para el ensayo se pesaron ~20 mg de miga de pan en cápsulas de aluminio de 40 μ l. Las cápsulas se cerraron herméticamente y posteriormente se calentaron en el calorímetro de 25 a 120 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. De los termogramas obtenidos se calcularon los cambios de entalpía de retrogradación del almidón (ΔH_r).

7. Análisis estadístico

En todos los casos las determinaciones experimentales se realizaron al menos por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina) (Di Rienzo et al., 2011). Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). Los resultados fueron comparados por el método de la mínima diferencia significativa test de Fisher's (LSD), con un nivel de significancia de 0,05 (Di Rienzo et al., 2002). La relación entre los distintos parámetros se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson con $p \leq 0,05$.

Para la optimización de la formulación de panes elaborados con harinas con alto contenido de almidón dañado mediante enzimas se aplicó el diseño experimental de Box-Behnken utilizando un proceso de regresión de superficie de respuesta (Statgraphics plus 5.0). El diseño de Box-Behnken es un diseño rotatable de segundo orden, y posee tres niveles en cada factor lo que permite estimar efectos de tipo cuadrático, además de interacciones y efectos lineales. La rotabilidad es una propiedad importante, dado que la finalidad de la metodología de superficie de respuesta es la optimización, y como se desconoce la localización del punto óptimo, tiene sentido utilizar un diseño que proporcione estimaciones precisas en todas las direcciones. Mediante este diseño se estudió el efecto de los tres factores (α -amilasa, amiloglucosidasa y almidón dañado) en 16 formulaciones para pan. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorio para evitar efectos de variables ocultas. Se hicieron cuatro réplicas del punto central para permitir la estimación del error puro mediante la suma de cuadrados. Los resultados se analizaron mediante el método de regresión múltiple. La calidad de los modelos estimados por ajuste se evaluó mediante un análisis de varianza ANOVA (Statgraphics plus 5.0). A partir de esto, mediante los *p-valor* de cada factor o variable se determinó la existencia de una relación significativa entre los factores y la respuesta analizada. Para cada modelo ajustado a los datos experimentales se obtuvo el coeficiente de determinación R^2 . Las ecuaciones de regresión múltiple para cada uno de los parámetros de respuesta evaluados se desarrollaron solo con los coeficientes significativos ($p \leq 0,05$). Para cada parámetro de calidad se generaron los gráficos de superficie de respuesta bidimensionales. El cálculo de las condiciones óptimas se determinó a partir del método de respuesta múltiple a partir de la función de conveniencia (Statgraphics plus 5.0).

Resultados y Discusión

A lo largo de los dos primeros capítulos se ha descrito y discutido en profundidad respecto de los efectos negativos que causan los elevados contenidos de almidón dañado sobre la calidad panadera de las harinas y las propiedades reológicas de las masas panarias. Asimismo, se profundizó sobre el efecto de enzimas amilásicas sobre las propiedades reológicas y térmicas de sistemas con diferente contenido de almidón dañado. Posteriormente, en los capítulos 3 y 4, los estudios se concentraron sobre los sistemas de almidón, en donde las alteraciones que sufren estos sistemas y la estructura de los gránulos como consecuencia del daño mecánico producido durante la molienda han quedado demostradas. Hasta el momento no hay antecedentes sobre procedimientos que hayan sido diseñados con el fin de reducir los efectos desfavorables que causan los incrementos de almidón dañado en la producción de productos panificados. Para avanzar con este propósito, a lo largo de este capítulo se describirán los efectos de la utilización de las enzimas α -amilasa, amilasa maltogénica y amiloglucosidasa en la elaboración de galletitas dulces y pan, a partir de harinas de trigo con diferentes contenidos de almidón dañado, las cuales fueron producidas en un molino industrial.

Como se detalla en la sección de materiales y métodos, las harinas de trigo empleadas para este análisis fueron H9AD con 8,90%, H10AD con 10,13 %, H11AD con 11,07 %, H14AD con 14,30% y H15AD con 15,03% de almidón dañado. Las harinas se obtuvieron de mezclas de trigos pan y presentaron características similares en el contenido y la calidad de proteínas, aunque se diferenciaron en el contenido de almidón dañado.

Todos los aspectos evaluados en este capítulo se realizaron a partir de estas harinas, especialmente preparadas por un molino industrial, por lo que debido a la disponibilidad de las instalaciones no fue posible disponer del total de las muestras de harina en todas las etapas del análisis. En función de esto, los ensayos reológicos en masa de galletita y pan se llevaron a cabo a partir de las harinas designadas como H10AD y H15AD. Las evaluaciones sobre los productos panificados se efectuaron mediante la utilización de las harinas H10AD y H15AD, en el caso de las galletitas, y H9AD, H10AD, H11AD y H14AD, en el caso de los panes.

Para el desarrollo de este capítulo fue prioritario el uso de harinas provenientes de un molino industrial productor de harinas, para que las condiciones de ensayo fueran similares a las que normalmente están vinculadas a la producción de panificados.

1. Valoración de la calidad de las harinas para elaborar productos panificados

Como se mencionó en el capítulo 1, el perfil de capacidad de retención de solventes (SRC) y el índice de sedimentación en SDS (IS-SDS) son ensayos predictivos de calidad de harina.

Debido a que las muestras de harina utilizadas para este estudio provinieron de lotes de mezclas de granos de trigo, resultó importante evaluar las posibles consecuencias que esta condición pudiera ocasionar sobre las características finales de las harinas, lo que está directamente relacionado con su calidad tecnológica.

Los valores registrados para el perfil de retención de solventes y los índices de sedimentación (Tabla 5.5) estuvieron en el rango que los informados por Colombo et al. (2008) y Moiraghi et al., (2005) para diferentes variedades de trigo pan. El perfil de capacidad de retención de solventes incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) con el contenido de almidón dañado de las harinas, al igual que lo registrado en las harinas analizadas en el primer capítulo, donde, independientemente del rol de los demás componentes de una harina, el almidón dañado causó un aumento sobre los valores de retención. Los parámetros $SRC_{\text{Carbonato}}$ y $SRC_{\text{H}_2\text{O}}$ fueron los que mostraron mayores cambios por el incremento del contenido de almidón dañado, mientras que, los valores de $SRC_{\text{Ac láctico}}$ incrementaron sólo a partir de un 14,30% de almidón dañado. El SRC_{sacarosa} no presentó una clara tendencia a causa de esta modificación. En coincidencia con la tendencia observada en el primer capítulo, a excepción del índice de retención de sacarosa, el $SRC_{\text{H}_2\text{O}}$ ($r = 0,90$), $SRC_{\text{Carbonato}}$ ($r = 0,63$) y $SRC_{\text{Ac láctico}}$ ($r = 0,82$; $p \leq 0,05$) incrementaron significativamente con el contenido de almidón dañado.

El índice de sedimentación en SDS (IS-SDS) incrementó a causa del aumento en los niveles de almidón dañado, al igual que lo registrado en las harinas derivadas del cultivar Klein Don Enrique, pero opuesto a lo observado en las harinas provenientes del cultivar Baguette y Tatú, de los resultados expuestos en el capítulo 1. Contrariamente a lo determinado en el primer capítulo, en este caso se observó una correlación positiva y significativa ($r = 0,68$; $p \leq 0,05$) entre este índice de calidad panadera y el contenido de almidón dañado. Sin embargo, a pesar de que este índice está específicamente relacionado con la cantidad y calidad de las proteínas que forman el gluten no se registró una correlación significativa ($p \leq 0,05$) entre el IS-SDS y el contenido de proteínas, gluten húmedo y gluten seco (Tabla 5.1). Esto posiblemente se deba a la fuerte influencia del almidón dañado, ya que el contenido de proteínas, gluten húmedo y gluten seco resultaron similares en las muestras. Estos resultados se condicen con lo reportado por Wieser et al., (2003) y Wang y Kovacs (2002), quienes no encontraron asociaciones entre estos tests de sedimentación y el contenido de proteínas y gluten. Este comportamiento, puede estar relacionado con el hecho de que la fracción de gluteninas del gluten es la responsable del desarrollo del sedimento en este tipo de test debido a que esta fracción de proteínas absorbe el solvente y se hincha a partir de las condiciones químicas dadas en el ensayo. En relación a esto, Colombo et al. (2008) reportaron una correlación positiva y significativa ($r = 0,60$) entre el IS-SDS y el contenido de gluteninas en harinas derivadas de trigos pan.

En función de la composición de las harinas (Tabla 5.1) y de los resultados de los índices de calidad de harinas, es posible inferir que las diferencias registradas entre las muestras se deben principalmente a la variación en el contenido de almidón dañado. Con estos resultados se confirma el hecho de que el contenido de almidón dañado presente en una harina afecta fuertemente su capacidad de absorción, lo que coincide con lo expuesto a lo largo del primer capítulo.

Tabla 5.5. Evaluación de la calidad panadera de las harinas mediante ensayos predictivos.

Muestra	IS-SDS (ml)	SRC (%)			
		Agua	Sacarosa	Carbonato	Ac. Láctico
H9AD	9,88 a	63,55 a	96,83 b	77,34 a	111,05 b
H10AD	13,25 b	67,52 ab	78,55 a	102,58 c	95,96 a
H11AD	13,25 b	73,11 bc	105,68 c	88,36 b	107,53 b
H14AD	12,90 b	78,32 cd	96,90 b	97,68 c	123,77 c
H15AD	13,00 b	79,96 d	120,04 d	101,98 c	128,5 c

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) ANOVA

2. Propiedades térmicas del almidón

En las condiciones normales de procesamiento de productos panificados, durante la etapa de formación de la masa y posterior fermentación, los gránulos de almidón se hidratan ligeramente y quedan inmersos en la red de gluten desarrollada. La temperatura durante el desarrollo de ambos procesos en general no supera los 30 °C, por lo tanto, los gránulos de almidón no gelatinizan bajo estas condiciones. Sin embargo, durante la etapa de cocción, cuando la temperatura en el sistema supera los 60 °C, los gránulos de almidón gelatinizan a pesar de que en el sistema sólo una limitada cantidad de agua se encuentra disponible. Esta restricción en el agua impide una disrupción completa de los gránulos, y en consecuencia, los gránulos no pierden su identidad. La estructura determinada por la red de amilosa y los gránulos de almidón gelatinizados inmersos, cumple una función muy importante en la formación de la estructura de las piezas de pan, ya que la transformación de masa en miga es una consecuencia de la gelatinización del almidón (Sluimer, 2005c).

Dada la importancia de la gelatinización del almidón en la obtención de productos panificados, y debido a que las harinas empleadas para este estudio provinieron de diferentes lotes de granos de trigo, se evaluaron las propiedades de viscosidad y el perfil térmico de las cinco harinas.

Las magnitudes de los parámetros determinados a partir del perfil térmico de las harinas (Tabla 5.6) fueron similares a la publicadas por Sahlstrøm et al. (2003) y Eliasson et al. (1995), quienes analizaron térmicamente harinas provenientes de nueve variedades de trigos y numerosas variedades de trigos pan (primavera e invierno) y trigos durum, respectivamente. Las muestras de harina H10AD, H11AD, H14AD y H15AD presentaron el mismo ($p \leq 0,05$) comportamiento térmico durante el proceso de gelatinización, sin embargo, estas harinas presentaron una menor ($p \leq 0,05$) entalpía de gelatinización que la muestra H9AD. La temperatura de inicio de gelatinización, pico y finalización del proceso de gelatinización de las muestras no presentaron alteraciones significativas. Estos resultados coinciden con lo demostrado en los capítulos anteriores, en condiciones de exceso de agua.

Tabla 5.6. Parámetros de perfil térmico de las harinas.

Muestras	ΔH_{gel} (J/g)	T_0 (°C)	T_{pico} (°C)	T_{end} (°C)
H9AD	8,51 b	58,9 a	64,3 a	70,0 a
H10AD	5,90 a	58,1 a	64,2 a	70,1 a
H11AD	6,99 a	59,3 a	64,8 a	70,2 a
H14AD	6,86 a	58,7 a	64,4 a	70,2 a
H15AD	6,38 a	59,0 a	64,3 a	70,2 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) ANOVA. Entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}) en base seca, temperatura de inicio de la gelatinización (T_0), temperatura de finalización de la gelatinización (T_{end}) y temperatura de pico (T_p)

Los valores de viscosidad (Tabla 5.7) registrados para las harinas de trigo fueron similares a los publicados por El-Poraia et al. (2013), quienes informaron valores de viscosidad de harinas provenientes de dos cultivares de trigo acondicionados durante diferentes tiempos y posteriormente molidos mediante dos métodos distintos de molturación del tipo industrial. Los perfiles de viscosidad de las muestras H10AD, H11AD, H14AD y H15AD no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), sin embargo, todas estas harinas se diferenciaron del perfil de viscosidad de la muestra H9AD. Se registró una caída significativa de los valores de viscosidad máxima (PV), viscosidad media (VM) y *breakdown*, mientras que, no se observaron diferencias en la viscosidad final (VF) y *setback* por efecto del contenido de almidón dañado, al igual que lo observado en los demás capítulos.

Tabla 5.7: Parámetros de perfil de viscosidad de las harinas.

Muestras	PV (cp)	VM (cp)	Breakdown (cp)	VF (cp)	Setback (cp)
H9AD	3254 c	1928 c	1326 c	3510 a	1582 a
H10AD	2701 a	1594 ab	1106 a	3517 a	1923 a
H11AD	2682 a	1520 a	1162 b	3256 a	1737 a
H14AD	2814 b	1660 b	1154 b	3301 a	1641 a
H15AD	2728 a	1647 b	1081 a	3355 a	1708 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

PV: pico de viscosidad, VM: viscosidad media, VF: viscosidad final

3. Efecto de la adición de enzimas sobre las propiedades reológicas de las masas y los productos de panificación

3.1 Galletitas

Comportamiento viscoelástico de las masas

La formulación para la obtención de galletitas dulces contiene grandes cantidades de grasa y azúcar, y requiere muy bajos niveles de agua. Durante la preparación de la masa de este tipo de

productos, debido a las condiciones de hidratación del sistema, sólo se disuelve una fracción de la sacarosa, se dispersan los sólidos de la formulación, y todo el conjunto se emulsiona con la grasa. Como consecuencia de las limitadas proporciones de agua, el almidón y las proteínas se hidratan parcialmente a lo largo del desarrollo de la masa, restringiendo la posibilidad de formación de gluten y la gelatinización de los gránulos de almidón durante la cocción. Sumado a esta escasa hidratación de las proteínas, los reducidos tiempos de amasado requeridos en este proceso limitan aún más las probabilidades de formación de gluten en este tipo de sistemas (Manley, 2000). En consecuencia, la masa de galletitas es una matriz no continua formada por proteínas, grandes glóbulos de grasa y gránulos de almidón que se encuentran distribuidos homogéneamente. Por lo tanto, este tipo de sistema carece de elasticidad y extensibilidad, y el comportamiento viscoelástico plástico, propio de estas masas, está principalmente determinado por las elevadas proporciones de grasa y azúcar. La grasa actúa fundamentalmente como lubricante y contribuye a la plasticidad de la masa, disminuyendo su viscosidad y promoviendo la reducción de su naturaleza elástica. La presencia de azúcar también favorece la reducción de la viscosidad y la pérdida de la consistencia de las masas (Maache-Rezzoug et al., 1998).

El efecto del contenido de almidón dañado sobre el carácter viscoelástico de las masas de galletitas se determinó durante la relajación de las masas luego de la aplicación de una deformación constante. Las curvas de relajación de las masas de galletitas obtenidas a partir de la harina H10AD y H15AD mostraron el comportamiento viscoelástico típico obtenido en masas de trigo, y todas las curvas presentaron una forma general similar a la mostrada en la Figura 5.8. Las curvas de esfuerzo (σ) en función del tiempo se ajustaron por análisis de regresión no lineal mediante un modelo reológico que combina un elemento de Maxwell y un resorte residual. El nivel de ajuste mínimo arrojó un coeficiente de determinación $r = 0,90$.

El incremento en el contenido de almidón dañado causó una significativa disminución ($p \leq 0,05$) de la rigidez de las masas, aunque el proceso de relajación de las masas no acusó diferencias. Los parámetros del modelo, módulo elástico de equilibrio (E_r), módulo elástico de Maxwell (E_1), tiempo de relajación (λ) y viscosidad newtoniana (η), mostraron un leve incremento con el almidón dañado (Tabla 5.8), aunque el análisis estadístico no reveló efectos significativos ($p \leq 0,05$), probablemente por la gran dispersión de los valores obtenidos.

Las masas formuladas a partir de la harina H10AD necesitaron un mayor esfuerzo para alcanzar la misma deformación que las masas obtenidas a partir de la muestra de harina H15AD (Figura 5.8 y Tabla 5.8), lo que se traduce en una disminución de la consistencia de las masas al aumentar el nivel de almidón dañado en el sistema. Las propiedades estructurales de este tipo de masas están determinadas por la rigidez de las partículas dispersas, por la red no continua de proteínas y por la adhesión entre las diferentes fases. Por lo tanto, es posible que los gránulos más hinchados e hidratados, como resultado de la gelatinización espontánea, presenten una menor rigidez en

comparación con los gránulos nativos, lo que afecta el comportamiento de deformación de la estructura del sistema frente a un esfuerzo aplicado.

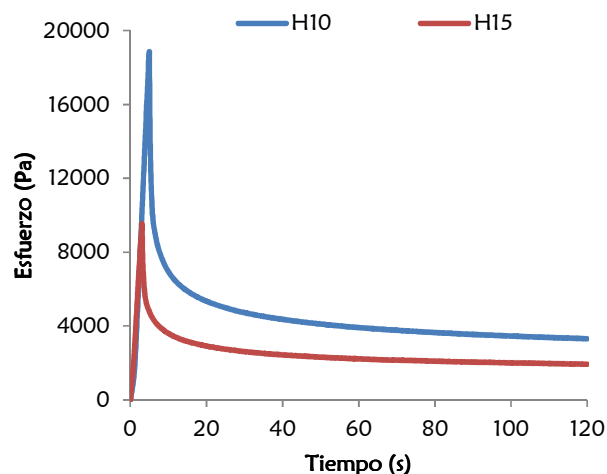


Figura 5.8: Efecto del contenido de almidón dañado sobre el comportamiento de relajación de las masas de galletitas.

Tabla 5.8. Efecto del almidón dañado sobre los parámetros de ajuste del modelo reológico para la relajación de las masas de galletitas.

Muestras	Esfuerzo máximo (Pa)	Módulo elástico de equilibrio (Pa)	Módulo elástico de Maxwell (Pa)	Tiempo de relajación (s)	Viscosidad (Pa.s)
H10AD	18682 b	12974 a	24529 a	105,4 a	2568915 a
H15AD	10601 a	16073 a	31619 a	107,5 a	3233319 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

La incorporación de α -amilasa (ALF), amilasa maltogénica (AMM) y amiloglucosidasa (AMG), en sus dosis máximas, no afectó significativamente ($p \leq 0,05$) el carácter viscoelástico de las masas formuladas con la harina H15AD (Tabla 5.9). No obstante, se registró un incremento del esfuerzo necesario para su deformación, lo que se tradujo en un aumento de la consistencia de las masas. Los valores de esfuerzo de deformación alcanzados por efecto de la adición de las enzimas superaron a los registrados por la masa preparada con la muestra de harina H10AD (Figura 5.9 y Tabla 5.9) en todos los casos, siendo la incorporación de AMG la que causó un mayor incremento en la consistencia. Por lo tanto, las incorporaciones enzimáticas lograron mitigar parcialmente los deterioros en la consistencia de las masas causados por incrementos en el contenido de almidón dañado. Como se ha detallado en otros capítulos, las enzimas amilásicas pueden acceder a los gránulos de almidón dañado

debido a los cambios que se producen sobre la superficie granular como consecuencia de la molienda. Aunque en este tipo de masa se desarrolle bajo limitadas proporciones de agua, los cambios registrados en la consistencia de las masas como resultado de la adición de enzimas, sugieren que las enzimas adicionadas a la formulación degradaron parcialmente los gránulos dañados hidratados, limitando así su capacidad para retener agua.

En términos generales, al no registrarse un efecto significativo sobre las características de relajación de las masas de galletitas como consecuencia del agregado de las enzimas en sus dosis máximas, no se procedió a la valoración de los efectos causados por la adición de las dosis mínimas en este sistema.

Existe evidencia que sostiene que el almidón no actúa como material formador de la estructura en estos sistemas, por lo que se lo ha definido como material de "relleno" ya que ocupa el espacio permaneciendo mayormente sin cambios (Walker et al., 2012; Kulp et al., 1991). A pesar de que la funcionalidad del almidón en este tipo de masas no se considere de relevancia, a partir de los resultados obtenidos y en oposición a la concepción general, es posible inferir que el almidón no es un componente despreciable dentro de este tipo de estructura, ya que sus alteraciones modificaron significativamente la consistencia del sistema.

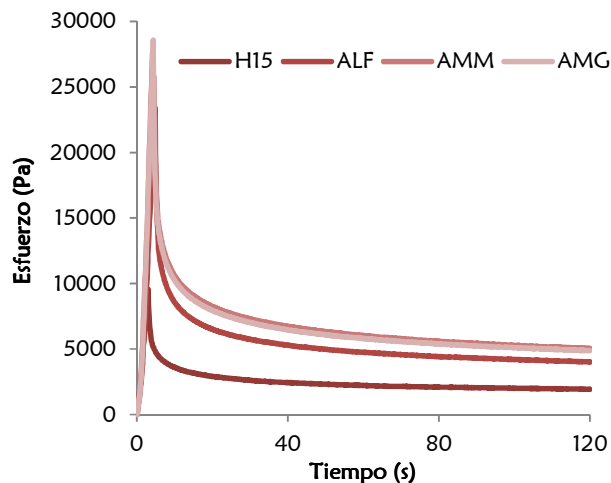


Figura 5.9: Efecto de la incorporación de enzimas sobre el comportamiento de relajación de las masas de galletitas.

Tabla 5.9. Parámetros de ajuste del modelo reológico para la relajación de las masas de galletitas formuladas con harina 15AD y enzimas.

Muestras	Esfuerzo máximo (Pa)	Módulo elástico de equilibrio (Pa)	Módulo elástico de Maxwell (Pa)	Tiempo de relajación (s)	Viscosidad (Pa.s)
H15AD	10601 a	16073 a	31619 a	107,5 a	3233319 a
H15AD + ALF	23693 b	17308 a	31840 a	104,9 a	3358373 a
H15AD + AMM	25757 bc	16083 a	31652 a	108,1 a	3429593 a
H15AD + AMG	29713 c	18452 a	34612 a	110,0 a	3805894 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

Calidad de las galletitas

La harina es el principal ingrediente en la formulación de galletitas dulces, por lo que su calidad es determinante en las características del producto final. Las variaciones en la composición de una harina afectan las propiedades reológicas de las masas, y como consecuencia de esto, las características de este tipo de producto, como estructura, textura y apariencia resultan alteradas. Las variaciones relacionadas con la calidad y la cantidad de las proteínas son las que tienen un mayor impacto sobre la calidad del producto, ya que para la obtención de este tipo de galletitas es fundamental un mínimo o nulo desarrollo de la red de gluten. La estructura de las galletitas dulces consiste en una mezcla de proteínas, almidón y azúcar fundida súper enfriada. No existe una matriz proteica continua y la grasa se encuentra presente en forma de grandes glóbulos entre los cuerpos de proteínas y almidón. La textura de este tipo de producto es típica y relativamente áspera y arenosa, y esto se debe a la coalescencia de las burbujas de gas que se forman durante la cocción. La disolución no completa de la sacarosa es un aspecto importante para la textura de las galletitas, ya que la sacarosa cristalizada en las galletitas, proveniente de la fracción no disuelta en la formación de la masa, contribuye a la textura crujiente del producto a temperatura ambiente. El agrietamiento de la superficie que presenta este tipo de producto está relacionado con los cambios fisicoquímicos que ocurren durante la cocción de la masa (Manley, 2000).

El almidón dañado afectó negativamente la calidad de las galletitas, al igual que lo expresado por las harinas analizadas en el primer capítulo, y a lo publicado por Moraghi et al. (2011) y Pareyt y Delcour (2008). En lo que respecta a las dimensiones del producto, se registró una caída significativa ($p \leq 0,05$) del diámetro y un incremento ($p \leq 0,05$) de la altura, y en consecuencia, una disminución ($p \leq 0,05$) del factor galletita. Sin embargo, el contenido de humedad y la firmeza de las galletitas no se vieron afectados significativamente ($p \leq 0,05$) por las variaciones en el contenido de almidón dañado (Tabla 5.10). Según los datos registrados, las galletitas elaboradas con la harina H10AD presentaron los mejores parámetros de calidad galletitera, ya que mostraron mayores valores de factor

galletita, sumado a que en general esta harina presentó los valores más bajos de absorción según el perfil de capacidad de retención de solventes (SRC) (Moiraghi et al., 2011).

Durante el horneado de las galletitas se produce el calentamiento de la masa, y la fase rica en grasa y azúcar funde, incrementando la capacidad de fluir del sistema. El aumento de la temperatura de la masa promueve una mayor solubilización de la sacarosa disuelta en agua, lo que favorece a la disminución de la viscosidad de la masa. Como consecuencia de este fenómeno las piezas comienzan a expandirse y extenderse, observándose un incremento en el diámetro y espesor. Con el progresivo calentamiento, la velocidad de expansión se ve reducida debido a un incremento mayor en la altura, que tiene como principal responsable la producción de dióxido de carbono por el agente leudante (bicarbonato de sodio), como así también, pero en menor medida, por el aumento de la presión de vapor de agua. Este incremento de volumen de las piezas se produce hasta que la masa colapsa, y a partir de este momento, la altura se reduce hasta su valor final. Por lo tanto, el diámetro y la altura de la galletita van a estar determinados por la velocidad de extensión de la masa y por el tiempo de fijación de la estructura. A lo largo de todo este proceso, cuando la temperatura en la masa supera los 60 °C una fracción del almidón gelatiniza parcialmente debido a las limitadas condiciones de humedad, y posteriormente, debido al continuo calentamiento del sistema, cuando la temperatura supera los 90 °C las proteínas coagulan y se produce la deshidratación del sistema, lo que resulta en la estructura final de la galletita (Walker et al., 2012; Manley, 2000). Teniendo en cuenta los cambios físicos y químicos que ocurren durante el proceso de cocción de las galletitas, es posible establecer una relación entre las reducciones en el diámetro de las galletitas causados por el incremento en el contenido de almidón dañado. A pesar de que la viscosidad de las masas no acusó diferencias significativas, este parámetro presentó una tendencia a incrementar como consecuencia del incremento en el almidón dañado. En función de esto, es posible que esta característica del sistema al inicio del proceso de cocción resulte en un detrimento en la capacidad de fluir de la masa, lo que afecta el proceso de expansión de las piezas. En este sentido, si las piezas tienden a expandirse en menor proporción durante el horneado, el espesor final de las galletitas será mayor.

Pese a que las galletitas H10AD presentaron un mayor FG, la firmeza de las galletitas formuladas con H10AD y H15AD no acusaron diferencias significativas, aunque se observó una tendencia a incrementar de este parámetro textural. En este sentido, otros autores (Moiraghi et al., 2011; Pareyt et al., 2008) han demostrado que la dureza de la galletitas presenta una correlación inversa con el factor galletita, lo cual se ha relacionado con un producto de mayor espesor. Teniendo en cuenta esta asociación, es posible sugerir que la tendencia de incremento observada en la firmeza de las galletitas está relacionada con el incremento en el espesor del producto.

Tabla 5.10. Parámetros de calidad de las galletitas.

Muestras	Largo (cm)	Altura (cm)	FG	Humedad (%)	Firmeza (Kgf)
H10AD	24,2 b	4,7 a	5,1 b	5,7 a	5,6 a
H15AD	22,2 a	5,6 b	3,9 a	5,9 a	6,2 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

Las harinas para galletitas dulces se consideran de mejor calidad si favorecen el incremento del diámetro y la disminución del espesor. Además de estas dos condiciones, es necesario que generen un alto y uniforme agrietamiento de la superficie. En consecuencia, las características superficiales de las galletitas se evaluaron a partir de la fracción de área (FA) de agrietamiento y la dimensión fractal de la textura superficial (D), parámetros obtenidos mediante un análisis de imágenes. La fracción de área es un parámetro que está relacionado con la proporción de la superficie de la galletita que presenta grietas, mientras que, la dimensión fractal de la textura superficial es un parámetro que provee una descripción numérica de la morfología de la superficie de las galletitas y está asociado con estructuras complejas e irregulares. Hasta ahora, no se han registrado numerosas publicaciones relacionadas con galletitas en donde se reporte la utilización del análisis de imágenes como metodología de estudio, a excepción de lo informado por Davidson et al. (2001), quienes mediante un análisis de imágenes digitales de galletas con chocolate estimaron características físicas, tales como tamaño, forma y color, y la fracción de la superficie superior que poseía chocolate (Brosnan y Sun, 2004), y lo publicado por Stevenson et al. (2010), quienes mediante un análisis digital evaluaron diferentes patrones de agrietamiento de la superficie de galletitas dulces elaboradas con harinas de trigo blando de diferentes calidades para la producción de galletitas.

En relación al parámetro fracción de área de agrietamiento (FA), no se ha informado la utilización de este parámetro como herramienta descriptiva en el análisis de galletitas, aunque numerosos estudios relacionados a la calidad panadera han descripto la aplicación de este parámetro al análisis de miga de pan, donde la fracción de área representa la proporción del área total de la miga que es ocupada por alveolos (Sciarini et al., 2012; Steffolani et al., 2012a; Rocca et al., 2012; Ribotta et al., 2010). La dimensión fractal de la textura superficial es un parámetro que se ha sido utilizado para explicar cambios en la estructura de productos panificados como consecuencia de su procesamiento (Pérez-Nieto et al., 2010; Quevedo et al., 2002), sin embargo, no se han registrado antecedentes de la utilización de esta herramienta descriptiva en el estudio de galletitas.

El contenido de almidón dañado no afectó ($p \leq 0,05$) la fracción de área de agrietamiento (FA) y la dimensión fractal superficial (D) de las galletitas (Tabla 5.11). El agrietamiento superficial de las galletitas está asociado con el colapso de la masa durante el horneado, la evaporación superficial del agua y con la cristalización de la sacarosa en la superficie (Pareyt y Delcour, 2008). A pesar de que

galletas pequeñas son asociadas con superficies menos agrietadas (Gaines y Finney, 1989), la proporción del área que corresponde a grieta en la superficie de las galletitas (FA) no pudo ser relacionada con ningún parámetro de calidad galletitera, ni tampoco con los parámetros de calidad físicoquímicos de las harinas, ya que no se registraron correlaciones significativas con ninguno de estos parámetros. Sin embargo, se encontró una correlación negativa y significativa ($p \leq 0,05$) entre la irregularidad superficial de las galletitas (D) y el contenido de almidón dañado, índice de retención de agua, sacarosa y ácido láctico. Estos resultados muestran que existe una fuerte e inversa asociación entre el contenido de almidón dañado y la rugosidad de la superficie de las galletitas, lo que indica que incrementos en el contenido de almidón dañado están fuertemente relacionados con un deterioro en la complejidad superficial, a pesar de que no se hayan registrado diferencias significativas en este parámetro entre las galletitas elaboradas. Esta tendencia, también se expresó con el índice de retención de agua y sacarosa, lo que indica que el resto de los componentes hidrofílicos de las harinas presentan una gran influencia sobre el deterioro de la irregularidad de la superficie de las galletitas. La correlación inversa establecida entre el parámetro D y el índice de retención de ácido láctico sugiere que la calidad proteica de las harinas está asociada con las características de la superficie de las galletas, a través de la existencia de una asociación entre las características de las gluteninas y la fuerza del gluten. Se ha establecido que las interacciones proteicas contribuyen a los atributos texturales y estructurales de las galletitas y en este sentido, Pareyt et al. (2010) han informado un aumento de la resistencia al colapso debido al entrecruzamiento gliadina-glutenina, mientras que, Chevallier et al. (2002) sugirieron que la agregación de las proteínas por sí misma es insuficiente para evitar el colapso durante la cocción.

La evaporación del agua de las galletitas durante la cocción también contribuye con el nivel de agrietamiento superficial del producto. Por lo que una mayor retención de agua por parte del sistema resultaría en un detrimento del agrietamiento de la superficie de las galletitas. A pesar de que el almidón dañado afecta la distribución de agua en el sistema, la cantidad de agua evaporada de las piezas no resultó ser alterada por este factor, ya que las galletitas no registraron variaciones en el contenido de humedad en el producto final (H10AD= 5,7%; H15AD= 5,9%)

Durante el horneado, las reacciones de Maillard que ocurren entre los aminoácidos de las proteínas y los azúcares reductores de los carbohidratos son la principal causa del desarrollo de color en las galletitas (Belitz y Grosch, 1999) y por lo tanto, estas reacciones juegan un rol importante en el proceso de producción de este tipo de producto. El color en las galletitas se desarrolla durante las reacciones químicas finales que este fenómeno involucra, aunque es importante destacar que la caramelización de la sacarosa también influye sobre el color final de esta clase de producto (Chan, 2006), sobre todo en la superficie de las galletitas, debido a la cristalización de la sacarosa que se produce por la deshidratación de la superficie durante el horneado. El color de una galletita es una característica sensorial de relevancia ya que influye sobre su aceptabilidad.

En las galletitas analizadas, el almidón dañado afectó significativamente ($p \leq 0,05$) la luminosidad (L^*) superficial de las galletitas, sin embargo, no se observaron variaciones significativas ($p \leq 0,05$) en la intensidad rojo-verde (a^*) e intensidad amarillo-azul (Tabla 5.11). Los cambios en la luminosidad de la superficie de las galletitas indican que incrementos en el contenido de almidón dañado tornan más claras las superficies de las galletitas. Moiraghi et al. (2011) informaron que la luminosidad superficial de las galletitas se relaciona negativamente con el factor galletita ($r = -0,67$; $p \leq 0,01$) y positivamente con el contenido de almidón dañado de la harina ($r = 0,48$; $p \leq 0,01$). Además de esto, estos autores demostraron que las harinas con mayor capacidad de retención de agua, expresada a través de los índices de capacidad de retención de solvente, producen galletitas con mayor luminosidad. Teniendo en cuenta estas relaciones, es posible inferir que los cambios en la luminosidad causados por efecto del incremento en el contenido de almidón dañado podrían estar relacionados con la disminución en el diámetro de las galletitas.

Ribotta et al. (2002) analizaron y compararon las evaluaciones de color realizadas por jueces y los parámetros medidos mediante el espectrofotómetro, y encontraron que las galletitas que presentaron valores de luminosidad (L^*) e intensidad de color amarillo-azul (b^*) superiores a 55-57 y 20-22, respectivamente, eran consideradas aceptables. Por lo tanto, en función de estos límites es posible afirmar que pese a los cambios causados por el almidón dañado sobre la luminosidad, el color superficial de las galletitas obtenidas se encuentra dentro de los parámetros considerados aceptables.

Tabla 5.11. Efecto del almidón dañado sobre la superficie y color de las galletitas.

Muestras	Dimensión fractal	Fracción de Área (%)	Color de la superficie		
			L^*	a^*	b^*
H10AD	1,21 a	3,92 a	71,4 a	5,9 a	30,9 a
H15AD	1,18 a	3,66 a	73,8 b	6,2 a	31,3 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

En lo que respecta a la incorporación de las enzimas α -amilasa (ALF), amilasa maltogénica (AMM) y amiloglucosidasa (AMG), en sus dosis máximas en las masas formuladas con la muestra de harina H15AD, en términos generales, no se registraron cambios significativos ($p \leq 0,05$) sobre las propiedades de calidad de las galletitas como resultado de la acción enzimática (Tabla 5.12 y Tabla 5.13). Únicamente con la adición de ALF se observó un incremento sobre la fracción de agrietamiento de la superficie de las galletitas. El agregado de las enzimas en las dosis empleadas no alcanzó a recomponer el detrimento generalizado en calidad de las galletitas causado por el almidón dañado. Walker et al. (2012) y Kulp et al. (1991) han informado que durante la cocción de las galletitas el almidón no sufre transiciones térmicas detectables por calorimetría diferencial de barrido debido a las

limitadas condiciones de humedad. No obstante, se ha observado que una pequeña proporción de gránulos de almidón en las galletitas pierde parte de su birrefringencia, indicando que, a pesar de que las condiciones de disponibilidad de agua sean escasas, existe la posibilidad de que algunos gránulos de almidón gelatinicen parcialmente durante los cortos tiempos de cocción y las altas temperaturas que involucran la cocción de las galletitas. La temperatura interna de las galletitas durante el horneado luego de los dos primeros minutos de cocción alcanza los 95 °C aproximadamente (Walker et al., 2012; Manley 2000), por lo que a esta temperatura las tres enzimas se inactivan, perdiendo de esta manera su capacidad de hidrólisis. En este sentido, teniendo en cuenta que la susceptibilidad enzimática del almidón no resulta significativamente modificada durante el proceso de cocción, respecto a las condiciones establecidas inicialmente en la masa, y que las altas temperaturas alcanzadas durante los primeros estadios del horneado causan una inactivación de las enzimas, es posible concluir que estos factores minimizaron o no permitieron el desarrollo de la actividad enzimática esperada.

Al no observarse un efecto significativo del agregado de las dosis máximas de las enzimas sobre los parámetros de calidad galletitera, no se procedió a evaluar el efecto de las dosis mínimas de las enzimas.

Tabla 5.12. Efecto de las enzimas sobre los parámetros de calidad de las galletitas formuladas con la harina H15AD.

Muestras	Largo (cm)	Altura (cm)	FG	Humedad (%)	Firmeza (Kgf)
H15AD	22,2 a	5,6 a	3,9 a	5,9 a	6,2 a
H15AD + ALF	21,7 a	5,4 a	4,0 a	6,4 a	6,9 b
H15AD + AMM	21,6 a	5,4 a	4,0 a	6,0 a	6,8 ab
H15AD + AMG	22,1 a	5,6 a	4,0 a	6,1 a	6,8 ab

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

Tabla 5.13. Efecto de las enzimas sobre la superficie y color de las galletitas formuladas con la harina H15AD.

Muestras	Dimensión fractal	Fracción de Área (%)	Color de la superficie		
			L*	a*	b*
H15AD	1,18 a	3,66 a	73,8 a	6,2 a	31,3 a
H15AD + ALF	1,20 a	5,63 b	74,6 a	5,9 a	30,2 a
H15AD + AMM	1,25 a	4,08 a	73,6 a	6,2 a	29,8 a
H15AD + AMG	1,12 a	2,80 a	75,4 a	5,7 a	30,9 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

3.2 Pan

Comportamiento de las masas durante la fermentación

El proceso de producción de pan involucra numerosas etapas, siendo las más relevantes el mezclado/amasado, fermentación y cocción. Durante la fermentación la masa incrementa su volumen y además, se producen numerosos procesos físico-químicos los cuales resultan en cambios reológicos y organolépticos que son característicos de este sistema. La expansión de la masa a lo largo de este periodo se debe a la actividad fermentativa de las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), las cuales a través de este proceso consumen monosacáridos (glucosa, fructosa, manosa y galactosa) y disacáridos (maltosa y sacarosa), provenientes en general de la hidrólisis enzimática del almidón, y producen dióxido de carbono. Para que estos cambios tengan lugar, el proceso de fermentación debe llevarse a cabo a temperatura (30-45 °C) y humedad relativa (85%) controlada. El desarrollo de las masas panarias se ve afectado por las características reológicas de las masas (extensibilidad, viscoelasticidad, adhesividad) ya que de estas propiedades depende la capacidad de la masa para expandirse y retener el gas. Durante la fermentación, el gas producido por la actividad de las levaduras difunde a las burbujas de aire incorporadas durante el amasado, incrementando la presión y produciendo su expansión. La estabilidad y el crecimiento de estas burbujas determinan el volumen final de la pieza de pan, así como también, la textura del producto horneado. Es importante tener en cuenta que el número de burbujas de gas en la masa no incrementa durante fermentación, durante este estadio del proceso únicamente cambian su tamaño (Ktenioudaki et al., 2011; Slumier, 2005; Dobraszczyk y Morgenstern, 2003; He y Hosene, 1991).

Las propiedades fermentativas de las masas de pan preparadas con las muestras de harina H10AD y H15AD se evaluaron mediante la determinación simultánea del aumento de la altura de la masa y de la producción y retención de gas durante la fermentación. Los cambios ocurridos durante la fermentación se determinaron a través de la curva de desarrollo de la masa y retención gaseosa generadas por el dispositivo de medición. La curva de desarrollo de la masa provee la máxima altura que la masa es capaz de adquirir durante la fermentación (H_m), el tiempo que le toma al sistema alcanzar la altura máxima (T_1) y la altura de la masa al final de este proceso (h). A partir de esta curva, además de estos parámetros, es posible determinar la velocidad de desarrollo de la masa entre los 10 y 40 min de fermentación (VD). La curva de retención gaseosa, informa sobre la presión dentro del recinto de fermentación. Mientras la masa se desarrolla y retiene el dióxido de carbono producido durante la fermentación la presión del recinto aumenta hasta un punto máximo (H_m'); el tiempo que le involucra al sistema alcanzar este punto (T_1') y el momento en el que la masa se torna permeable al gas por efecto de la presión (T_x) también son registrados. La tasa de producción gaseosa (TPG) durante los primeros 10 min del proceso de fermentación puede ser calculada mediante esta gráfica. El volumen de gas retenido por la masa durante la fermentación puede ser estimado a partir de esta gráfica.

El contenido de almidón dañado afectó ($p \leq 0,05$) las propiedades de fermentación de las masas (Tabla 5.15 y 5.16), lo que provocó un deterioro del desempeño de las masas. La curva de desarrollo de masa indicó que la presencia de un mayor contenido de almidón dañado causó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de la altura máxima desarrollada por la masa y un incremento considerable ($p \leq 0,05$) en el tiempo necesario para alcanzar dicha altura. Sin embargo, la velocidad de desarrollo de la masa durante los primeros 30 min de fermentación no resultó afectada. La altura de la masa al final del proceso de fermentación disminuyó ($p \leq 0,05$) por el incremento en el contenido de almidón dañado (Tabla 5.15 y Figura 5.10).

A partir de la curva de retención gaseosa se observó que el incremento en el contenido de almidón causó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la presión máxima y un marcado incremento ($p \leq 0,05$) en el tiempo necesario para lograr dicha presión. No obstante, en el instante donde se registró la máxima presión en cada masa, la altura de la masa con mayor contenido de almidón dañado fue mayor (H masa T1'). Ambas masas (H10AD y H15AD) se permeabilizaron al mismo tiempo, sin embargo, al momento de ruptura, la masa con mayor almidón dañado presentó menor altura (Hmasa Tx). El aumento en el almidón dañado afectó la tasa de producción gaseosa, se registró una caída de la velocidad de producción de dióxido de carbono, y una disminución significativa en el volumen de dióxido de carbono retenido por la masa por efecto del almidón dañado (Tabla 5.16 y Figura 5.10).

Tabla 5.15. Efecto del almidón dañado sobre los parámetros de la curva de desarrollo de la masa.

Muestras	Desarrollo de la masa			
	Hm (mm)	T1 (min)	h (mm)	VD
H10AD	19,4 b	78,8 a	20,6 a	0,28 a
H15AD	16,0 a	180,0 b	16,0 b	0,22 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA). Hm: Altura máxima. T1: Tiempo en alcanzar Hm. h: Altura al final de la fermentación. VD: Velocidad de desarrollo

Tabla 5.16. Efecto del almidón dañado sobre los parámetros de la curva de retención gaseosa de la masa.

Muestras	Retención Gaseosa						
	Hm' (mm)	T1' (min)	Tx (min)	Vr (ml)	TPG (mm/min)	H masa Tx (mm)	H masa T1' (mm)
H10AD	34,6 b	43,5 a	101,2 a	750,5 b	1,4 b	18,0 b	9,7 a
H15AD	27,9 a	67,5 b	101,2 a	647,5 a	1,1 a	14,7 a	13,2 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA). Hm': Presión máxima. T1': Tiempo en alcanzar Hm'. Tx: Momento de permeabilización. Vr: Volumen de gas retenido. TPG: Tasa de producción gaseosa.

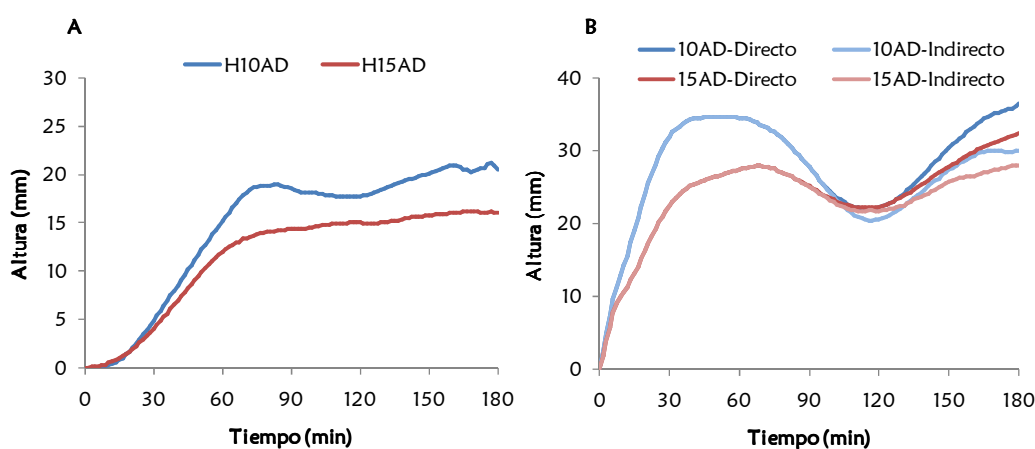


Figura 5.10: Efecto del almidón dañado sobre las propiedades de fermentación de las masas. A: Curva de desarrollo, B: Curva de retención gaseosa.

La altura máxima alcanzada por la masa es un parámetro que está relacionado con el aumento del volumen durante la fermentación, y con el volumen final del producto. La altura máxima es un indicativo de la performance de la levadura y de la estructura del sistema. Una mayor altura de la masa durante la fermentación sugiere que la combinación del gas producido y la microestructura del sistema favorecieron el mantenimiento de la macroestructura de la pieza de masa fermentada. En función de esto, un limitado desarrollo de la altura de la masa durante la fermentación puede estar asociado a una disminución en la producción de gas, una excesiva resistencia de la masa durante la expansión, o a una red de gluten menos desarrollada la cual tiende a reducir la capacidad de retención gaseosa durante la fermentación.

El hecho de que el incremento en el contenido de almidón dañado produce masas más adhesivas, resistentes y viscosas, pero menos extensibles y elásticas, quedó confirmado en el capítulo 2. La reducción en la extensibilidad y el incremento en la resistencia de las masas explican la disminución de la altura máxima de las masas y el incremento en el tiempo necesario para alcanzarla.

La limitada expansión de las masas durante la fermentación es la consecuencia de una red de gluten debilitada, la que se relaciona con un gluten menos desarrollado como consecuencia de una menor disponibilidad de agua durante la formación de la red debido a la gran capacidad de absorción de agua que presentan los gránulos dañados de almidón. Esta condición, afectó la capacidad de retención gaseosa de las masas, causando una disminución en el volumen de dióxido de carbono retenido por el sistema. La porosidad de las masas está relacionada con su capacidad para ser estirada en membranas delgadas, lo que su vez, está asociado con la calidad y cantidad de la red de proteínas. En este sentido, el hecho de que el incremento en el contenido de almidón dañado no haya alterado el momento de permeabilización de las masas podría deberse a que ambas harinas no se diferenciaron significativamente respecto al contenido de gluten húmedo y seco.

Las incorporaciones enzimáticas en las masas formuladas con la muestra de harina H15AD modificaron las variables asociadas al proceso de fermentación de las masas, a excepción de la adición de la amilasa maltogénica (AMM) que no modificó significativamente ($p \leq 0,05$) las propiedades fermentativas del sistema. Esta enzima, en su dosis máxima no causó efectos significativos sobre ninguna variable evaluada durante la fermentación. En consecuencia, no se evaluaron los efectos de la dosis mínima de AMM y no se continuó con su utilización. A lo largo del capítulo 2 quedó demostrado que la adición de amilasa maltogénica no ocasiona ningún efecto relevante sobre las características reológicas ni sobre el perfil de azúcares de las masas, lo que se condice con lo observado a partir de estos resultados.

El agregado de las enzimas α -amilasa (ALF), amiloglucosidasa (AMG) y sus mezclas, en sus dosis máximas y mínimas, causó efectos significativos sobre las propiedades de las masas durante la fermentación. La altura máxima de las masas incrementó ($p \leq 0,05$) con el agregado de estas enzimas y sus mezclas, destacándose las mezclas de ALFMax+AMGMin y ALFMax+AMGMax. Sin embargo, la adición de las enzimas no afectó el tiempo involucrado en alcanzar la altura máxima. La altura de las masas al final del proceso de fermentación incrementó ($p \leq 0,05$) en todos los casos, mientras que la incorporación de ALFMax+AMGMin y de ALFMax+AMGMax promovieron un mayor desarrollo. En general, ninguna adición enzimática modificó la velocidad de desarrollo de las masas (Tabla 5.17 y Figura 5.11). Las curvas de retención gaseosa mostraron que el agregado de las enzimas incrementó la presión máxima alcanzada durante la fermentación, a excepción de la adición de α -amilasa (ALF) que no causó efectos significativos. Las adiciones que se destacaron en este punto fueron AMGMax y ALFMin+AMGMin. El tiempo comprendido en alcanzar esta máxima presión de dióxido carbono en el sistema fue modificado por las enzimas, en general se registró un incremento de este parámetro, aunque, la adición de ALFMin y AMGMax ocasionó una disminución, mientras que el agregado de ALFMin+AMGMin no alteró este parámetro. La incorporación de las enzimas no causó variaciones sobre el momento de permeabilización de las masas, no obstante, sólo la adición de ALFMin, AMGMax y ALFMin+AMGMin causaron una permeabilización de las masas a un menor tiempo. El

volumen de gas retenido por las masas (V_r) incrementó, a excepción de la incorporación de ALF que no tuvo efecto sobre este parámetro, y destacándose la adición de AMGMax y ALFMin+AMGMin. La tasa de producción gaseosa disminuyó con los agregados enzimáticos, aunque AMGMin y ALFMin+AMGMin no causaron alteraciones sobre este parámetro (Tabla 5.18 y Figura 5.12).

Tabla 5.17. Efecto de las enzimas sobre los parámetros de desarrollo de la masa formulada con H15AD durante la fermentación.

Muestras	Desarrollo de la masa			
	Hm	T1	h	VD
H15AD	16,0 a	180,0 a	16,0 a	0,22 bc
H15AD+ALFMax	23,1 cde	180,0 a	23,1 cde	0,16 ab
H15AD+ALFMin	20,6 b	180,0 a	20,6 bcd	0,19 abc
H15AD+AMMMMax	16,8 a	180,0 a	16,8 ab	0,18 ab
H15AD+AMGMax	20,9 bc	180,0 a	20,9 bcd	0,25 c
H15AD+AMGMin	19,6 b	180,0 a	19,6 abc	0,22 bc
H15AD+ALFMin+AMGMin	23,3 def	180,0 a	23,3 cde	0,25 c
H15AD+ALFMax + AMGMin	25,6 f	180,0 a	25,6 e	0,21 bc
H15AD+ALFMin + AMGMax	21,9 bcd	180,0 a	21,9 cde	0,14 a
H15AD+ALFMax+ AMGMax	24,7 ef	180,2 a	24,7 de	0,18 ab

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA). Hm: Altura máxima. T1: Tiempo en alcanzar Hm. h: Altura al final de la fermentación. VD: Velocidad de desarrollo.

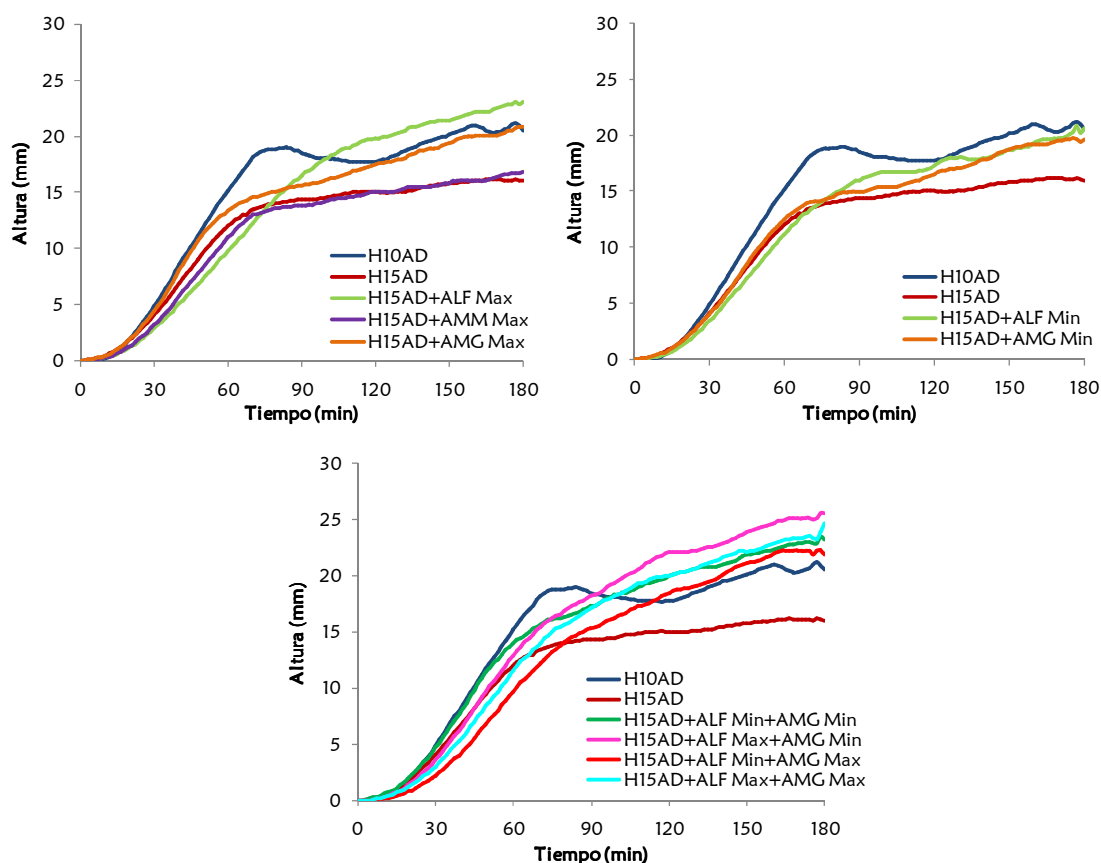


Figura 5.11: Efecto del agregado de enzimas sobre las curvas de desarrollo de las masas.

Tabla 5.18. Efecto de las enzimas sobre los parámetros de retención gaseosa de la masa formulada con H15AD durante la fermentación.

Muestras	Retención gaseosa				
	Hm'	Tl'	Tx	Vr	TPG
H15AD	27,9 a	67,5 c	101,2 cd	647,5 a	1,05 e
H15AD + ALFMax	26,0 a	75,0 e	117,0 d	613,0 a	0,67 a
H15AD + ALFMin	26,0 a	64,5 b	70,5 ab	604,0 a	0,71 ab
H15AD + AMMMax	26,7 a	67,5 c	81,0 abc	604,0 a	0,69 a
H15AD + AMGMax	38,4 c	61,5 a	63,0 a	869,0 d	0,86 cd
H15AD + AMGMin	36,6 bc	76,5 e	79,5 abc	806,0 c	0,96 de
H15AD + ALFMin + AMGMin	37,8 c	66,0 bc	69,0 ab	843,0 cd	0,82 bc
H15AD + ALFMax + AMGMin	37,1 c	75,0 e	76,5 abc	839,0 cd	0,94 de
H15AD + ALFMin + AMGMax	33,5 b	88,5 f	93,0 bcd	746,0 d	0,60 a
H15AD + ALFMax+ AMGMax	35,3 bc	72,8 d	76,5 abc	814,0 c	0,67 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA). Hm': Presión máxima. Tl': Tiempo en alcanzar Hm'. Tx: Momento de permeabilización. Vr: Volumen de gas retenido. TPG: Tasa de producción gaseosa.

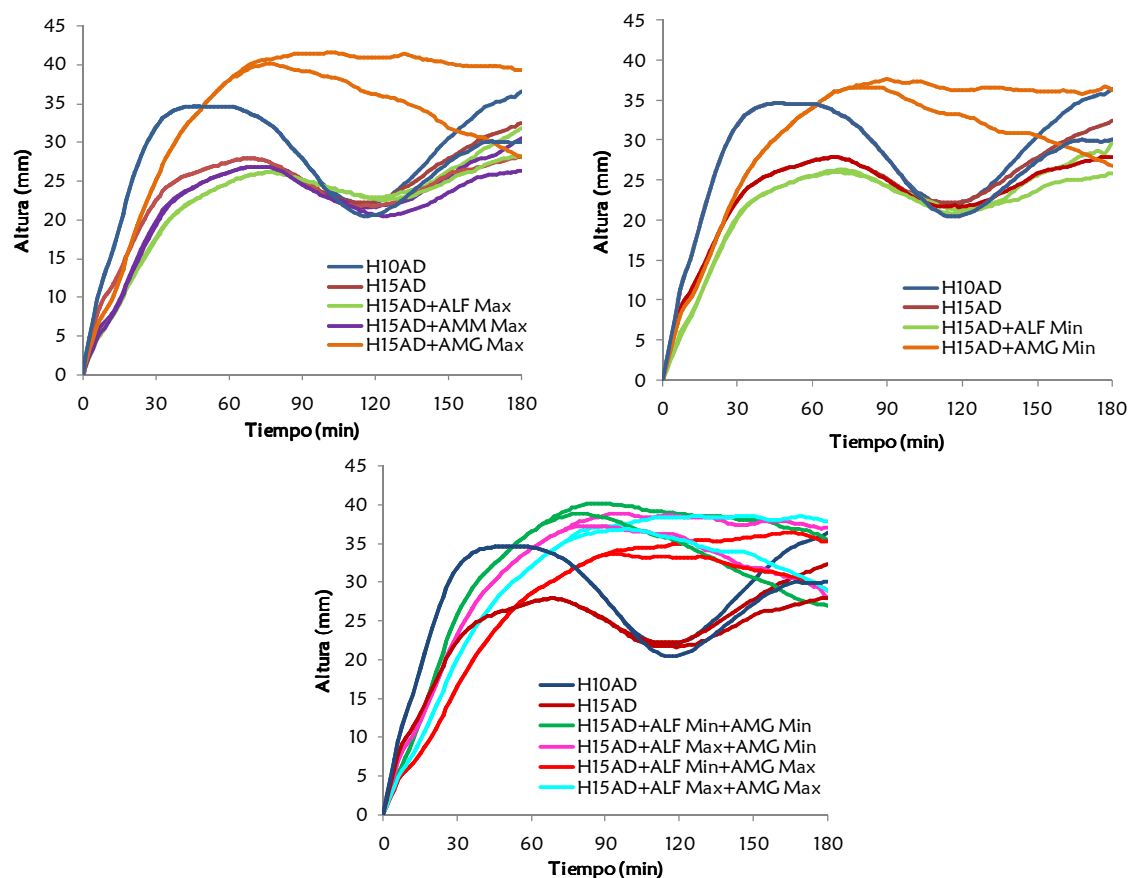


Figura 5.12: Efecto del agregado de enzimas sobre las curvas de retención gaseosa de las masas.

Las mejoras registradas sobre el desempeño de las masas con alto contenido de almidón dañado durante la fermentación debido a la incorporación de enzimas, estuvieron relacionadas con el efecto de las enzimas sobre las propiedades reológicas de las masas y con la mayor disponibilidad de azúcares fermentables que se generan bajo estas condiciones, según se demostró en el capítulo 2.

En el proceso de fermentación la adición de ALFMax+AMGMin y ALFMax+AMGMax mejoró el volumen de las masas, mientras que, la incorporación de AMGMax y ALFMin+AMGMin favoreció una mayor producción de volumen de dióxido de carbono, aunque, ambas redujeron la capacidad de retención gaseosa de las masas por permeabilización a tiempos más cortos. Los resultados analizados indicaron que la α -amilasa y amiloglicosidasa son las enzimas más convenientes a la hora de procurar una mejora sobre el desempeño durante la fermentación de masas formuladas a partir de harinas con altos contenido de almidón dañado.

Calidad de Pan: Optimización de la formulación del pan a partir del uso de harinas con altos contenidos de almidón dañado mediante el agregado de enzimas

Hasta el momento se analizó el efecto de las enzimas α -amilasa (ALF), amilasa maltogénica (AMM) y amiloglucosidasa (AMG), y sus mezclas sobre los parámetros de calidad de pan y sobre los cambios en las propiedades reológicas del sistema. El deterioro en la calidad panadera de las harinas causado por el incremento del contenido de almidón dañado quedó demostrado en el primer capítulo, mientras que, el efecto del almidón dañado sobre las propiedades reológicas de las masas, con y sin el agregado de las enzimas, en el segundo capítulo. A partir de los resultados obtenidos, se continuó con el análisis del efecto conjunto de la combinación del almidón dañado y de las enzimas amilolíticas sobre la calidad del pan. Se analizó la contribución de cada variable sobre los parámetros de calidad panadera tales como volumen de pan, relación de forma, firmeza y estructura de la miga, y color de la corteza. En función de esto, se estableció la combinación más adecuada de las variables para obtener un producto de óptimas características, y además se determinó la combinación óptima de enzimas para un elevado nivel de almidón dañado.

A. Efecto de la combinación del almidón dañado y enzimas sobre los parámetros de calidad del pan

Durante la cocción de las masas panarias los eventos más importantes que dan origen a las características del producto final son el incremento de volumen de las piezas, la formación de la corteza, la inactivación de enzimas y levaduras, la coagulación de las proteínas y la gelatinización parcial del almidón (Pylar, 1988). A partir de esto, se entiende que el pan es un producto complejo que se obtiene como resultado de una suma de eventos e interacciones entre los principales constituyentes. El pan es un sólido esponjoso inestable y elástico. La parte sólida de este producto posee una fase continua, compuesta por la red elástica que resulta de la formación del gluten y por los polímeros de almidón lixiviados durante la gelatinización, principalmente de amilosa; y una fase discontinua constituida por los gránulos de almidón inmersos, gelatinizados, hinchados y deformados (Gray y Bemiller, 2003).

En la producción de pan se busca obtener un producto de gran volumen y de miga tierna, esponjosa y con una estructura uniforme. También resulta de gran interés la textura del pan, parámetro que se relaciona directamente con la aceptación del consumidor. La corteza de pan tiene que ser crujiente a la mordida, y por el contrario, la miga de pan debe de ser esponjosa, suave y elástica, y poseer una estructura porosa y aireada (Cauvain y Young, 2000). El color de la corteza de pan también es un atributo importante dentro de las preferencias del consumidor. En general la corteza de pan se caracteriza por tener baja humedad y un color tostado-pardo, el cual es resultado de las reacciones de Maillard y de caramelización que tienen lugar durante la cocción.

Se elaboraron panes con las harinas H9AD, H11AD y H14AD sin el agregado de ningún aditivo con el propósito de verificar la calidad del pan obtenido a partir de estas harinas. Las rodajas de los

panes más representativos se presentan en la Figura 5.13. Los panes elaborados mostraron un deterioro en calidad panadera con el incremento en el contenido de almidón dañado. Se determinó una caída significativa ($p \leq 0,05$) del volumen específico de las piezas de pan, un incremento ($p \leq 0,05$) en la relación de forma de las hogazas y un aumento ($p \leq 0,05$) de la firmeza de la miga, sin embargo, no se registraron cambios en el color de la corteza (Tabla 5.19). En lo que respecta a las características de la miga, se registró una disminución ($p \leq 0,05$) de la fracción de área ocupada por alveolos, una reducción ($p \leq 0,05$) de su perímetro y diámetro, y un incremento ($p \leq 0,05$) de su circularidad. La uniformidad de la miga incrementó ($p \leq 0,05$) con el almidón dañado, y en este mismo sentido, la dimensión fractal disminuyó ($p \leq 0,05$) (Tabla 5.20). Las imágenes de las migas más representativas para cada caso se presentan en la Figura 5.14.

Estos resultados coinciden con lo informado en el capítulo 1, donde se demostró que los incrementos en el contenido de almidón dañado causan un significativo deterioro de la calidad del pan. La razón por la que la calidad de este tipo de producto se ve afectada está básicamente relacionada con un debilitamiento de la estructura de la masa, como se ha detallado en el capítulo 2.

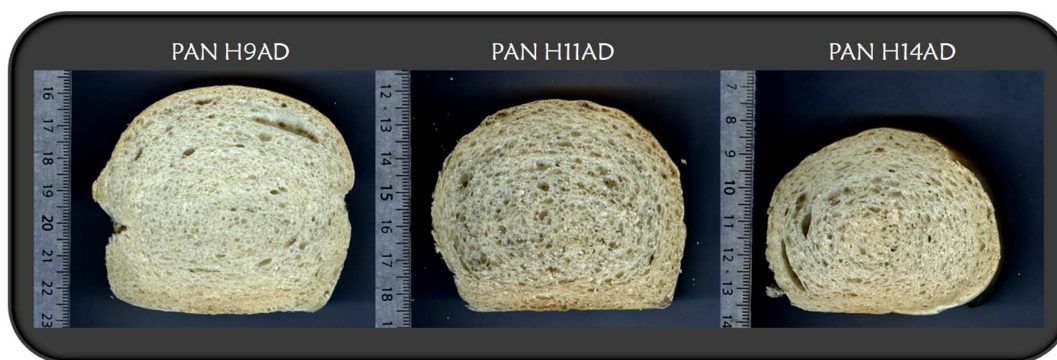


Figura 5.13: Efecto del almidón dañado sobre la calidad de los panificados.

Tabla 5.19. Parámetros de calidad de los panes formulados con las harinas H9AD, H11AD y H14AD.

Muestra	VE (g/cm ³)	RF (cm)	L*	a*	b*	Firmeza (gf)
H9AD	3,8 b	0,83 a	73,4 a	5,9 a	30,1 a	1248 a
H11AD	3,6 b	0,81 a	71,5 a	5,9 a	29,0 a	1639 b
H14AD	2,5 a	0,93 b	72,0 a	5,5 a	29,4 a	1950 c

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

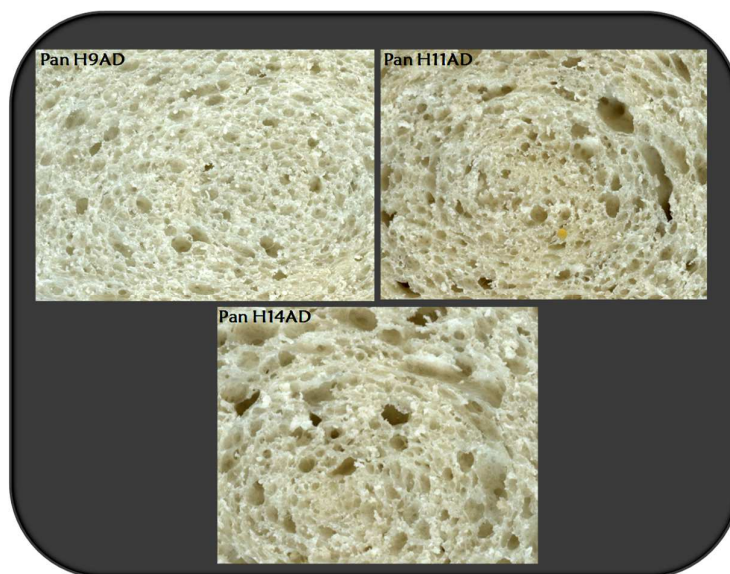


Figura 5.14: Fracción de la superficie de la miga de los panes controles formulados con H9AD, H11AD y H14AD.

Tabla 5.20. Características estructurales de la miga.

Muestra	Fracción de área (%)	Perímetro	Circularidad	Diámetro de Feret	Dimensión fractal	Uniformidad
H9AD	37,8 b	0,74 b	0,28 a	0,14 b	1,80 b	16,4 a
H11AD	38,4 b	0,64 b	0,38 b	0,14 b	1,81 b	13,3 a
H14AD	33,9 a	0,47 a	0,46 c	0,12 a	1,78 a	32,1 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)

La disminución en el volumen de las piezas de pan está relacionada con la reducción en la altura y el ancho de las hogazas. Los aumentos observados en la relación de forma en los panes obtenidos con mayor contenido de almidón dañado están directamente asociados con una tendencia de estos panes a ser más esféricos, y como resultado de esto más simétricos.

La reducción en el volumen de las hogazas de pan repercute fuertemente en la estructura de la miga. Como consecuencia de un menor desarrollo de volumen se obtuvieron panes con migas menos tiernas, menos esponjosas y más compactas. La estructura cerrada de la miga que presentan los panes elaborados con harinas con mayores niveles de almidón dañado se expresó a través de la reducción del número de alvéolos por unidad de área y de la disminución del tamaño de los alvéolos, como así también de un aumento de su circularidad. A pesar de que las migas fueron más compactas, se observaron en algunos casos la presencia de grandes celdas de aire producidas por el colapso de sus paredes debido al fuerte incremento de la presión en las celdas producido por el dióxido de carbono.

Los resultados indican que la matriz proteína-almidón, que contiene las celdas de gas, fue más rígida y menos extensible en las masas con mayor almidón dañado, en concordancia con lo expresado a través de las características reológicas y las propiedades fermentativas que presentaron este tipo de masas.

La dimensión fractal (DF) provee un parámetro numérico en relación a la morfología y textura de los objetos con estructuras complejas e irregulares, y por lo tanto, es un indicativo de la complejidad de la matriz. Los cambios en la DF y la uniformidad de la miga por efecto del almidón dañado indican una reducción en la complejidad de la estructura, lo que se relaciona con migas más compactas.

En relación al color de la corteza, la presencia de azúcares reductores promueve la generación de los productos de la reacción de Maillard intensificando el color de la corteza (Bowles, 1996; Drapron y Godon, 1987). Sin embargo, no se registraron cambios en la coloración de la corteza por efecto del incremento en el almidón dañado. A pesar de que este comportamiento estuvo asociado con un aumento en el contenido de dextrinas en el sistema. Posiblemente esta tendencia es consecuencia de una baja actividad amilásica que presentaron estas harinas, ya que en los tres casos se registraron valores de *Falling number* mayores a 300 s (Tabla 5.2).

La Tabla 5.21 muestra los atributos de calidad analizados para los 16 ensayos efectuados según el diseño experimental descrito. Con el propósito de predecir el comportamiento de cada variable de respuesta, a partir de un análisis de regresión múltiple, se obtuvieron las ecuaciones que mostraron mejor ajuste y los gráficos de superficies de respuestas tridimensionales para los parámetros evaluados.

Los coeficientes de las ecuaciones de regresión significativos ($p \leq 0,05$) para cada atributo de calidad evaluado se presentan en la Tabla 5.22.

Tabla 5.21. Respuesta experimental de los parámetros de calidad de pan evaluados.

Muestra	VE (cm ³ /g)	RF (cm)	L*	a*	b*	Firmeza (gf)	Fracción de Área (%)	Diámetro de Feret (mm)
1	5,26	1,09	71,56	7,81	28,89	537,15	36,90	0,135
2	4,34	1,04	73,58	6,90	26,82	574,83	36,14	0,142
3	5,77	1,07	69,91	8,65	29,38	515,02	36,49	0,137
4	4,12	1,01	71,82	7,72	28,02	702,72	36,97	0,139
5	3,79	0,99	62,46	11,78	32,89	572,45	35,44	0,134
6	3,81	0,99	63,67	11,12	32,41	776,81	35,19	0,158
7	4,35	0,87	61,16	13,15	34,20	569,52	35,29	0,141
8	4,17	0,90	57,56	13,77	31,93	544,28	35,86	0,141
9	4,49	0,87	56,94	14,73	34,48	560,31	33,94	0,134
10	4,29	0,92	59,75	13,88	32,23	503,03	35,35	0,136
11	3,53	0,95	61,52	12,57	32,41	914,33	35,61	0,131
12	3,80	0,82	57,93	14,40	34,08	762,96	35,29	0,140
13	3,15	0,93	59,77	12,53	31,28	1000,77	32,99	0,133
14	3,25	0,84	61,75	12,64	32,81	733,02	33,44	0,131
15	3,40	0,85	56,61	15,14	35,08	1015,20	32,36	0,123
16	3,08	0,89	60,69	12,67	31,99	1126,77	31,91	0,127

Contribucion del almidón dañado

A partir de las ecuaciones de regresión calculadas se determinó que el incremento en el contenido de almidón dañado en las harinas ejerció un leve efecto lineal y positivo sobre el volumen de pan, y a través de una interacción cruzada (AMG*AD), un efecto negativo sobre este parámetro. Es importante destacar que la contribución lineal positiva al ser menor que la influencia negativa cruzada del contenido de almidón dañado sobre el volumen de pan, el impacto resultante en este parámetro es negativo, como se puede observar en los gráficos de superficie de contorno de la Figura 5.15.

Con respecto a la fracción de área, el aumento de almidón dañado tuvo un efecto lineal y positivo, y en relación a la intensidad de a* y b* y el diámetro de Feret, se registró una influencia lineal positiva y cuadrática negativa. Además de esto, un efecto lineal negativo y cuadrático positivo se comprobó sobre la relación de forma, la luminosidad y la firmeza.

En relación al color, el incremento progresivo del almidón dañado produjo panes más oscuros, ya que la luminosidad disminuyó y la intensidad del color rojo y amarillo incrementó. La fracción de área de la miga ocupada por alvéolos y el diámetro de los alveolos de estos panes también aumentaron en estas condiciones, sin embargo la firmeza de la miga incrementó.

Al igual que en el caso de la relación de forma y color, la contribución lineal del almidón dañado en el diámetro de los alveolos y la firmeza fue de mayor influencia sobre estos atributos.

En general, el contenido de almidón dañado afectó significativamente el comportamiento de todos los atributos de calidad de pan, la contribución de esta variable en los términos de las ecuaciones de predicción fue de mayor peso en comparación al peso de las enzimas, a excepción del volumen específico y el diámetro de Feret (Figura 5.15, 5.16, 5.17, 5.18, 5.19 y 5.20).

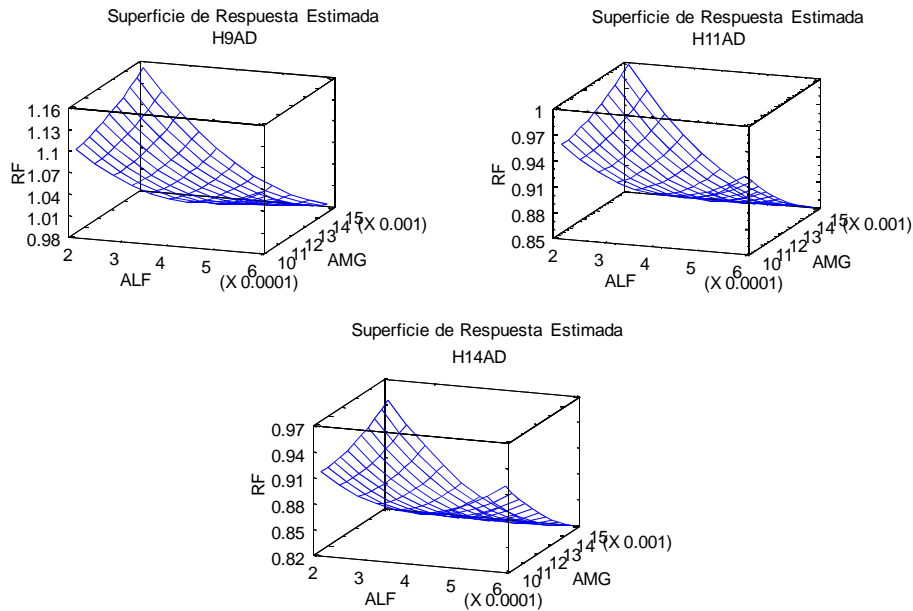


Figura 5.15: Gráficos de superficie de respuesta de la relación de forma de las piezas de pan. RF: Relación de forma, ALF: α -amilasa, AMG: Amiloglucosidasa.

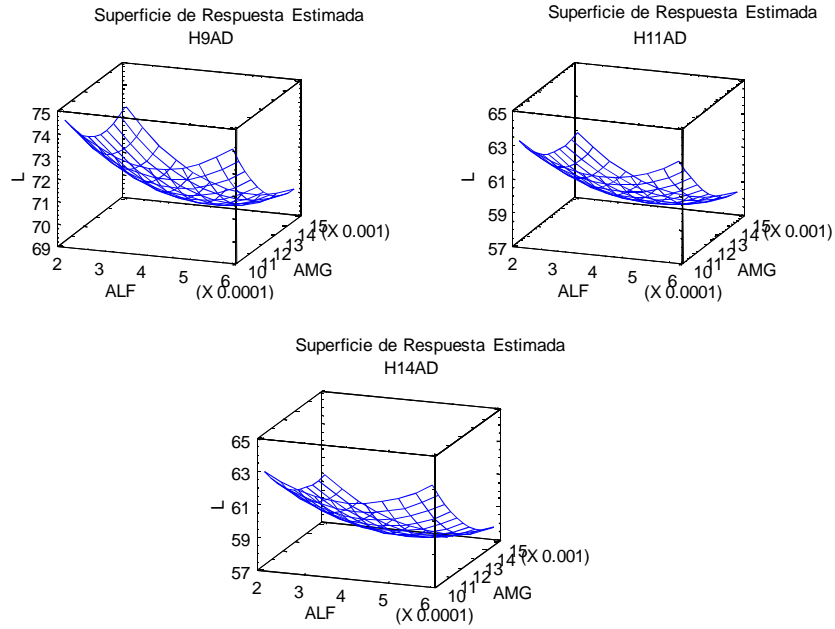


Figura 5.16: Gráficos de superficie de respuesta de la luminosidad de la corteza. L*: Luminosidad, ALF: α -amilasa, AMG: Amilogucosidasa.

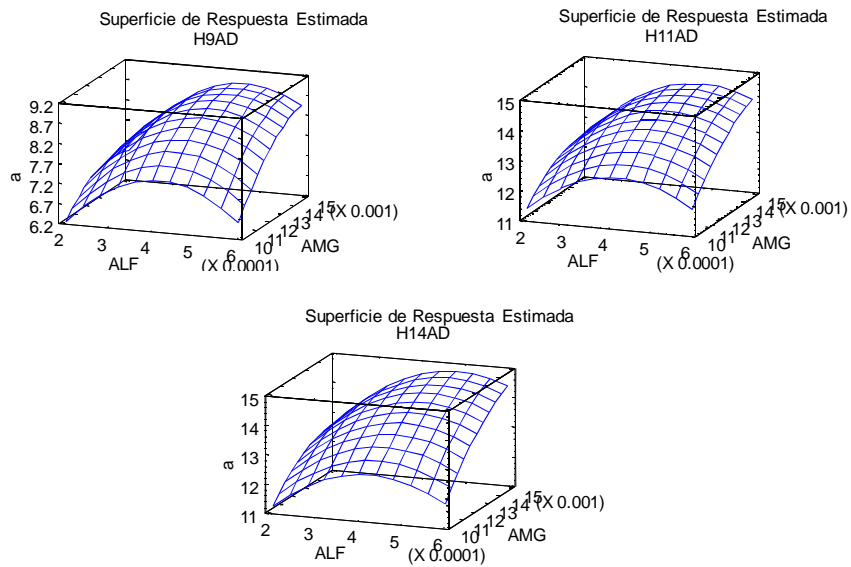


Figura 5.17: Gráficos de superficie de respuesta de intensidad de color intensidad de color rojo en la corteza. a*: intensidad del color rojo, ALF: α -amilasa, AMG: Amilogucosidasa.

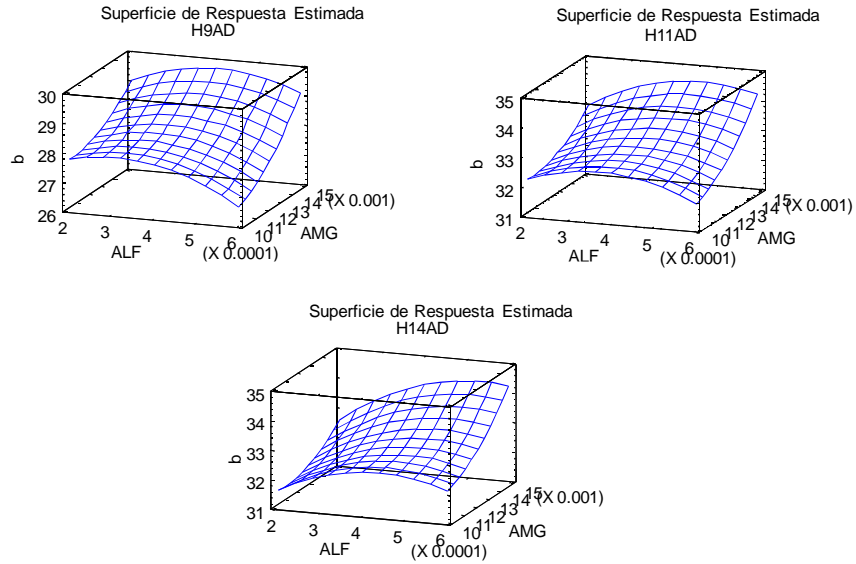


Figura 5.18: Gráficos de superficie de respuesta de intensidad de color intensidad de color amarillo en la corteza. b^* : intensidad del color amarillo, ALF: α -amilasa, AMG: Amilogucosidasa.

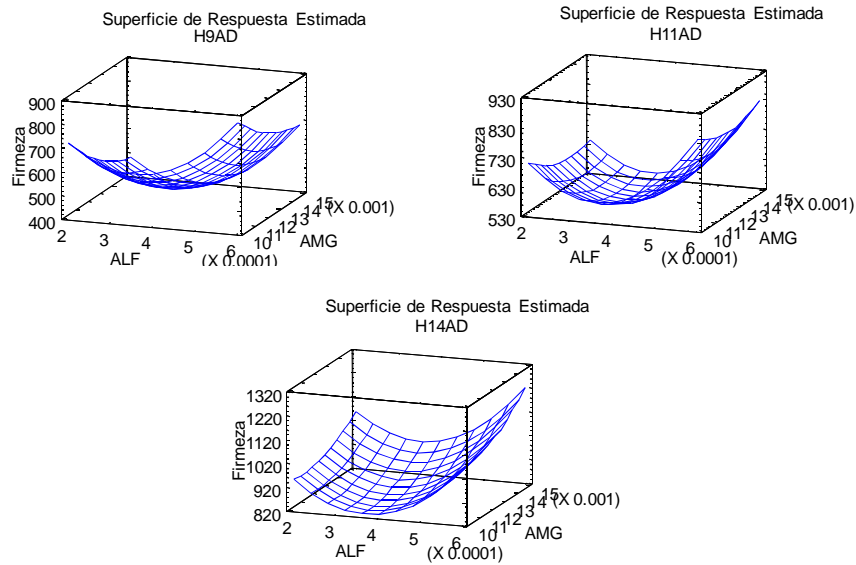


Figura 5.19: Gráficos de superficie de respuesta de la firmeza de la miga. Firmeza (gf), ALF: α -amilasa, AMG: Amilogucosidasa.

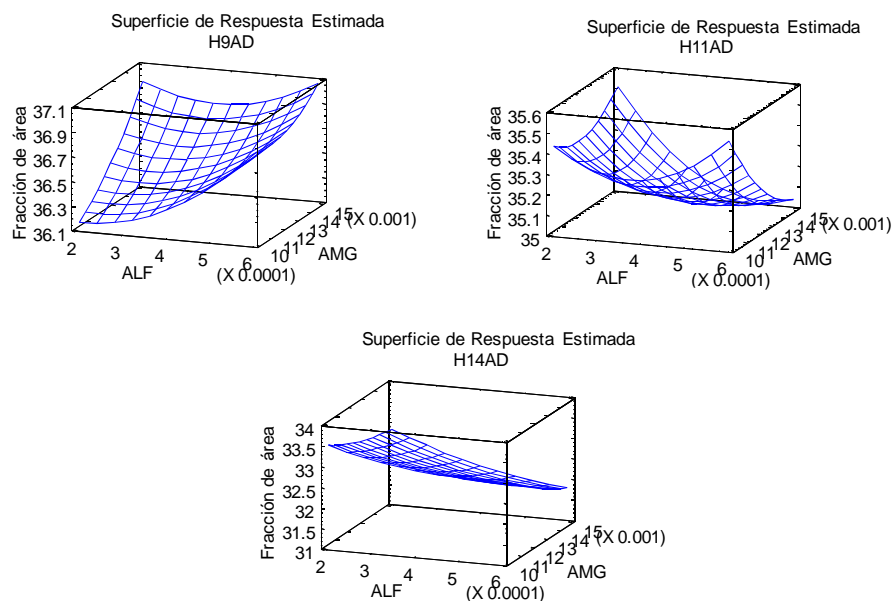


Figura 5.20: Gráficos de superficie de respuesta de la Fracción de área ocupada por alveolos en la miga. Fracción de área (%), ALF: α -amilasa, AMG: Amiloglucosidasa.

La presencia de almidón dañado altera la estructura de la masa causando un detrimento en su desempeño. La mayor viscosidad y la menor elasticidad que presentaron estas masas contribuyen a un escaso desarrollo durante la fermentación, lo que produce la obtención de piezas de pan de menor tamaño, y por lo tanto, con migas más firmes.

La presencia de una mayor proporción de azúcares reductores disponibles para las reacciones de Maillard, provenientes del efecto degradativo de las enzimas sobre el almidón de los gránulos dañado y sobre los productos resultantes de la depolimerización del almidón durante la molienda, propicia el oscurecimiento de la corteza y el incremento en la coloración amarronada de la misma.

Contribucion de las enzimas

La adición de α -amilasa a la formulación tuvo un efecto lineal negativo sobre la relación de forma y la firmeza, aunque también se registró uno cuadrático positivo sobre este último parámetro. Asimismo, se determinó un efecto cuadrático negativo sobre el volumen y la intensidad de a^* (Tabla 5.22). Estos resultados indican que los incrementos graduales en la concentración de esta enzima produjeron disminuciones en la relación de forma de la hogaza y firmeza de la miga.

Tabla 5.22. Coeficientes significativos ($p \leq 0,05$) de las ecuaciones de regresión correspondientes a cada parámetro de calidad de pan evaluado.

Coefficiente	VE (cm ³ /g)	RF	L*	a*	b*	Firmeza (gf)	Fracción de Área (%)	Diámetro de Feret (mm)
constante	-2,7	2,8	259,4	-78,5	-36,0	6564,6	20,3	0,11
A:ALF	ns	-421	ns	ns	ns	-3,1E+06	ns	ns
B:AMG	1339	ns	-3553	1255	ns	ns	ns	-11,5
C:AD	0,086	-0,27	-27,7	13,0	12,5	-672	2,91	0,029
AA	-1,1E+07	ns	ns	-2,6E+07	ns	4,3E+09	ns	ns
AB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,7E+04
AC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BB	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BC	-58,2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CC	ns	0,011	1,2	-0,55	-0,53	25,9	ns	-0,0012
R ²	94,7	91,7	95,4	95,8	88,5	91,7	92,2	89,2

R²: Coeficiente de determinación ajustado (es el porcentaje de la variabilidad de los datos que explica la ecuación de regresión en cada caso). ns: no significativo ($p \leq 0,05$)

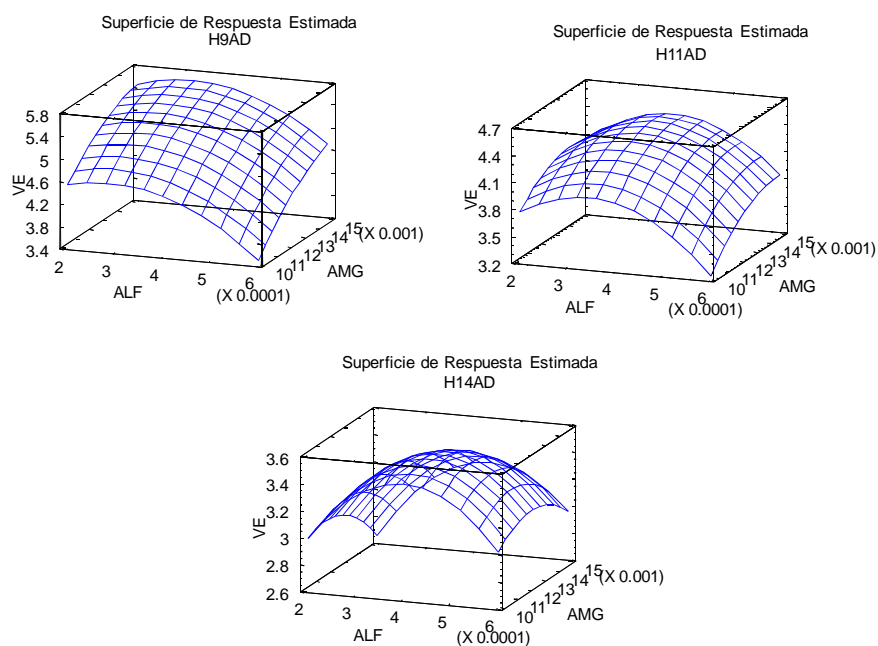


Figura 5.21: Gráficos de superficie de respuesta de volumen específico de pan. VE: Volumen específico (cm³), ALF: α -amilasa, AMG: Amilglucosidasa.

El incremento en la concentración de α -amilasa en la formulación de pan es conveniente hasta que su concentración alcanza un valor crítico, a partir del cual los incrementos sucesivos causan

diminuciones en el volumen de las piezas de pan e intensidad de rojo en la corteza, e incrementos en la firmeza de la miga (Figura 5.21 y Figura 5.19).

A bajos niveles de ALF, las reducciones en la relación de forma y firmeza de la miga de pan están asociadas con un aumento del desarrollo de la masa durante la fermentación (Kragh, 2002; Linko et al., 1997), resultado de una contribución en la producción de azúcares fermentables, en donde la relación maltosa/glucosa se ve favorecida a partir de la degradación del almidón de los gránulos dañados. Asimismo, la desintegración granular por parte de la enzima promueve un incremento en el agua libre del sistema, y por lo tanto, durante la formación de la masa se genera una mejor hidratación del gluten (Martinez-Anaya y Jimenez, 1997), condición que mejora las características elásticas de las masas y la retención de CO₂.

Patel et al. (2012) informaron que la incorporación de mínimas cantidades de la enzima α -amilasa fúngica resulta beneficiosa, ya que mejora el manejo de las masas, reduce la adhesividad y mejora la calidad de los productos finales. Hasta el momento no está del todo claro si la mejora observada en los productos panificados derivada de la adición de α -amilasa se produce como consecuencia de un aumento en la producción de gas durante la fermentación o de cambios en la fuerza de las masas resultantes debido al aumento de la hidratación del gluten.

Altos contenidos de α -amilasa resultan en un deterioro del volumen de las piezas y de las propiedades estructurales de la miga de pan debido a una excesiva degradación del almidón dañado (Bowles, 1996; Autio y Laurikainen, 1997). Este comportamiento se debe a que frente a una excesiva hidrólisis enzimática de los gránulos dañados estos disminuyen su capacidad de retención de agua, lo que deja una mayor proporción de agua libre en el sistema y afecta negativamente las características reológicas de las masas.

La disminución en el volumen de las piezas de pan trae aparejada una reducción en la coloración de la corteza posiblemente debido a un aumento de la humedad superficial de la masa durante el horneado. La coloración de la corteza se ve favorecida por las altas temperaturas alcanzadas en la superficie (reacciones de Maillard) y por su deshidratación (caramelización). Las piezas con un bajo desarrollo durante la fermentación mantienen sus superficies más húmedas, lo que genera una menor coloración.

El agregado de amiloglucosidasa tuvo un efecto lineal positivo sobre el volumen e intensidad de a^* , y por el contrario, un efecto lineal negativo sobre la luminosidad y el diámetro de Feret (Tabla 5.22). Este comportamiento indica que la incorporación de esta enzima incrementó el volumen de las piezas de pan y la intensidad de rojo en la corteza, y por otro lado disminuyó la luminosidad de la corteza y el diámetro de los alvéolos en la miga. Las variaciones en volumen y diámetro de los alveolos están fuertemente influenciadas por la concentración de esta enzima (Figura 5.21 y 5.22), ya que es la variable de mayor peso en las ecuaciones de predicción de estos parámetros.

En relación a las interacciones entre variables se registró un aporte positivo de ALF*AMG sobre el diámetro de Feret, y una contribución negativa de AD*AMG sobre el volumen de pan.

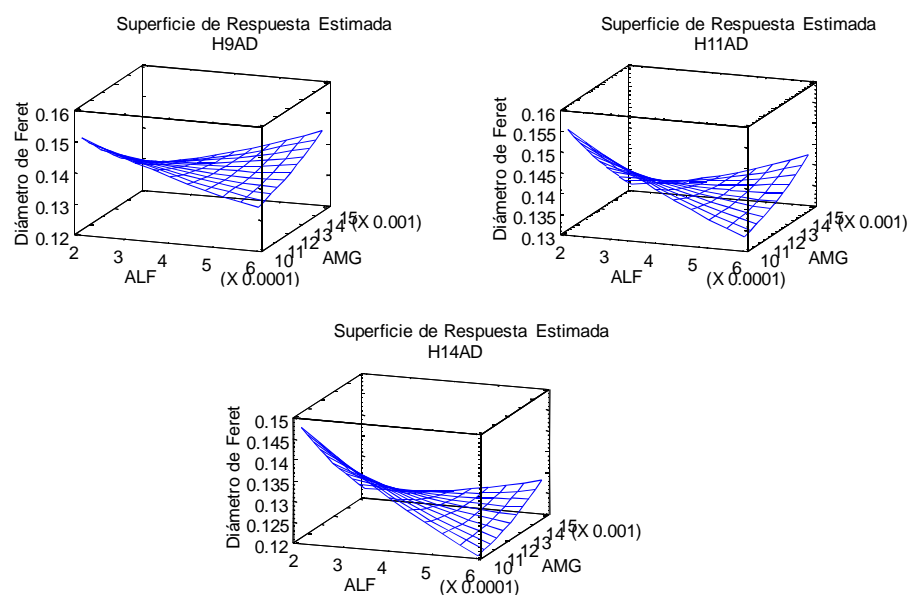


Figura 5.22: Gráficos de superficie de respuesta del diámetro de los alveolos en la miga. Diámetro de Feret (mm), ALF: α -amilasa, AMG: Amiloglucosidasa.

La incorporación gradual de amiloglucosidasa a la formulación de pan causó incrementos en el volumen de las piezas e intensidad de rojo en la corteza, lo que se debe a la capacidad de generar glucosa como principal producto de la degradación de los gránulos de almidón dañado. La presencia de una mayor concentración de glucosa promueve un mayor desarrollo de la masa durante la fermentación y, en consecuencia, del volumen de las piezas de pan. El incremento en la intensidad del rojo y la disminución de la luminosidad en la corteza posiblemente estén relacionados con una mayor proporción de azúcares reductores y con el incremento en el volumen asociado con una menor humedad superficial de las masas durante el horneado, como se detalló anteriormente. Los incrementos en la concentración de esta enzima traen aparejados disminuciones en el diámetro de los alvéolos en la miga. Este efecto posiblemente está asociado con la interacción negativa sobre el volumen de pan que se produce entre la amiloglucosidasa y el almidón dañado (Figura 5.21).

Además de explicar el comportamiento de las variables a través de los modelos ajustados, este análisis también permite la optimización de las variables de respuesta. En función de los criterios de calidad se determinó la combinación óptima de las variables necesaria para maximizar o minimizar la respuesta de cada atributo de calidad.

Los valores de almidón dañado de las harinas estuvieron en el rango de 8,90-14,3%, y las dosis de enzimas empleadas fueron α -amilasa: 0,0002-0,0006 g/100g harina y amiloglucosidasa: 0,01-0,015 g/100g harina, dosis mínimas y máximas. Se comprobó que la combinación de almidón dañado (AD), α -amilasa (ALF) y amiloglucosidasa (AMG) necesaria para maximizar el volumen de las hogazas de pan (5,6 cm³/g) y minimizar la firmeza de la miga (399,4 gf) resultó ser la misma, el menor porcentaje de AD, la concentración máxima de AMG y la mitad de la dosis máxima de ALF (Tabla 5.23).

En lo que respecta a la relación de forma de las piezas de pan se determinó que para maximizar este atributo (1.15) es necesario combinar la mínima proporción de AD, la mínima concentración de ALF y la máxima concentración de AMG (Tabla 5.23).

En lo que respecta al color de la corteza no se dispone de valores de referencia ya que depende de las preferencias del consumidor. Por lo tanto, para la optimización de este atributo se seleccionaron los valores intermedios del rango registrado experimentalmente para cada parámetro (L*: 65, a*: 11 y b*: 31). En coincidencia con esto, Steffolani et al. (2012b) informaron valores de L* ~70, a* ~9 y b* ~34 para la coloración de la corteza de panes elaborados con harina de trigo pan comercial. El análisis estableció que la combinación óptima de las variables necesaria para obtener una corteza según las características definidas resultó en una proporción de almidón dañado superior a la mínima (8,9%) y una concentración media de ambas enzimas (Tabla 5.23).

En lo que respecta a las características propias de la miga de pan, la optimización para maximizar estos atributos resultó en una combinación de la mínima proporción de almidón dañado y la máxima concentración de ambas enzimas para la fracción de área (37,1%), y de un porcentaje medio de almidón dañado y la mínima concentración de ambas enzimas para el diámetro de los alveolos (0,16 mm) (Tabla 5.23).

Tabla 5.23. Combinación de almidón dañado, α -amilasa y amiloglucosidasa necesaria para optimizar cada parámetro de calidad.

Variable	Parámetros de calidad de pan							
	VE (cm ³ /g)	RF	L*	a*	b*	Firmeza (gf)	Fracción de Área (%)	Diámetro de Feret (mm)
AD (%)	8,9	8,9	9,7			8,9	8,9	10,8
ALF*	0,00032	0,0002	0,00043			0,00034	0,0006	0,0002
AMG*	0,015	0,015	0,013			0,015	0,015	0,01

* Dosis de enzimas en g/100g harina. AD: Almidón dañado, ALF: α -amilasa, AMG: Amiloglucosidasa

Los gráficos de contorno obtenidos para intensidad del parámetro b* (Figura 5.11), firmeza (Figura 5.19), fracción de área (Figura 5.20) y volumen de pan (5.21) mostraron diferencias en la

forma de la superficie de respuesta al cambiar el contenido de almidón dañado, lo que indica la fuerte dependencia del efecto de las enzimas con este componente. Esto confirma que el impacto de las enzimas sobre el producto final dependerá del contenido de almidón dañado de la harina. En este sentido, teniendo en cuenta la optimización para cada parámetro de calidad en el rango de almidón dañado estudiado, los valores de este componente que resultaron más beneficiosos en combinación con las enzimas fueron menores a 10,8% (Tabla 5.23). Además, se observó que la máxima concentración de amiloglucosidasa (0,015 g/100g harina) es favorable en todos los casos para estos niveles de almidón dañado, mientras que, las concentraciones de α -amilasa menores a la concentración media (0,0004 g/100 g harina) resultaron más adecuadas (Tabla 5.23). A modo de ejemplo, la Figura 5.23 presenta imágenes de panes formulados con 8,9 y 10,8% de almidón dañado y diferentes niveles de enzimas. En estas imágenes se puede observar claramente la diferencia entre el pan control y el aditivado, en ambos casos se puede observar el efecto positivo de la incorporación de α -amilasa y amiloglucosidasa.

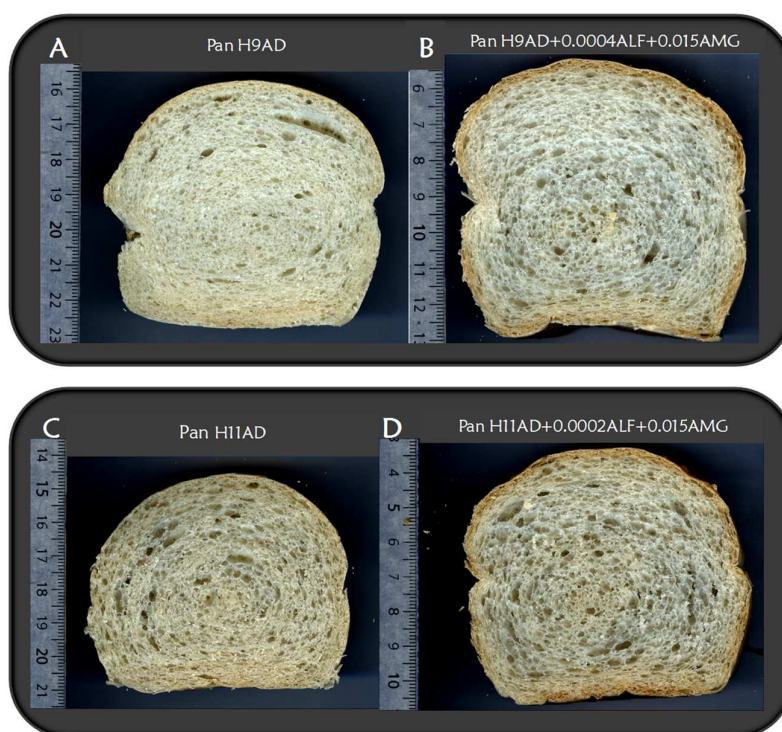


Figura 5.23: Imágenes de panes obtenidos según diseño de experimentos y las mismas harinas sin aditivar (control). A: Pan H9AD control y B: Pan H9AD con enzimas; C: Pan H11AD control y D: Pan H11AD con enzimas.

B. Optimizaciones

Los resultados obtenidos hasta aquí demostraron claramente el deterioro producido por el almidón dañado sobre la calidad del pan. Una vez establecida la contribución relativa de las variables

y sus interacciones sobre los parámetros de calidad de pan, se aplicó un procedimiento de optimización de múltiples respuestas a través de la función de conveniencia (Ferreira et al., 2007). Este método permite una respuesta optimizada teniendo en cuenta simultáneamente más de un atributo de calidad.

El procedimiento se llevó a cabo para dos condiciones diferentes, y en ambos casos se buscó simultáneamente maximizar el volumen específico y la relación de forma de las piezas, reducir la firmeza de la miga y mantener el color de la corteza (L^* : 65, a^* : 11 y b^* : 31). El objetivo de la optimización 1 fue determinar la concentración de almidón dañado y de enzimas necesarias para obtener un pan con las características mencionadas, mientras que el propósito de la optimización 2 fue establecer la concentración de enzimas necesaria para formular un pan a partir de una harina con 14,3% de almidón dañado.

Los resultados de la primera optimización (Tabla 5.24) sugirieron que la combinación de una harina con un 9,8% de almidón dañado y la mezcla de la mitad de la dosis máxima de α -amilasa y la concentración máxima de amiloglucosidasa es la condición más apropiada para lograr obtener un pan con los mejores atributos de calidad. Estos resultados se condicen con los rangos de almidón dañado y enzimas propuestos anteriormente.

En relación a la optimización 2, los resultados obtenidos indicaron que la combinación óptima de enzimas para mitigar el deterioro de calidad causado por la presencia de una excesiva proporción de almidón dañado resulta de la mezcla de la concentración media de α -amilasa y amiloglucosidasa.

Tabla 5.24. Niveles de almidón dañado y enzimas para las optimizaciones de múltiples respuestas.

Variables	Optimización	
	1	2
AD (%)	9,8	14,4
ALF*	0,0003	0,0004
AMG*	0,014	0,0125

* Dosis de enzimas en g/100g harina. AD: Almidón dañado, ALF: α -amilasa, AMG: Amiloglucosidasa

Con el nivel de cada factor determinado según las optimizaciones de múltiples respuestas se elaboraron panes y se comprobó la capacidad predictiva de las ecuaciones de regresión. En el caso de la optimización 1 (Tabla 5.25) la combinación de variables sugerida conduce a la obtención de un pan con mayor volumen (~28%), menor firmeza de miga (~31%), mayor relación de forma (~18%) y con corteza más oscura en comparación con los valores medios de volumen (3,7 cm³), firmeza (1441,5 gf) y relación de forma (0,82) registrados para los panes controles (harinas H9AD y H11AD) sin enzima (Tabla 5.19). La combinación de variables definida por la optimización de múltiples respuestas

permitió predecir satisfactoriamente los atributos de calidad (diferencia menor al 16%) (Tabla 5.25), a excepción de la firmeza de la miga y el parámetro a^* de color. Los resultados confirmaron experimentalmente que la adición de α -amilasa y amiloglucosidasa en la formulación mejoró significativamente la calidad del producto terminado (Figura 5.24).

Tabla 5.25. Valores esperados y experimentales de las variables de respuestas correspondientes a la optimización 1.

Atributos de calidad	Optimización 1		(VE-VP)/VP (%)
	Valor predicho	Valor experimental	
VE (cm ³)	5,1	4,3	-16
RF	1,0	0,9	-12
L*	65,1	57,7	-11
a*	10,9	13,8	27
b*	31,2	34,5	11
Firmeza (gf)	446,8	629,4	41

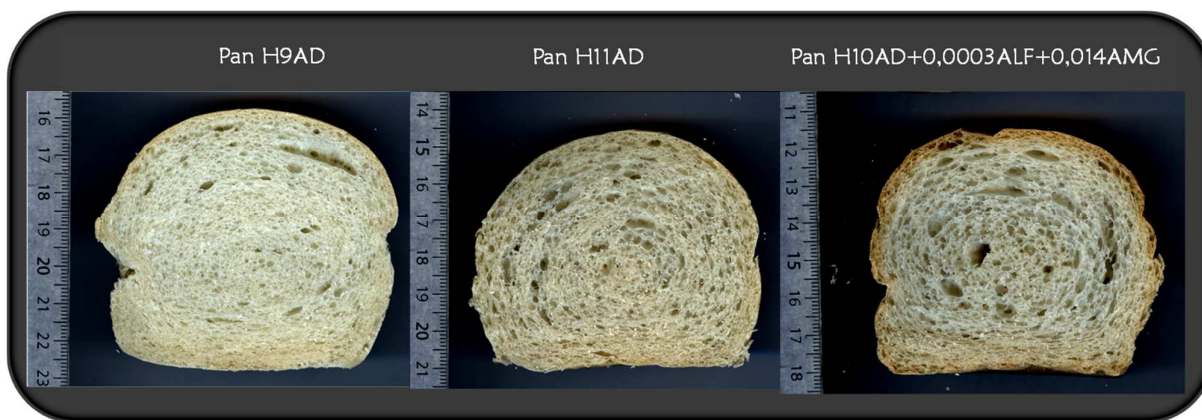


Figura 5.24: Panes formulados con las concentraciones de almidón dañado y enzimas según la optimización 1.

En relación a la optimización 2 (Tabla 5.26), la combinación de variables propuesta produjo un pan con un mayor volumen (~29%), similar relación de forma (~3%), menor firmeza (~44%) y con corteza más oscura, respecto a los valores obtenidos para la harina el control (H14AD) (Tabla 5.19). Al igual que lo observado con la optimización 1, la combinación de variables definida por la optimización de múltiples respuestas permitió predecir satisfactoriamente los atributos de calidad (diferencia menor al 12%) (Tabla 5.25), a excepción de la firmeza de la miga.

Con estos resultados queda demostrado experimentalmente que la adición de α -amilasa y amiloglucosidasa en la formulación de pan mejoró significativamente la calidad del producto elaborado con una harina con alto contenido de almidón dañado (Figura 5.25).

Tabla 5.26. Valores esperados y experimentales de las variables de respuestas correspondientes a la optimización 2.

Optimización 2			
Variables de respuesta	Valor predicho	Valor experimental	(VE-VP)/VP (%)
VE (cm ³)	3,5	3,7	4
RF	0,9	1,0	12
L*	58,4	57,6	-1
a*	14,0	15,4	11
b*	32,9	36,0	9
Firmeza (gf)	862,8	457,5	-47



Figura 5.25: Panes formulados con las concentraciones de almidón dañado y enzimas según la optimización 2.

La evaluación de la firmeza de la miga de los panificados resulta de gran interés debido a que esta característica es un atributo de calidad muy importante, ya que se relaciona directamente con el envejecimiento del producto y por lo tanto, con la aceptación del consumidor. En capítulos anteriores quedó demostrado que los incrementos en el contenido de almidón dañado incrementan la entalpía de retrogradación de la amilopectina y la firmeza de la miga durante el periodo de almacenamiento. Para evaluar el efecto del envejecimiento de los panes se realizó un seguimiento de ambos parámetros en los panes formulados según la optimización 2 y su respectivo control durante 8 días de almacenamientos. Durante este periodo, la dureza de la miga y la entalpía de retrogradación de la amilopectina incrementaron ($p \leq 0,05$) significativamente en el tiempo en ambas muestras de pan

(Figura 5.26 y Tabla 5.27). Durante todo el periodo evaluado la proporción de amilopectina retrogradada de la muestra control y la aditivada no fue significativamente ($p \leq 0,05$) diferente. No obstante, los panes sin aditivar presentaron una dureza y una velocidad de endurecimiento mayor que los aditivados (Figura 5.26). El agregado de las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa produjo una miga menos firme durante todo el periodo de almacenamiento, promoviendo una mayor vida útil del producto. Es importante mencionar que este tipo de producto se consume generalmente dentro de las 48 h de elaborado, por lo tanto los cambios en la textura de la miga que ocurren durante este periodo de tiempo resultan ser los más importantes. En este sentido, la disminución de la velocidad de incremento de la firmeza de la miga luego de 48 h de almacenamiento resultó benefiosa como consecuencia de la incorporación de las enzimas.

En lo que respecta a la valoración del endurecimiento de las piezas de pan, el aumento de la firmeza es el indicador más utilizado en la medición de este parámetro, debido a que es el atributo que los consumidores reconocen comúnmente (Gray y Bemiller, 2003). El envejecimiento de la miga de pan es un fenómeno complejo que hasta el momento no es comprendido claramente. En general, hay consenso en la existencia al menos de una correlación entre la retrogradación de amilopectina y endurecimiento del pan, a pesar de que ambos eventos pueden no ser parte del mismo proceso (Gray y Bemiller, 2003). Por lo tanto, la retrogradación de la amilopectina es parte del proceso de envejecimiento, pero no es el único responsable de los cambios observados en la textura de la miga. Ghiasi et al. (1984) no encontraron una correlación significativa entre los cambios en la cristalinidad de almidón en la miga de pan, evaluados por calorimetría diferencial de barrido, y los cambios en la firmeza. En relación a este comportamiento los autores sugirieron que el grado de firmeza de la miga en el tiempo es dependiente de la temperatura. Colwell et al. (1969) informaron que el rol de la cristalización del almidón en la firmeza de la miga de pan se vuelve progresivamente menos importante a temperaturas de almacenamiento por encima de 21 °C. En relación a los resultados obtenidos (Figura 26 y Tabla 5.28), debido a que los panes elaborados se almacenaron a temperaturas entre los 24-25 °C, es posible que este factor haya contribuido a los bajos registros de entalpía de retrogradación de amilopectina.

En productos horneados es bien conocido el hecho que el agregado de amilasas retarda el efecto de envejecimiento de los productos (Goesaert et al., 2005; Gray y Bemiller, 2003; Hebeda et al., 1991), lo que acuerda con los resultados obtenidos. El mecanismo por el cual estas enzimas producen este efecto benéfico no está del todo claro aún, ya que este fenómeno ha sido atribuido a las dextrinas derivadas de la hidrólisis del almidón, las cuales interfieren con la reasociación de los polímeros de amilosa y amilopectina, y en otros casos, ha sido relacionado con las modificaciones moleculares de los polímeros de almidón que derivan de la degradación enzimática (Goesaert et al., 2005).

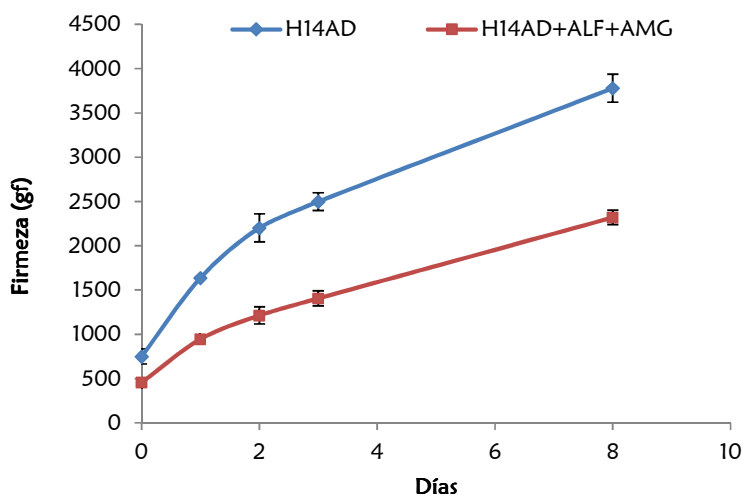


Figura 5.26: Evolución en el tiempo de la firmeza de la miga de pan.

Tabla 5.27. Evolución en el tiempo de la entalpía de retrogradación de la amilopectina de la miga de pan.

Tiempo (días)	Entalpía Retrogradación (J/g)	
	H14AD	H14AD+ALF+AMG
0	nd	nd
1	0,45 a	0,68 a
2	0,42 a	0,76 a
3	0,44 a	0,71 a
8	1,50 a	1,42 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (ANOVA)
 Las comparaciones estadísticas se realizaron entre el pan control y el aditivado para cada día de almacenamiento. nd: no detectado.

4. Conclusiones

Las disminuciones en la consistencia de las masas de galletitas dulces causadas por la presencia de almidón dañado son el resultado de las modificaciones producidas en la estructura del sistema. Estos cambios en la rigidez de las masas derivaron en un deterioro de la calidad del producto final, expresado a través de los parámetros de calidad evaluados. A pesar de que la función de los gránulos de almidón en este tipo de masas y de producto ha sido minimizada hasta el momento, es evidente que las características de los gránulos afectan la conformación de la estructura, lo que ocasiona modificaciones sobre el producto final. La incorporación de enzimas únicamente mejoró la consistencia de las masas formuladas con harinas de elevados niveles de almidón dañado, aunque no se registraron mejoras en la calidad de la galletitas obtenidas.

En lo que respecta a la producción de pan, el efecto negativo del uso de harinas con elevados contenidos de almidón dañado quedó demostrado a través del menor desempeño de estas masas durante su fermentación y por la reducción en la calidad final de los productos obtenidos. El uso de enzimas resultó beneficioso en la atenuación de los efectos negativos del almidón dañado, ya que se lograron mejorar los atributos de calidad.

Se estableció que un contenido de almidón dañado menor a 10,8% y una dosis de α -amilasa de 0,0003 g/100g harina y de amiloglucosidasa de 0,014 g/100g harina resultan óptimas para maximizar la calidad de los panes, para el rango de almidón dañado evaluado (8,9-14,3%). Además se determinó que para una harina con un nivel de almidón dañado de 14,3% las dosis de enzimas óptimas para alcanzar el mejor producto son 0,0004 g/100g harina de α -amilasa y 0,0125 g/100g harina de amiloglucosidasa.

Conclusiones generales

El pan es un alimento de bajo costo y es consumido por la mayor parte de la población, por lo que constituye la base de la alimentación diaria y ocupa una posición de gran importancia en el mercado. Las galletitas dulces también son de consumo masivo y se encuentran en el segundo lugar entre los productos de panificación más consumidos por los argentinos. En función de esto, es que resulta de gran importancia la contribución en el conocimiento sobre alternativas para mejorar la aptitud de las harinas para el desarrollo de estos productos.

La calidad de los panificados depende principalmente de las características de la harina que se utiliza para su elaboración. La proporción y calidad de las proteínas son los parámetros de referencia que frecuentemente se utilizan a la hora de definir la calidad de una harina.

La molienda de los granos de trigo puede afectar en mayor o menor medida la integridad de los gránulos de almidón produciendo almidón dañado. Existe evidencia que este componente afecta el desempeño de las harinas en los procesos de producción.

En este trabajo quedó ampliamente demostrado que los elevados niveles de almidón dañado producen un deterioro generalizado de la performance de los productos fermentados y no fermentados, independientemente de la calidad y proporción de las proteínas y demás componentes de la harina. Los atributos de calidad requeridos en productos como pan y galletitas decayeron fuertemente al incrementar el contenido de almidón dañado. La textura de los panes resultó afectada por el contenido de almidón dañado particularmente durante los primeros días de almacenamiento debido a los incrementos en la retrogradación de la amilopectina.

Los cambios producidos en las propiedades reológicas de las masas con altos niveles de almidón dañado son los responsables de las reducciones en la calidad de los panificados. En este sentido, se comprobó que la presencia de gránulos dañados altera la formación de las masas y sus propiedades funcionales. El tiempo para obtener una masa de óptima consistencia incrementó con el contenido de almidón dañado. Las masas presentaron una estructura más débil, y fueron más rígidas y viscosas y menos cohesivas, extensibles y elásticas.

Los antecedentes descriptos permiten concluir que los principales responsables de las alteraciones en el comportamiento de las masas son los cambios en la capacidad plastificante del agua y la formación de una estructura de red tridimensional más abierta. Este último factor es consecuencia de un mayor tamaño granular que resulta del mayor poder de absorción de agua de los gránulos dañados. Asimismo, la mayor fragilidad de los gránulos dañados hinchados produce alteraciones en las interacciones que se establecen entre los gránulos de almidón y los demás componentes del sistema.

En lo que respecta al estudio de los sistemas de almidón puro, las características estructurales de los gránulos dañados resultaron determinantes en el comportamiento y las propiedades de las suspensiones no calentadas y calentadas de almidón.

La presencia de almidón dañado en las suspensiones no calentadas afectó las propiedades de flujo, produciendo un aumento en el comportamiento tixotrópico y en el coeficiente de consistencia. Estos cambios se relacionan con el aumento del tamaño de los gránulos y la lixiviación de α -glucanos que se produce como consecuencia del daño en la estructura.

En relación al comportamiento de las suspensiones gelatinizadas el aumento de gránulos dañados disminuyó el perfil de viscosidad, lo que se relaciona con la desintegración de los gránulos dañados gelatinizados como consecuencia del calentamiento y cizallamiento.

Los geles de almidón con mayores niveles de almidón dañado presentaron una estructura más debilitada, lo que afectó el comportamiento durante su almacenamiento y velocidad de sinéresis de los geles debido a los cambios en la rigidez de los gránulos inmersos y de las interacciones de la fase dispersa.

Los cambios entálpicos relacionados con el proceso de gelatinización disminuyeron con el nivel de almidón dañado, aunque resultaron simultáneamente afectados por la proporción de gránulos dañados y por la cantidad de agua presente en el sistema. Los aumentos de almidón dañado disminuyeron el contenido de agua que se relaciona con la máxima cantidad de amilopectina retrogradada e incrementaron la velocidad de retrogradación de la amilopectina durante los primeros días de almacenamiento.

La evidencia obtenida permite concluir que las modificaciones en las propiedades de los sistemas de almidón están relacionadas con los cambios estructurales que sufren los gránulos a causa del daño físico durante la molienda. Las alteraciones en la cristalinidad de los gránulos y los efectos ocasionados sobre su superficie producen un importante aumento de su capacidad de absorción de agua y de los efectos que esta condición conlleva.

La utilización de aditivos en la industria de la panificación es necesaria para lograr productos de buenas características debido principalmente a la fluctuación de la calidad de las harinas de trigo. Entre los aditivos más utilizados se encuentran las α -amilasas de diferente origen, siendo la α -amilasa de origen fúngico la más popular.

Las incorporaciones enzimáticas de α -amilasa y amilogucosidasa y sus mezclas mejoraron las propiedades de amasado y reológicas de masas formuladas con harinas con altos contenidos de almidón dañado, mientras que, la presencia de amilasa maltogénica no ocasionó cambios de relevancia en estos parámetros. Las enzimas contrarrestaron los efectos negativos de altos niveles de almidón dañado ya que disminuyeron la resistencia, la rigidez y la viscosidad de las masas e incrementaron su elasticidad. Estos cambios son el resultado de una disminución en la cohesividad de la estructura y una mayor capacidad plastificante del agua como consecuencia de una menor retención de agua asociada a una mayor desintegración granular.

La incorporación de enzimas en las formulaciones de pan y galletitas resulta beneficiosa en la atenuación de los efectos negativos del almidón dañado. En la producción de galletitas no se

registraron mejoras de la calidad del producto, sin embargo el uso de enzimas mejoró la consistencia de las masas en presencia de altos niveles de almidón dañado.

En la producción de pan, se obtuvieron mejoras en las propiedades fermentativas de las masas y en los atributos de calidad del producto, como así también, en la firmeza de la miga durante el almacenamiento.

Con la evidencia obtenida, se puede concluir que las propiedades reológicas de las masas y la calidad de los productos obtenidos con harinas con alto contenido de almidón dañado mejoraron como consecuencia de la acción de enzimas amilolíticas, particularmente α -amilasa y amiloglucosidasa, posibilitando la utilización de estas enzimas y sus mezclas como aditivos correctores. Dado que la adición de enzimas en panificación se reduce prácticamente a las α -amilasas, los beneficios de la incorporación de amiloglucosidasa en productos panificados resulta novedosa.

Este estudio permitió conocer las principales causas y mecanismos de deterioro de la calidad ocasionados por la presencia de almidón dañado, para finalmente posibilitar la elección de aditivos que permiten la obtención de productos con una aceptable calidad tecnológica.

Con los resultados de este trabajo hasta el momento se han realizado las siguientes publicaciones en revistas internacionales con referato:

Gabriela N. Barrera, Georgina Calderón-Domínguez, Jorge Chanona-Pérez, Gustavo F. Gutiérrez-López, Alberto E. León, Pablo D. Ribotta. 2013. Evaluation of the mechanical damage on wheat starch granules by SEM, ESEM, AFM and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers* (ISSN: 0144-8617).

Gabriela N. Barrera, Mariela C. Bustos, Laura Iturriaga, Silvia K. Flores, Alberto E. León, Pablo D. Ribotta. 2013. Effect of damaged starch on the rheological properties of wheat starch suspensions. *Journal of Food Engineering* (ISSN: 0260-8774), 116:233–239.

Gabriela N. Barrera, Alberto E. León, Pablo D. Ribotta. 2012. Effect of damaged starch on starch thermal behavior. *Journal Internacional Starch – Stärke* (ISSN: 1521-379X), 64, 786–793.

Barrera Gabriela N, Pérez Gabriela T, Ribotta Pablo D, León Alberto E. 2007. Influence of damaged starch on cookie and bread-making quality. *European Food Research and Technology* (ISSN: 1438-2377) 225: 1-7.

León Alberto E, Barrera Gabriela N, Pérez Gabriela T, Ribotta Pablo D, Rosell Cristia M. 2006. Effect of damaged starch levels on flour thermal behaviour and bread staling. *European Food Research and Technology* (ISSN: 14382377, 224: 187-192).

Bibliografia

- AACC. American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC. Ninth Edition. The Association. St. Paul, Minnesota, USA.
- Aboud A., Hosney R.C. y Rubenthaler G. 1985. Effect of fat and sugar in sugar-snap cookies and evaluation of test measure cookie flour quality. *Cereal Chemistry*, 62:124-129.
- Abu-Jdayil B. y Mohamed, H.A. 2004. Time-dependent flow properties of starch–milk–sugar pastes. *European Food Research and Technology*, 218: 123–127.
- Aguilera J.M. 2000. Microstructure and food product engineering. *Food Technology*, 54: 56-65.
- Aguirre A., Badiali O., Cantarero M., León A., Ribotta P., Rubiolo O. 2002. Relationship of test weight and kernel properties to milling and baking quality in Argentine triticales. *Cereal Research Communications*, 30: 203–208.
- Akingbala J.O., Gómez M.H., Rooney L.W., Sweat V.E. 1988. Thermal properties of sorghum Starch. *Starch/Stärke*, 40: 375-378.
- Amaya A. y Peña R.J. 1991. Triticale industrial quality improvement at CIMMYT: past, present and future. En: *Proceedings of the 2nd. International Triticale Symposium*. CIMMYT, D.F., Mexico, pp.412-421.
- Amemiya J.I. y Menjivar J.A. 1992. Comparison of small and large deformation measurements to characterize the rheology of wheat flour doughs. *Journal Food Engineer*, 16:91-108.
- Andrews J.L., Hay R.L., Skerritt J.H., Sutton K.H. 1994. HPLC and immune assay based glutenin subunit analysis: screening for dough properties in wheats grown under different environmental conditions. *Journal of Cereal Science*, 20: 203–215.
- Armero E. y Collar C. 1998. Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-stalin additives. *Journal of Cereal Science*, 28: 165-174.
- Arzate-Vázquez I., Chanona-Pérez J. J., Calderón-Domínguez J., Terres-Rojas E., Garibay-Febles V., Martínez-Rivas A., Gutiérrez-López G.F. 2012. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers*, 87: 289-299.
- Arzate-Vázquez I., Perea M.J., Calderón G., Moreno M.A., Calvo H., Godoy S., Quevedo R., Gutiérrez-López G.F., Chanona-Pérez J.J. 2011. Image processing applied to classification of avocado variety Hass (*Persea americana* Mill) during the ripening process. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*, 4: 1307-1313.
- Atkin N.J., Abeysekera R.M., Robards A.W. 1998. The events leading to the formation of ghost remnants from the starch granule surface and the contribution of the granule surface to the gelatinization endotherm. *Carbohydrate Polymers*, 36: 193-204.
- 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 Foods World*, 33: 306-311.

- Autio K. y Laurikainen T. 1997. Relationships between flour/dough microstructure and dough handling and baking properties. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 181-185.
- Axford D.W.E., McDermott E.E., Redman D.G. 1979. Note on the Sodium Dodecyl Sulfate Test of Breadmaking Quality: Comparison with Pelshenke and Zeleny Tests. *Cereal Chemistry*, 56: 582-584.
- Ayoub M., Fregeau-Reid J., Smith D.L. 1993. Evaluation of the SDS-sedimentation test for the assessment of eastern Canadian bread wheat quality. *Canadian Journal of Plant Science*, 73: 995-999.
- Baevre, A.B. 1999. Skadd stivelse i hvetemel-malemetoder og betydning for ferdig produkt. MATFORSK, Norwegian food research institute. *InforMAT 2*: 25–27.
- Bagley E.B. y Christianson D.D. 1982. Swelling capacity of starch and its relationship to suspension viscosity: Effect of cooking time, temperature and concentration. *Journal Texture Studies*, 13: 115-126.
- Baks T., Ngene I.S., van Soest J.J.G, Janssen A.E.M., Boom R.M. 2007. Comparison of methods to determine the degree of gelatinization for both high and low starch concentrations. *Carbohydrate Polymers*, 67: 481–490.
- Baldwin P.M., Adler J., Davies M.C., Melia C.D. 1998. High resolution imaging of starch granule surfaces by atomic force microscopy. *Journal of Cereal Science*, 27: 255-265.
- Barichelo V., Yada R.I., Coffin R.H., Stanley D.W. 1990. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: Starch structure and composition. *Food Science*, 55: 1054-1059.
- Barlow K.K., Buttrose M.S., Simmonds D.H., Veski, M. 1973. The nature of the starch protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry*, 50: 443-454.
- Barrera G.N., Bassi E., Reyes Martínez R.J., León A.E., Ribotta P.D. 2012. Efectos de diferentes fracciones de harinas de trigo pan obtenidas con molino industrial sobre la calidad de galletitas dulces. *Agriscientia*, vol. XXIX: 69-79.
- Barrett F. 1975. Role of bread in international nutrition. *Cereal Foods World*, 20: 323.
- Baum B.R. y Bailey L.G. 1987. A survey of endosperm starch granules in the genus *Hodeum*: a study using image analytic and numerical taxonomic techniques. *Canadian Journal of Botany*, 65: 1563–1569.
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. 1999. Capítulo 4: Carbohydrates. En: *Food Chemistry 2nd Edition*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Belton P.S. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 29: 103-107.
- BeMiller J.N. y Whistler R.L. 1996. Capítulo 4: Carbohydrates. En: *Food Chemistry. 3rd Edition*. Editado por Fennema O.R. Marcel Dekker Inc., Nueva York, USA.
- Berton B., Scher J., Villieras F., Hardy J. 2002. Measurement of hydration capacity of wheat flour: Influence of composition and physical characteristics. *Powder Technology*, 128: 326–331

- Betche L.W. 1955. A review of bread staling research. *Cereal Chemistry*, 13: 108- 121.
- Bettge A.D., Morris C.F., Greenblatt G.A. 1995. Assessing genotypic softness in single wheat kernel using starch granule – associated friabilin as a biochemical marker. *Euphytica*, 86: 65–72.
- Bettge A.D. y Morris C.F. 2000. Relationships among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry*, 77: 241-247.
- Bijttebier A., Goesaert H., Delcour J.A. 2007. Temperature impacts the multiple attack action of amylases. *Biomacromolecules*, 8: 765-772.
- Bijttebier A., Goesaert H., Delcour J.A. 2008. Amylase action pattern on starch polymers. *Biologia*, 63: 989–999.
- Bijttebier A., Goesaert H., Delcour J.A. 2010. Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: structural analysis of the residual amylopectin population. *Carbohydrate Research*, 345: 235–242.
- Biliaderis C.G. 2009. Capítulo 8: Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch. En: *Starch: Chemistry and Technology*, 3rd Edition. Editado por BeMiller J.N. y Whistler R.L. Academic Press, Elsevier Inc., New York, USA.
- Biliaderis C.G., Izydorczyk M.S., Rattan O. 1995. Effect of arabinoxylans on breadmaking quality of wheat flours. *Food Chemistry*, 5: 165–171.
- Biliaderis C.G., Maurice T., Vose J. 1980. Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *Food Science*, 45: 1669-1674.
- Biliaderis C.G., Page C.M., Maurice T.J., Juliano B.O. 1986. Thermal characterization of rice starches: a polymeric approach to phase transition of granular starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 6–14.
- Blackman J.A. y Gill A.A. 1980. A comparison of some small-scale tests for bread-making quality in wheat breeding. *Journal of Agricultural Science*, 95: 29-34.
- Bloksma A.H. 1990. Dough structure, dough rheology, and baking quality. *Cereal Foods World*, 35: 237–244.
- Bourne M.C. 1978. Texture profile analysis. *Food Technology*, 32: 62–66.
- Bowles L.K. 1996. Capítulo: Amylolytic enzymes. En: *Baked Goods Freshness: Technology, Evaluation and Inhibition of Staling*. Editado por Hebeda R.E., Zobel H.F. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Boyaçlı I.H., Williams y Köksel H. 2004. A rapid method for the estimation of damaged starch in wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 39: 139-145.
- Brosnan T. y Sun D. 2004. Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. *Journal of Food Engineering*, 61: 3–16.
- Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S. 1998. Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23: 85-112.

- Bulkin B.J., Kwak Y., Dea I.C.M. 1987. Retrogradation kinetics of waxy-corn and potato starches; a rapid, raman-spectroscopic study. *Carbohydrate Research*, 160: 95- 112.
- Bushuk W. 1998. Capítulo: Interactions in wheat doughs. En: *Interactions the key to cereal quality*. Editado por Hamer y Hoseney. American Association of cereal chemists Inc., St Paul, Minnesota, USA.
- C.I.E. 1986. *Colorimetrie*, 2nd Edition. Publication C.I.E. N° 15, 2. Viena: Central Bureau of the Comisión Internationale de L'Eclairage.
- Carr N.O., Daniels N.W.R., Frazier P.J. 1992. Lipid interactions in breadmaking. *Critical Reviews in Food Science y Nutrition*, 31: 237-258.
- Carter B.P., Morris C.F., Anderson J.A. 1999. Optimizing the SDS sedimentation test for end-use quality selection in a soft white and club wheat breeding program. *Cereal Chemistry*, 76: 907-911.
- Cauvain S.P. 1998. Improving the control of staling in frozen bakery products. *Food Science and Technology*, 9: 56-61.
- Cauvain S.P. 2004. How much more bread research do we need. *Getreide technologie*, 58: 364-366.
- Cauvain S.P. y Young L.S. 2000. Capítulo 4: The contribution of water during processing, baking, cooling and freezing. En: *Bakery Food Manufacture y Quality: Water Control and Effects*. Blackwell Science Ltd. Campden and Chorleywood Food Research Association Chipping Campden Gloucester, Oxford UK.
- Chan S. 2006. Parte V. Special Products: Dietetic bakery products. En: *Bakery products: Science and Technology*. Editado por Hui Y.H., Corke H., De Leyn I., Nip W.K. y Cross N. Blackwell Publishing Professional, Ames, USA.
- Cheer R.L. y Lelievre J. 1983. Efects of sucrose on the rheological behavior of wheat starch pastes. *Journal of Applied Polymer Science*, 28: 1829-1836.
- Chen C.H. y Bushuk W. 1970. Nature of proteins in Triticale and its parental species I. Solubility characteristics and amino-acid composition of endosperm proteins. *Canadian Journal of Plant Science*, 50: 9-14.
- Chen W.Z. y Hoseney R.C. 1995. Development of an objective method for dough stickiness. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*, 28: 467-473.
- Chevallier S., Della Valle G., Colonna P., Broyart B., Trystram G. 2002. Structural and chemical modifications of short dough during baking. *Journal of Cereal Science*, 35: 1-10.
- Chinachoti P., Kim-Shin M.S., Mari F., Lo L. 1991. Gelatinization of wheat starch in the presence of sucrose and sodium chloride. *Cereal Chemistry*, 68: 245-248.
- Choi S.G. y Kerr W.L. 2003. Water mobility and textural properties of native hydroxypropylated wheat starch gels. *Carbohydrate polymer*, 51: 1-8.

- Christianson D.D. y Bagley E.B. 1984. Yield stresses in dispersions of swollen deformable cornstarch granules. *Cereal Chemistry*, 61: 500-503.
- Christophersen C., Otzen D.E., Norman B.E., Christensen S., Schäfer T. 1998. Enzymatic characterisation of Novamyl®, a thermostable α -Amylase. *Starch/Stärke* 50: 39–45.
- Chung O.K. 1986. Lipid-protein interactions in wheat flour, dough, gluten, and protein fractions. *Cereal Food World*, 31: 242-256.
- Chung H.J. y Liu Q. 2009. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. *Carbohydrate Polymers*, 77: 807–815.
- Civille G.V. y Szczesniak A.S. 1973. Guidelines to training a texture profile panel. *Journal of Texture Studies*, 4: 204–223.
- Cole M.S. 1982. Antistaling baking composition. Patent Application US4320151.
- Colombo A., Pérez G.T., Ribotta P.D., León A.E. 2008. A comparative study of physicochemical tests for quality prediction of Argentine wheat flours used as corrector flours and for cookie production. *Journal of Cereal Science*, 48:775-780.
- Colwell K.H., Axford D.W.E., Chamberlain N., Elton G.A.H. 1969. Effect of storage temperature on the ageing of concentrated wheat starch gels. *Journal Science Food Agriculture* 20: 550-555.
- Cooke D. y Gidley M.J. 1992. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, 227: 103–112.
- Cooper K.V. 1985. *The Australian triticale cookery book*. 1st Edition. Sawas Publishing. Adelaide, Australia, Pág. 9.
- Copeland L., Blazek J., Salman H., Chiming Tang M. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23: 1527–1534.
- Cornec M., Popineau Y., Lefebvre J. 1994. Characterisation of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *Journal of Cereal Science*, 19: 131–139.
- Cornish G.B., Bekes F., Allen H.M., Martin D.J. 2001. Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52: 1339–1348.
- Corsetti A., Gobetti M., De Marco B., Balestrieri F., Paoletti F., Russi L., Rossi J. 2000. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48: 3044–3051.
- Courtin C.M. y Delcour J.A. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, 35: 225-243.
- Courtin C.M., Roelants A., Delcour J.A. 1999. Fractionation reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1870–1877.

- Crowley P., Grau H., O'Connor P., Fitzgerald R.J., Arendt E.K. 2001. Effect of glutamin peptide on baking characteristics of bread using experimental design. *European Food Research and Technology*, 212: 192-197.
- Cuniberti M. 2004. Propuesta de clasificación del trigo argentino. *IDIA INTA*, 6: 21-25.
- Ćurić D., Karlović D., Tušak D., Petrović B., Dugum J. 2001. Gluten as a standard of wheat flour quality. *Food Technolgy Biotechnology*, 39: 353–361.
- D'Appolonia B.L. y Kunerth W.H. 1984. *The farinograph handbook*. American Association of Cereal Chemist Inc., St. Paul, Minnesota USA.
- Dail R.V. y Steffe J.F. 1990a. Dilatancy in starch solutions under low acid aseptic processing conditions. *Food Science*, 55: 1764-1765.
- Dail R.V. y Steffe, J.F. 1990b. Rheological characterization of crosslinked waxy maize starch solutions under low acid aseptic processing conditions using tube viscometry techniques. *Food Science*, 55: 1660-1665
- Davidson V.J., Ryks J., Chu T. 2001. Fuzzy models to predict consumer ratings for biscuits based on digital features. *IEEE transactions on fuzzy systems*, 9: 62-67.
- De Stefanis V.A. y Turner E.W. 1981. Modified enzyme system to inhibit bread firming method for preparing same and use of same in bread and other bakery products. Patent application US4299848.
- Debet M.R. y Gidley M.J. 2007. Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. *Journal Agriculture, Food Chemistry*, 55: 4752-4760.
- Defloor I. y Delcour J.A. 1999. Impact of maltodextrins and antistaling enzymes on the differential scanning calorimetry staling endotherm of baked bread doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 737–741.
- Del Nobile M.A., Martoriello T., Mocci G., La Notte E. 2003. Modeling the starch retrogradation kinetic of durum wheat bread. *Journal of Food Engineering*, 59: 123–128.
- del Rosario, R.R. y Pontiveros, C.R. 1983. Retrogradation of some starch mixtures. *Starch/Stärke*, 3: 86-92.
- Dennett A.L., Wilkes M.A., Trethowan R.M. 2013. Characteristics of modern triticales quality: the relationship between carbohydrate properties, alpha-amylase activity and falling number. *Journal of Cereal Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM-10-12-0129-R>•posted 05/21/2013.
- Derde L.J., Gomand S.V., Courtin C.M., Delcour J.A. 2012. Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable β -amylase, maltotetraogenic and maltogenic α -amylases. *Food Chemistry*, 135: 713–721.

- Derek R., Prentice R.D.M., Stark J.R., Gidley M.J. 1992. Granule residues and ghosts remaining after heating a-type barley-starch granules in water. *Carbohydrate Research*, 227: 121-130.
- Dewettinck K., Van Bockstaele F., Kuhne B., Van de Walle D., Courtens T.M., Gellynck X. 2008. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, 48: 243-257.
- Dexter J.E., Preston K.R., Martin D.G., Gander E.J. 1994. The effects of protein content and starch damage on the physical dough properties and bread-making quality of canadian Durum wheat. *Journal of Cereal Science*, 20: 139–151.
- Dexter J.E., Preston K.R., Tweed A.R., Kilborn R.H., Tipples K.H. 1985. Relationship of flour starch damaged and flour protein to the quality of Brazilian-style hearth bread and remix pan bread produced from hard red spring wheat. *Cereal Food World* 30: 511-514.
- Di Cagno R., De Angelis M., Corsetti A., Lavermicocca P., Arnault P., Tossutd P., Galloa G., Gobbettia M. 2003. Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiology*, 20: 67–75.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Di Rienzo J.A., Guzman A.W., Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 7: 129-142.
- Dick J. y Quick J. 1983. A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early-generation durum wheat breeding lines. *Cereal Chemistry*, 60: 315-318.
- Dobraszczyk B.J. y Morgenstern M. 2003. Rheology and the breadmaking process. *Journal of Cereal Science*, 38: 229-245.
- Doescher L.C. y Hoseney R.C. 1985. Evaluation of commercial cracker flours by test baking and study of changes occurring during sponge fermentation. *Journal of Cereal Science*, 3: 261–270.
- Don C., Lichtendonk W.J., Plijter J.J., Hamer R.J. 2003. Glutenin macropolymer: a gel formed by particles. *Journal of Cereal Science*, 37: 1–7.
- Donelson J. y Gaines C. 1988. Starch–water relationships in the sugar-snap cookie dough system. *Cereal Chemistry*, 75: 660–664.
- Donovan J. W., Lorenz K., Kulp K. 1983. Differential scanning calorimetry of heat–moisture treatment of starches. *Cereal Chemistry*, 60: 381–387.
- Donovan J.W. 1979. Phase transitions of the starch–water system. *Biopolymers*, 18: 263–275.
- Donovan J.W. y Mapes C.J. 1980. Multiple phase transitions of starches and Nägeli amyloextrins. *Starch-Stärke*, 32: 190–193.

- Doublier J.L. 1981. Rheological studies on starch. Flow behavior of wheat starch pastes. *Starch/Stärke* 33: 415-420.
- Dowell F.E., Maghirang E.B., Pierce R.O., Lookhart G.L., Bean S.R., Xie F., Caley M.S., Wilson J.D., Seabourn B.W., Ram M.S., Park S.H., Chung O.K. 2008. Relationship of bread quality to kernel, flour, and dough properties. *Cereal Chemistry*, 85: 82-91.
- Doxastakis G., Zafiriadis I., Iraklib M., Marlani H., Tananaki C. 2002. Lupin, soya and triticale addition to wheat flour dough and effect on rheological properties. *Food Chemistry*, 77: 219-227.
- Dragsdorf R.D. y Varriano-Marston E. 1980. Bread-staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with α -amylases from different sources. *Cereal Chemistry*, 57: 310–314.
- Drapron R. y Godon B. 1987. Capítulo: Role of enzymes in baking. En: *Enzymes and their role in cereal technology*. Editado por Kruger J.E., Lineback D. y Stauffer C.E. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Du C.J. y Sun D.W. 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 230–249.
- Duedahl-Olesen L., Zimmerman W., Delcour J.A. 1999. Effects of low molecular weight carbohydrates on farinograph characteristics and staling endotherms of wheat flour-water doughs. *Cereal Chemistry*, 76: 227–230.
- Duran E., León A., Barber B., Benedito de Barber C. 2001. Effect of low molecular weight dextrans on gelatinization and retrogradation of starch. *European Food Research and Technology*, 212: 203–207.
- Durrani C.M. y Donald A.M. 1995. Physical characterization of amylopectin gels. *Polymer Gels and Networks*, 3: 1-27.
- Duyvejonck A.E., Lagrain B., Pareyt B., Courtin C.M., Delcour J.A. 2011. Relative contribution of wheat flour constituents to Solvent Retention Capacity profiles of European wheats. *Journal of Cereal Science*, 53: 312-318.
- Eckert B., Amend T., Belitz H.D. 1993. The course of the SDS and Zeleny sedimentation tests for gluten quality and related phenomena studied using the light microscope. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A* 196: 122–125.
- Edwards M.A., Osborne B.G., Henry R.J. 2008. Effect of endosperm starch granule size distribution on milling yield in hard wheat. *Journal of Cereal Science*, 48: 180–192.
- Edwards N.M., Dexter J.E., Scanlon M.G., Cenkowski S. 1999. Relationship of creep-recovery and dynamic oscillatory measurements to durum wheat physical dough properties. *Cereal Chemistry*, 76: 638-645.
- Edwards N.M., Peressini D., Dexter J.E., Mulvaney S.J. 2000. Viscoelastic properties of durum wheat and common wheat dough of different strengths. *Rheological Acta*, 40: 142-153.

- Eliasson A. y Larsson K. 1993a. Capítulo 7: Bread. En: *Cereals in Breadmaking: A molecular colloidal approach*. Editado por Eliasson A, Larsson K. Marcel Dekker, USA.
- Eliasson A.C. 1983. Differential scanning calorimetry studies on wheat starch-gluten mixtures. II. Effect of gluten and sodium stearyl lactylate on starch crystallization during ageing of wheat starch gels. *Journal of Cereal Science*, 1: 207-213.
- Eliasson A.C. 1986. Viscoelastic behavior during the gelatinization of starch: 1. Comparison of wheat, maize, potato and waxy barley starches. *Journal Texture Studies*, 17: 253-265.
- Eliasson A.C. y Gudmundsson M. 1996. Capítulo: Starch: Physicochemical and functional properties. En: *Carbohydrates in food*. Editado por Eliasson A. Marcel Dekker Inc., Nueva York, USA.
- Eliasson A.C., Gudmundsson M., Svensson G. 1995. Thermal Behaviour of Wheat Starch in Flour Relation to Flour Quality. *Lebensm.-Wiss-u.-Technol.*, 28: 227-235.
- Eliasson, A.C., Larsson, K. 1993b. Capítulo 2: Physicochemical behavior of the components of wheat flour. En: *Cereals in breadmaking. A molecular colloidal approach*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Ellis H.S., Ring S.G., Whittam M.A. 1989. A comparison of the viscous behavior of wheat and maize starch pastes. *Journal of Cereal Science*, 10: 33-4.
- El-Porai E.S., Salama A.E., Sharaf A.M., Hegazy A.I., Gadallah M.G.E. 2013. Effect of different milling processes on Egyptian wheat flour properties and pan bread quality. *Annals of Agricultural Science*, 58: 51–59.
- Erekul O. y Köhn W. 2006. Effect of weather and soil conditions on yield components and bread-making quality of winter wheat (*Triticumaestivum* L.) and winter triticale (*Triticosecale* Wittm.) varieties in north-east Germany. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 192: 452-464.
- Evans I.D. y Haisman D.R. 1979. Rheology of gelatinized starch suspensions. *Journal of Texture Studies*, 10: 347-370.
- Evans I.D. y Haisman D.R. 1982. The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. *Starch/Stärke*, 34: 224–231.
- Evers A.D. y Stevens D.J. 1985. Capítulo: Starch damaged. En: *Advances in cereal science and technology*, Vol. VII. Editado por Pomeranz Y. America Association of Cereal Chemistry Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Ewart J.A.D. 1972. A modified hypothesis for the structure and rheology of glutelins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23: 687–699.
- Ewart J.A.D. 1989. Hypothesis for how linear glutenin holds gas in dough. *Food Chemistry*, 32: 135-150.
- Farhat A. y Blanshard J.M.V. 1997. On the extrapolation of the melting temperature of dry starch from starch-water data using the Flory-Huggins equation. *Carbohydrate polymers*, 34: 263-265.

- Faridi H. 1990. Capítulo 8: Applications of rheology in the cookies and cracker industry. En: Dough rheology and baked product texture. Editado por Faridi H., Faubion J. M. Van Nostrand Reinhold Inc., New York, USA.
- Farrand E.A. 1964. Flour properties in relation to the modern bread processes in the United Kingdom, with special reference to alpha-amylase and starch damage. *Cereal Chemistry*, 41: 98-111.
- Farrand E.A. 1972. The influence of particle size and starch damage on the characteristics of bread flours. *Baker's Dig.* 46: 22-26.
- Feillet P. 2000. Capítulo 3: Amidon, pentosanes et lipides. En: Le grain de blé. Editado por Feillet P. INRA edition 147rue de l'université 75338 Paris Cedex 07.
- Fennema O.R. 2000. Capítulo 2: Agua y hielo. En: Química de los alimentos. Acribia, Editorial, S.A.
- Ferrero C., Martino M.N., Zaritsky N.E. 1996. Effect of hydrocolloids on starch thermal transition as measured by DSC. *Journal of Thermal Analysis*, 47: 1247-1266.
- Ferry J.D. 1980. Capítulo 1: The nature of viscoelastic behavior. En: Viscoelastic properties of polymers. 3rd Edition. Editado por Ferry J.D. Wiley y Sons Inc., Nueva York, USA.
- Finney K.F. y Barmore M.A. 1948. Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. *Cereal Chemistry*, 25: 291-312.
- Finney K.F., Morris V.H., Yamazaki W.T. 1950. Micro versus macro cookie baking procedures for evaluating the cookie quality of wheat varieties. *Cereal Chemistry*, 27:42.
- Finney P.L. 2001. Effects of falling number sample weight on prediction of alfa-amylase activity. *Cereal Chemistry*, 78: 485-487.
- Flory P.J. 1953. Principles of polymer chemistry. Cornell University Press, Ithaca: New York.
- Fredriksson H., Silverio J., Anderson R., Eliasson A. C., Aman P. 1998. The influence of amylose and amylopectine characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers*, 35: 119- 134.
- French D. 1984. Capítulo: Organization of starch granules. En: Starch chemistry and technology 2nd Edition. Editado por Whistler R.L., BeMiller J.N. y Paschal E.F. Academic Press, Nueva York, USA.
- Fujii M. y Kawamura Y. 1985. Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 260-265.
- Fujii M., Homma T., Taniguchi M. 1988. Synergism of alpha-amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. *Biotechnology and Bioengineering*, 32: 910-915.
- Fujii M., Murakami S., Yamada Y., Ona T., Nakamura T. 1981. A kinetic equation for hydrolysis of polysaccharides by mixed exo- and endoenzyme systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 1393-1398.
- Gaines C.S. 2000. Report of the AACC committee on soft wheat flour. Solvent Retention Capacity Profile - Method 56-11. *Cereal Foods World*, 45: 303-306.

- Gaines C.S. y Finney P.L. 1989. Effects of selected commercial enzymes on cookiespread and cookie dough consistency. *Cereal Chemistry*, 66: 73–8.
- Gaines C.S., 1990. Influence of chemical and physical modification of soft wheat protein on sugar-snap cookie dough consistency, cookie size and hardness. *Cereal Chemistry*, 67: 73-77.
- Gaines C.S., Donelson J., Finney J. 1988. Effects of damaged starch, chlorine gas, flour particle size, and dough holding time and temperature on cookie dough handling properties and cookie size. *Cereal Chemistry*, 65: 384–389.
- Gallagher E., O'Brien C.M., Scannell A.G.M., Arendt E.K. 2003. Use of response surface methodology to produce functional short dough biscuits. *Journal of Food Engineering*, 56: 269-271.
- Gallant D.J., Bouchet B., Baldwin P.M. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymer*, 32: 177-191.
- 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.
- Gérard C., Barron C., Colonna P., Planchot V. 2001. Amylose determination in genetically modified starches. *Carbohydrate Polymers*, 44: 19-27.
- Germani R., Ciacco C.F., Rodriguez-Amaya D.B. 1983. Effect of sugars, lipids and type of starch on the mode and kinetics of retrogradation of concentrated corn starch gels. *Starch/Stärke*, 35: 377-381.
- Gerrard J.A., Every D., Sutton K.H., Gilpin M.J. 1997. The role of maltodextrins in the staling of bread. *Journal of Cereal Science*, 26: 201–209.
- Ghiasi K., Hosney R.C., Zeleznak K., Rogers D.E. 1984. Effect of waxy barley starch and reheating on firmness of bread crumb. *Cereal Chemistry*, 61: 281-285.
- Ghodke S.K., Ananthanarayan L., Rodrigues L. 2009. Use of response surface methodology to investigate the effects of milling conditions on damaged starch, dough stickiness and chapatti quality. *Food Chemistry*, 112: 1010–1015.
- Giboreau A., Cuvelier G., Launay B. 1994. Rheological behavior of three biopolymer/water systems with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. *Journal of Texture Studies*, 25: 119-137.
- Gibson T.S., Solah V.A., McCleary B.V. 1997. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with Concanavalin A. *Journal of Cereal Science*, 25: 111– 119.
- Gillian D. A. Lowy J.G. Sargeant J., Schofield D. 1981. Wheat starch granule protein: The isolation and characterisation of a salt-extractable protein from starch granules. *Journal Science of Food Agriculture*, 32: 371-377.
- Gilliard T. y Bowler P. 1987. Morphology and composition of starch. *Critical Reports on Applied Chemistry* 13: 55-78.

- Giroux M.J. y Morris C.F. 1997. A glycine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical and Applied Genetic*, 95: 857-864.
- Goesaert H., Bijttebier A., Delcour J.A. 2010. Hydrolysis of amylopectin by amylolytic enzymes: level of inner chain attack as an important analytical differentiation criterion. *Carbohydrate Research*, 345: 397–401.
- Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke W.S., Courtin C.M., Gebruers K., Delcour J.A. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science y Technology*, 16: 12-30.
- Goesaert H., Slade L., Levine H., Delcour J.A. 2009. Amylases and bread firming – an integrated view. *Journal of Cereal Science*, 50: 345–352.
- Gómez Pallarés M., León A.E., Rosell C. 2006. Capítulo 1: Trigo. En: *De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. Editado por León A.E. y Rosell C. Córdoba, Argentina.
- Gómez Pallarés M., Oliete B., Ruiz E., Caballero P.A. 2012. Adequacy of wholegrain non-wheat flours for layer cake elaboration. *LWT – Food Science Technology*, 43: 507-513.
- Gosselin R., Duchesne C., Rodrigue D. 2008. On the characterization of polymer powders mixing dynamics by texture analysis. *Powder Technology*, 183: 177-188.
- Gras P.W., Carpenter H.C., Anderssen R.S. 2000. Modelling the developmental rheology of wheat-flour dough using extension tests. *Journal Cereal Science*, 31: 1–13.
- Graveland A., Bosveld P., Lichtendonk W.J., Moonen J.H.E. 1980. Superoxide involvement in the reduction of disulfide bonds of wheat gel proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93: 1189–1195.
- Gray J.A. y Bemiller J.N. 2003. Bread Staling: Molecular Basis and Control. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*, 2: 1-21.
- Graybosch R.A., Peterson C.J., Moore K.J., Stearns M., Grant D.L. 1993. Comparative effects of wheat flour protein, lipid and pentosan composition in relation to baking and milling quality. *Cereal Chemistry*, 70: 95–101.
- Grosch W. y Wieser H. 1999. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science*, 29: 1–16.
- Gudmundsson M. 1994. Retrogradation of starch and the role of its components. *Thermochimica Acta*, 246: 329-341.
- Gudmundsson M., Eliasson A.C., Bengtson S., Aman P. 1991. The effects of watersoluble arabinoxylan on gelatinization and retrogradation of starch. *Starch/Stärke*, 43: 5–10.

- Gumeta-Chávez C., Chanona-Pérez J.J., Mendoza-Pérez J.A., Terrés-Rojas E., Garibay-Feble V., Gutiérrez-López G.F. 2011. Shrinkage and deformation of *Agave atrovirens* Karw tissue during convective drying: influence of structural arrangements. *Drying Technology*, 29: 1532-2300.
- Gupta R.B., Bately I.L., Mac Ricie F. 1992. Relationships between protein composition and functional properties of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 69: 125-131.
- Gupta R.B., Paul J.G., Cornish G.B., Palmer G.A., Bekes F., Rathjen A.J. 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *Journal of Cereal Science*, 19: 9-17.
- Gupta R.B., Singh N.K., Shepherd K.W. 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 57-64.
- Guttieri M.J., McLean R., Lanning S.P., Talbert L.E., Souza E. 2002. Assessing environmental influences on solvent retention capacities of two soft white spring wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 79: 880-884.
- Habeych E., Guo X., Van Soest J., Van der Goot A. J., Boom R. 2009. On the applicability of Flory-Huggins theory to ternary starch-water-solute systems. *Carbohydrate Polymers*, 77: 703-712.
- Hamer R.J. 1992. Capítulo: Enzymes in the baking industry. En: *Cereal chemistry and technology: a long past and a bright future*. En: *Proceedings of the 9th international cereal and bread congress, Paris, France*. Editado por Felliet P. Institut de Recherche Technologique Agroalimentaire des Céréales (IRTAC), Paris, France.
- Han X.Z., Campanella O.H., Mix N.C., Hamaker B.R. 2002. Consequence of starch damage on rheological properties of maize starch pastes *Cereal Chemistry*, 79: 897-901.
- Haralick R.M., Shanmugam K., Dinstein I. 1973. Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics SMC*, 3: 610-621.
- Harrod M. 1989. Modelling of flow properties of starch pastes prepared by different procedures. *Journal Food Process Engineering*, 11: 257-275.
- He H. y Hosene R.C. 1991. Gas retention of different cereal flours. *Cereal Chemistry* 68: 334-336.
- Hebeda R.E., Bowles L.K., Teague W.M. 1991. Use of intermediate temperature stability enzymes for retarding staling in baked goods. *Cereal Foods World*, 36: 619-622.
- Hiemenz P.C. 1984. Capítulo 4: The glassy and crystalline state. En: *Polymer chemistry: The basic concepts*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Hizukuri S. 1986. Polymodal distribution of chain lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydrate Research*, 147: 342-347.
- Hoffman R.L. 1982 Discontinuous and dilatant viscosity behaviour in concentrated suspensions III. Necessary conditions for their occurrence in viscometric flow. *Advances in Colloid and Interface Science*, 17: 161-184.

- Holas J. y Tipples K.H. 1978. Factors affecting farinograph and baking absorption. I. Quality characteristics of flour streams. *Cereal chemistry*, 55: 637-652.
- Hongsheng L., Fengwei X., Long Y., Ling C., Lin L. 2009. Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in Polymer Science*, 34: 1348–1368.
- Hoover R. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, 45: 253–267.
- Hoover R. y Vasanthan T. 1994. The effect of annealing on the physico-chemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. *Journal of Food Biochemistry*, 17: 303–325.
- Hoseney R.C. 1984. Functional properties of pentosans in baked foods. *Food Technology*, 38: 114–117.
- Hoseney R.C. 1994a. Capítulo 1: Structure of cereal. En: *Principles of cereal science and technology*, 2nd Edition. Editado por Hoseney R.C. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Hoseney R.C. 1994b. Capítulo 11: Rheology of doughs and batters. En: *Principles of cereal science and technology*, 2nd Edition. Editado por Hoseney R.C. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Hoseney R.C. 1994c. Capítulo 10: Gluten proteins. En: *Principles of Cereal science and technology*, 2nd Edition. Editado por Hoseney R.C. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Hoseney R.C. 1994d. Capítulo 6: Dry milling of cereal. En: *Principles of cereal science and technology*, 2nd Edition. Editado por Hoseney, R.C. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Hoseney R.C. 1994e. Capítulo 12: Yeast-Leavened products. En: *Principles of cereal science and technology*, 2nd Edition. Editado por Hoseney R.C. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Hoseney R.C., Smewing J. 1999. Instrumental measurement of stickiness of dough and other food. *Journal of Texture Studies*, 30: 123-136.
- Hoseney R.C., Zeleznak K.J., Yost D.A. 1986. A note on the gelatinization of starch. *Starch/Stärke*, 38: 407-409.
- Hug-Iten S., Handschin S., Conde-Petit B., Escher F. 1999. Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 32: 255–260
- l'Anson K.J., Miles M.J., Morris V.J., Besford L.S., Jarvis D.A., Marsh R.A. 1990. The effects of added sugars on the retrogradation of wheat starch gels. *Journal of Cereal Science*, 11: 243-248.
- Indrani D. y Venkateswara Rao G. 2007. Rheological characteristics of wheat flour dough as influenced by ingredients of parotta. *Journal of Food Engineering*, 79: 100–105.

- Jackman P. y Sun D.W. 2013. Recent advances in image processing using image texture features for food quality assessment. *Trends in Food Science and Technology*, 29: 35-43.
- Jay-Lin J. 2009. Capítulo 6: Structural features of starch granules II. En: *Starch: chemistry and technology*, 3rd Edition. Editado por BeMiller J.N. y Whistler R.L. Academic Press, New York, USA. Elsevier Inc.
- Jeffrey G.A. y Saenger W. 1994. Part III: Hydrogen bonding in biological macromolecules: Capítulo 19: Hydrogen bonding in proteins. En: *Hydrogen bonding in biological structures*. Springer-Verlag Inc., Berlin.
- Jenkins P.J. y Donald A.M. 1998. Gelatinization of starch: A combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. *Carbohydrate Research*, 308: 133–147.
- Jenkins P.J., Cameron R.E., Donald A.M. 1993. A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke*, 45: 417-420.
- Jobling S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 210-218.
- Johnson R.A. y Wichern D.W. 1998. *Applied multivariate statistical analysis*, 4th Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Johnson R.H. y Welch E.A. 1968. Baked goods dough and method. US Patent, Application US, 3: 368-903.
- Joshi P. y Brimelow C. 2002. Parte I: Capítulo 5: Colour measurement of food by colour reflectance. En: *Colour in food*. Editado por MacDougall D.B. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. Cambridge, England.
- Jouppilaav K., Kansikas J., Roos Y.H. 1998. Factors affecting crystallization and crystallization kinetics in amorphous corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 36: 143-149.
- Jovanovich G., Campaña L., Cardós M., Lupano C.E. 2003. Correlation between starch damaged, alveograph parameters, water absorption and gelatinization enthalpy in flour obtained by industrial milling of Argentinian wheats. *Food Technology*, 1: 168-172.
- Juszczak L., Fortuna T., Krok F. 2003. Non-contact atomic force microscopy of starch granules surface. Part II. Selected cereal starches. *Starch/Stärke*, 55: 8–16.
- Karkalas L., Tester R.E., Morrison W.R. 1992. Properties of damaged starch granules. I. Comparison of a micromethod for the enzymic determination of damaged starch with the standard AACCC and Farrand methods. *Journal of Cereal Science*, 16: 237-251.
- Karlsson R., Olered R., Eliasson A.C. 1983. Changes in starch granule size distribution and starch gelatinisation properties during development and maturation of wheat, barley and rye. *Starch/Stärke*, 35: 335-340.
- Karperien A., Lucas C., Depardieu C., Aurel G., Jelinek H. F. 2005. Fractal analysis of microglial morphology. In proceeding of: European Conference on Complex. 226–227.

- Kasarda D.D. 1999. Glutenin Polymers: The in vitro to in vivo transition. *Cereal Food World*, 44: 566–571.
- Kasarda D.D., Bernardin J., Nimmo C. 1976. Capítulo: Wheat proteins. En: *Advances in cereal science and technology*, Vol. I. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Keetels C.J.A.M., van T., Walstra P. 1996. Gelation and retrogradation of concentrated starch systems: 1 Gelation. *Food Hydrocolloids*, 10: 343–353.
- Kendall M.G. 1975. *Multivariate analysis*. Charles Griffin and Company Ltd. London. Great Britain.
- Kenkel N.C. y Walker D.J. 1996. Fractals in the biological sciences. *Coenoses*, 1: 77–100.
- Kerdpi boon S. y Devahastin S. 2007. Fractal characterization of some physical properties of a food product under various drying conditions. *Drying Technology*, 25: 135–146.
- Khan K. y Bushuk W. 1979. Studies of glutenin. XII. Comparison of SDS-PAGE of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedures. *Cereal Chemistry*, 56: 63–68.
- Khatkar B.S., Bell A.E., Schofield J.D. 1995. The dynamic rheological properties of gluten and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. *Journal of Cereal Science*, 22: 29–44.
- Khatkar B.S., Fido R.J., Tatham A.S., Schofield J.D. 2002. Functional properties of wheat gliadins. II. Effects on dynamic rheological properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 35: 307–313.
- Kihlberg I., Johansson L., Kohler A., Risvik E. 2004. Sensory qualities of whole wheat pan bread – Influence of farming system, milling and baking Technique. *Journal of Cereal Science*, 39: 67–84.
- Kim J.H., Maeda T., Morita N. 2006. Effect of fungal α -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. *Food Research International*, 39: 117–126.
- Kim S.K. y D'Appolonia B.L. 1977a. Bread staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread and bread staling rate. *Cereal Chemistry*, 54: 225–229.
- Kim S.K. y D'Appolonia B.L. 1977b. Effect of pentosans on the retrogradation of wheat starch gels. *Cereal Chemistry*, 54: 150–160.
- Kirby A.R., Gunning A.P., Morris V.J. 1995. Atomic force microscopy in food research: a new technique comes from age. *Trends Food Science Technology*, 6: 359–365.
- Kitterman J.S. y Rubenthaler G.L. 1971. Assessing the quality of early generation wheat selections with the micro AWRC test. *Cereal Science Today*, 16: 313–316.

- Kragh K.M. 2002. Capítulo: Amylases in baking. En: Recent Advances in enzymes in grain processing. 3rd Edition. Editado por Courtin C.M., Veraverbeke W.S., y Delcour J.A. Laboratory of Food Chemistry, KULeuven, Leuven, Belgium.
- Krok F., Szymoska J., Tomasik P., Szymoski M. 2000. Non-contact AFM investigation of influence of freezing process on the surface structure of potato starch granule. *Applied Surface Science*, 157: 382-386.
- Kruger J.E. y Hatcher D.W. 1995. FY sedimentation test for evaluation of flour quality of Canadian wheats. *Cereal Chemistry*, 72: 33-37.
- Ktenioudaki A., Butler F., Gallagher E. 2011. Dough characteristics of Irish wheat varieties II. Aeration profile and baking quality. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 602-610.
- Kulp K. y Ponte J.G. 1981. Staling of white pan bread: Fundamental causes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15: 1-48.
- Kulp K., Olewnik M., Lorenz K., Collins F. 1991. Starch functionality in Cookie systems. *Starch/Stärke* 43: 53-57.
- Kweon M., Slade L., Levine H., Martin R.J., Andrews L.C., Souza E.J. 2009. Effects of extent of chlorination, extraction rate, and particle size reduction on flour and gluten functionality explored by Solvent Retention Capacity (SRC) and Mixograph. *Cereal Chemistry*, 86: 221-224.
- Larroque O., Gianibelli M., Gómez Sánchez M., MacRitchie F. 2000. Procedure for obtaining stable extracts of cereal flour and whole meal for size-exclusion HPLC analysis. *Cereal Chemistry*, 77: 448-450.
- 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.
- Lebail P., Buléon A., Shiftan D., Marchessault R.H. 2000. Mobility of lipid in complexes of amylose-fatty acids by deuterium and ^{13}C solid state NMR. *Carbohydrate Polymers*, 43: 317-326.
- Lee M.R., Swanson B.G., Baik B.K. 2001. Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*, 78: 701-706.
- Lee, M. H., Baek, M. H., Cha, D. S., Park, S. T., Lim, S. T. 2002. Freeze-thaw stabilization of sweet potato starch gel by polysaccharide gums. *Food Hydrocolloids*, 16: 345-352.
- Lelievre J. 1976. Theory of gelatinization in a starch-water-solute system. *Polymer*, 17: 854-858.
- Lelley, T. 1992. Triticale, still a promise. *Plant breeding*. 109: 1-17.
- Leman P., Bijttebier A., Goesaert H., Vandeputte G.E., Delcour J.A. 2006. Influence of amylases on the rheological and molecular properties of partially damaged wheat starch. *Journal Science Food Agriculture*, 86: 1662-1669.

- Leman P., Goesaert H., Delcour J.A. 2009. Residual amylopectin structures of amylase-treated wheat starch slurries reflect amylase mode of action. *Food Hydrocolloids* 23: 153–164.
- Leman P., Goesaert H., Vandeputte G.E., Lagrain B., Delcour J.A. 2005. Maltogenic amylase has a non-typical impact on the molecular and rheological properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, 62: 205–213.
- Lemelin E., Branlard G., Salvo L., Lein V., Aussenac T., Dayde J. 2005. Breadmaking stability of wheat flours: Relation between mixing properties and molecular weight distribution of polymeric glutenins. *Journal of Cereal Science*, 42: 317–326.
- León A., Duran E., de Barber B.C. 1997. A new approach to study starch changes occurring in the dough-baking process and during bread storage. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 204, 316–320.
- León A.E., Rubiolo A., Añon M.C. 1996. Use of triticale in cookies: quality factors. *Cereal chemistry*, 73: 779-784.
- León, A.E. 1995. Estudio de las propiedades de las harinas de las triticales: Influencia de las proteínas y el almidón sobre la calidad para elaborar galletitas. Tesis Doctoral. Fac. Cs. Exactas UNLP.
- Lepori L. y Gianni, P. 2000. Partial molar volumes of ionic and nonionic organic solutes in water: a simple additivity scheme based on the intrinsic volume approach. *Journal of Solution Chemistry*, 29: 405–447.
- Létang C., Piau M., Verdier C. 1999. Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 41: 121-132.
- Levine H. y Slade L. 1992. Capítulo: Glass transitions in foods. En: *Physical chemistry of foods*. Editado por Schwartzberg H.G. y Hartel R.W. Dekker Inc., Nueva York.
- Lezcano E. 2006. Trigo y sus derivados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Agroindustria y Mercados. Dirección Nacional de Alimentos. Ministerio de Economía y Producción - Buenos Aires, Republica Argentina.
- Lin P.Y. y Czuchajowska Z. 1996. Starch damage in soft wheats of the Pacific Northwest. *Cereal Chemistry*, 73: 551-555.
- Lindahl L. 1990. Rheological properties in wheat flour systems. Molecular and interfacial basis. Thesis Doctoral. Lund University, Sweden.
- Lindeboom N., Chang P.R., Tyler R.T. 2004. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: A review. *Starch/Stärke*, 56: 89-99.
- Lindsay M. y Skerritt J. 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure function perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 247- 253.
- Linko Y.Y., Javanainen P., Linko S., 1997. Biotechnology of bread baking. *Trends in Food Science and Technology* 8: 339-344.

- Liu H. y Lelievre J. 1993. A model of starch gelatinization linking differential scanning calorimetry and birefringence measurements. *Carbohydrate Polymers*, 20: 1–5.
- Liu H., Yu L., Xie F.W., Chen L. 2006. Gelatinization of corn starch with different amylase/amylopectin contents. *Carbohydrate Polymers*, 65: 357-363.
- Liu Q. y Thompson D.B. 1998. Retrogradation of du wx and su2 wx maize starches after different gelatinization heat treatments. *Cereal Chemistry*, 75: 868–874.
- Locken L., Laska S., Shuey W. 1972. *The Farinograph Handbook*. 2nd ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN.
- Longton J. y LeGrys G.A. 1981. Differential scanning calorimetry studies on the crystallinity of ageing wheat starch gels. *Starch-Stärke*, 33: 410-414.
- Lopes da Silva J.A. y Rao M.A. 1999. Capítulo 6: Rheological behavior of food gel systems. En: *Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Lorenz K. y Welsh J.R. 1976. Alpha-amylase and protease activity of maturing triticale and its parental species. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 9: 7-10.
- Maache-Rezzoug Z., Bouvier J., Alla K., Patras C. 1998. Effect of principal ingredients on rheological behaviour of biscuit dough and on quality of biscuits. *Journal of food engineering*, 35: 23-42.
- MacRitchie F. 1981. Flour lipids: Theoretical aspects and functional properties. *Cereal Chemistry*, 58: 156-158.
- MacRitchie F. 1992. Capítulo 1: Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. En: *Advances in food and nutrition research*. Editado por Kinsella J. E. Academic Press, London, England.
- Mailhot W.C. y Patton J.C. 1988. Capítulo: Criteria of flour quality. En: *Wheat: chemistry and technology*, Vol. II. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota, USA.
- Makarska E., Ciolek A., Kociuba W. 2008. Composition of gluten proteins and quality parameters of winter triticale hybrids. *Pol. J. Food Nutrition Sci.*, 58: 341-344.
- Maleki M., Hosney R.C., Mattern P.J. 1980. Effects of loaf volume, moisture content, and protein quality on the softness and staling rate of bread. *Cereal Chemistry* 57: 138-140.
- Malvern Instruments. 1999. *Operators guide: Man.0247 Issue 2.0*. Worcestershire. Malvern Instruments Ltd., United Kingdom.
- Maningat C.C., Seib P.A., Bassi S.D., Woo K.S., Lasater G.D. 2009. Capítulo 10: Wheat starch: production, properties, modification and uses. En: *Starch: chemistry and technology*, 3rd Edition. Editado por BeMiller J.N. y Whistler R.L. Academic Press, Elsevier Inc., New York, USA.

- Manley, D.J.R. 2000. Parte III: Types of Biscuits: Capítulo 27: Short dough biscuits. En: Technology of biscuits, crackers, and cookies. 3rd Edition. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. Cambridge, England
- Manners D.J. 1989. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, 11: 87-112.
- Mao Y. y Flores R.A. 2001. Mechanical starch damage effects on wheat flour tortilla texture. *Cereal Chemistry*, 78: 286–293.
- Martin M.L., Zeleznak K.J., Hosney R.C. 1991. A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. *Cereal Chemistry*, 68: 498–503.
- Masi P., Cavella S., Sepe M. 1998. Characterization of dynamic viscoelastic behavior of wheat flour doughs at different moisture contents. *Cereal Chemistry*, 75: 428-432.
- Matz S.A. 1995. Capítulo 1: Wheat. En: The chemistry and technology of cereals as food and feed. 2nd Edition. Editado por Matz S.A. Van Nostrand Reinhold/AVI, New York, USA.
- Matz S.A. 1999. Sección I: The materials of baking: Capítulo 1: Ingredientes from wheat. En: Bakery technology and engineering. 3rd Edition. Editado por Matz S.A. Pan-Tech International, USA.
- McIver R.G., Oxford D.W.E., Colwell H.K., Elton G.A. 1968. Kinetic study of the retrogradation of gelatinized starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19: 560–563.
- Mendoza F., Dejmek P., Aguilera J. M. 2007. Colour and image texture analysis in classification of commercial potato chips. *Food Research International*, 40: 1146–1154.
- Menjivar J.A. y Faridi H. 1994. Capítulo 8: Rheological properties of cookie and cracker doughs. En: The science of cookie and cracker production. Editado por Faridi H. New York: Chapman & Hall.
- Mercier J.P., Zambelli G., Kurz W. 2002. Capítulo 10: Phase transformation. Introduction to materials science, Elsevier, Paris.
- Metakovskii E.V., Wrigley C.W., Bekes F., Gupta R.B. 1990. Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41: 289–306.
- Meuser F. y Suckow P. 1986. Capítulo: Non-starch polysaccharides. En: Chemistry and physics of baking: materials, processes, and products. Editado por Blanshard M.V., Frazier P.J., Galliard T. The Royal Society of Chemistry, London, England.
- Miles M.J., Morris V.J., Orford P.D., Ring S.G. 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135: 271-281.
- Miles M.J., Morris, V.J., Ring S.G. 1984. Some recent observations on the retrogradation of amylose. *Carbohydrate polymer*, 4: 73-77.

- 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.
- Miyazaki M., Maeda T., Morita N. 2004. Effect of various dextrin substitutions for wheat flour on dough properties and bread qualities *Food Research International*, 37: 59–65.
- Moates G.K., Parker R., Ring S.G. 1998. Preferential solvent interactions and the dissolution of the B-type crystalline polymorph of starch in aqueous solutions. *Carbohydrate Research* 313: 225–234.
- Moiraghi M., Ribotta P.D., Aguirre A., Pérez G.T., León A.E. 2005. Análisis de la aptitud de trigos pan para la elaboración de galletitas y bizcochuelos. *Agriscientia XXII*: 47-54.
- Moiraghi M., Vanzetti L., Bainotti C., Helguera M., León A., Pérez G. 2011. Relationship between soft wheat flour physicochemical composition and cookie-making performance. *Cereal Chemistry*, 88: 130–136.
- Moita Brites C., Igrejas G., León A.E. 2006. Capítulo 4: Centeno y Triticales. En: De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Editado por Baez H. Argentina.
- Mok C. y Dick J.W. 1991. Response of starch of different wheat clones to ball milling. *Cereal Chemistry*, 68: 409-412.
- Moon M.H. y Giddings J.C. 1993. Rapid separation and measurement of particle size distribution of starch granules by sedimentation/steric fieldflow fractionation. *Journal of Food Science*, 58: 1166-1171.
- Morris V.J. 1990. Starch gelation and retrogradation. *Trends in Food Science and Technology*, 1: 2-6.
- Morris V.J., Ridout M.J., Parker M.L. 2005. AFM of starch: Hydration and imagecontrast. *Progress in Food Biopolymer Research*, 1, 28–42.
- Morrison W.R. y Laignelet B. 1983. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches *Journal of Cereal Science*, 1: 9–2.
- Morrison W.R. y Tester R.F. 1994. Properties of damaged starch granules. IV. Composition of ball-milled wheat starches and of fractions obtained on hydration. *Journal of Cereal Science*, 20: 69–77.
- Morrison W.R., Law R.V., Snape C.E. 1993. Evidence for inclusion complexes of lipids with V-amylose in maize, rice and oat starches. *Journal of Cereal Science*, 18: 107–109.
- Morrison W.R., Tester R.F., Gidley M.J. 1994. Properties of damaged starch granules II. Crystallinity, molecular order and gelatinization of ball-milled starches. *Journal of cereal science*, 19: 209-217.
- Mua J.P. y Jackson D.S. 1998. Retrogradation and gel textural attributes of corn starch amylose and amylopectin fractions. *Journal of Cereal Science*, 27: 157-166.

- Multon J.L., Bizot H., Savet B. 1980. Capítulo: Water absorption in cereal foods and water activity measurement. En: *Cereals for food and beverages*. Editado por Inglerltt G.E. y Munck L. Academic Press: New York.
- Muralikrishnaa G. y Nirmala M. 2005. Cereal alfa-amylases - An overview. *Carbohydrate Polymers*, 60: 163–173.
- Naeem H.A., Darvey N.L., Gras P.W., MacRitchie F. 2002. Mixing properties, baking potencial and funtionality changes in storage protein during dough development of triticale-wheat flour blends. *Cereal Chemistry*, 79: 332-339.
- Naik H.R., Sekhon K.S., Abbas Wani A. 2010. Physicochemical and dough-handling characteristics of Indian wheat and triticale cultivars. *Food Science and Technology International*, 16: 371-379.
- Nelder J.A. 1994. The Statistics of linear models: Back to basics. *Statistics and Computing*, 4: 221-234.
- Ng P. y Bushuk W. 1987. Glutenin of marquish wheat as a reference for estimating molecular wheights of glutenin subunits by sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 64: 324-327.
- Noda T., Takahata Y., Sato T.T., Ikoma H., Mochinda H. 1996. Physicochemical properties of starches from purple and orange fleshed sweet potato roots at two levels of fertilizer. *Starch/ Stärke* 48: 395–399.
- Noel T.R., Ring S.G., Whittam M.A. 1993. Capítulo: Physical properties of starch products: Structure and function. En: *Food colloids and polymers: Stability and mechanical properties*, Editado por Dickinson E. y Wolstra P. Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.
- Obanni M. y BeMiller J.N. 1996a. Ghost microstructures of starch from different botanical sources. *Cereal Chemistry*, 73: 333-337.
- Obanni M. y BeMiller J.N. 1996b. Identification of starch from various maize endosperm mutants via ghost structures. *Cereal Chemistry*, 72: 436-442.
- Oettler G. 2002. Improving falling number by recurrent selection in winter triticale. En: *Proc. 5th International Triticale Symposium*. Editado por Arseniuk E. International Triticale Association, Radzikow, Poland.
- Ohtani T., Yoshino T., Hagiwara S., Maekawa T. 2000. High-resolution imaging of starch granule structure using atomic force microscopy. *Starch/Stärke*, 52: 150–153.
- Okechukwu P.E. y Rao M.A. 1995. Influence of granule size on viscosity of cornstarch suspension. *Journal Texture Studies*, 26: 501-516.
- Olesen T. 1991. Antistaling process and agent. Patent application WO9104669
- Olesen T., Qi Si J., Donelyan V. 1994. Use of lipase in baking. International Patent Application WO 94/04035.

- Oliete B., Pérez G.T., Gómez Pallarés M., Ribotta P.D., Moiraghi M., León A.E. 2010. Use of wheat, triticale and rye flours in layer cake production. *International Journal Food Science Technology*, 45: 697-706.
- Orth R.A. y Bushuk W. 1972. A comparative study of proteins of wheats of diverse baking quality. *Cereal Chemistry*, 49: 268-275.
- Osborne T.B. 1907. Proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution Washington, 84: 1-119.
- Ottenhof M.A. y Farhat I.A. 2004. The effect of gluten on the retrogradation of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 40: 269-274.
- Papadakis S.E., Abdul-Malek S., Kamdem R.E., Yam K.L. 2000. A versatile and inexpensive technique for measuring colour of foods. *Food Technology* 54: 48– 51.
- Papagianni M. 2006. Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in *aspergillus niger* submerged cultures. *Microbial Cell Factories*, 5: 1-13.
- Pareyt B. y Delcour J.A. 2008. The role of wheat flour constituents, sugar, and fat low moisture cereal based products: A review on sugar snap cookies. *Food Science Nutrition*, 48: 824-839.
- Pareyt B., Talhaoui F., Kerckhofs G., Brijs K., Goesaert H., Wevers M., Delcour J.A. 2008. The role of sugar and fat in sugar-snap cookies: Structural and textural properties. *Journal of Food Engineering*, 90: 400-408.
- Pareyt B., Van Steertegem B., Brijs K., Lagrain B., Delcour J.A. 2010. The impact of redox agents on sugar-snap cookie making. *Journal of Cereal Science*, 52: 192–199.
- Park J.T. y Rollings J.E. 1989. Biopolymeric substrate structural effects of alfa-amylase-catalysed amylase depolymerization. *Enzyme and Microbial Technology*, 11: 334-340.
- Park J.T. y Rollings J.E. 1994. Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerizaion of mixed linear and branched polysaccharides: I. Amylose/amylopectin alpha-amylolysis. *Biotechnology Bioengener.*, 44: 792–800.
- Parker R. y Ring S.G. 2001. Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science*, 34: 1–17.
- Patel M.J., Ng J.H.Y., Hawkins W.E., Pitts K.F., Chakrabarti-Bell S. 2012. Effects of fungal α -amylase on chemically leavened wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science* 56: 644-651.
- Payne P.I. y 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., Nightingale M.A., Krattiger A.F., Holt L.M. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality in British-grown wheat varieties. *Journal of Food Science and Agriculture*, 40: 51–65.
- Peña R.J. y Amaya A. 1992. Milling and breadmaking properties of wheat-triticale grain blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60: 483- 487.

- Peña R.J., y Amaya A. 1980. Triticale: Un nuevo cereal en desarrollo. *Panagfa*, 8: 45-50. Mexico.
- Perea-Flores M.J., Mendoza-Madrigal A.G., Chanona-Pérez J.J., Alamilla-Beltrán L., Gutiérrez-López G.F. 2012. Microscopy techniques and image analysis for the quantitative evaluation of food microstructure. Vol II. En: *Food processing handbook*. 2nd Edition. Editado por Brennan J.G. y Grandison. Wiley-VCH Verlag and Co. Germany.
- Pérez G.T., León A.E., Ribotta P.D., Aguirre A.V., Rubiolo O.J., Añón M.C. 2003. Use of triticale flours in cracker-making. *European Food Research and Technology*, 217: 134–137.
- Pérez S., Baldwin P.M., Gallant D.J. 2009. Capítulo 5: Structural features of starch granules I. En: *Starch: chemistry and technology*, 3rd Edition. Editado por BeMiller J.N. y Whistler R.L. Academic Press, Elsevier Inc., New York, USA.
- Pérez-Nieto A., Chanona-Pérez J.J., Farrera-Rebollo R.R., Gutiérrez-López G.F., Alamilla-Beltrán L., Calderón-Domínguez G. 2010. Image analysis of structural changes in dough during baking. *LWT - FoodScience and Technology*, 43: 535–543.
- Perry P.A. y Donald A.M. 2000. The effects of low temperatures on starch granule structure. *Polymer*, 41: 6361-6373.
- Perry P.A. y Donald A.M. 2002. The effects of sugar of the gelatinization of starch. *Carbohydrate polymer*, 49: 155-165.
- Perten H., Bondesson K., Mjorndal A. 1992. Gluten index variation in commercial Swedish wheat sample. *Cereal Foods World*, 37: 655-660.
- Peterson C.J., Johnson V.A., Mattern P.J. 1986. Influence of cultivar and environment on mineral and protein concentration of wheat flour, bran and grain. *Cereal Chemistry*, 63: 183-186
- Pogna N., Redaelli R., Dachkevitch A., Dal Belin Peruffo A. 1994. Capítulo: Genetics of wheat quality and its improvement by conventional and biotechnological breeding. En: *Wheat production, properties and quality*. Editado por Bushuk W, Rasper V. Chapman Hall. USA.
- Pomeranz Y. 1988. Capítulo: Composition and functionality of wheat flour components. En: *Wheat. chemistry and technology*, Vol II. 3rd Edition. Editado por Pomeranz Y. Published by American Association of Cereal Chemists Inc. St Paul Minnesota, USA.
- Poutanen K. 1997. Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 300–306.
- Prabhasankar P., Sudha M.L., Haridas Rao P. 2000. Quality characteristics of wheat flour milled streams. *Food Research International*, 33: 381-386.
- Prentice R.D.M., Stark J.R., Gidley M.J. 1992. Granule residues and “ghosts” remaining after heating A-type barley starch granules in water. *Carbohydrate Research*, 227: 121-130.
- Pylar E.J. 1988. Capítulo 6: Fundamental bakery dough processes. En: *Baking science and technology*, Vol. II: Formulation and Production. 3rd Edition. Sosland Publishing Company, Merriam, USA.

- Quevedo R., Jaramillo M., Díaz O., Pedreschi F., Aguilera J.M. 2010. Quantification of enzymatic browning in apple slices applying the fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*, 95: 285–290.
- Quevedo R., Lopez C.G., Aguilera J.M., Cadoche L. 2002. Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering*, 53: 361–371.
- Quevedo R., Mendoza F., Aguilera J., Chanona J., Gutierrez G. 2008. Determination of senescent spotting in banana (*Musa cavendish*) using fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*, 84: 509–515.
- Ramírez A.M., Pérez G.T., Ribotta P.D., León A.E. 2003. The occurrence of fibrillin in triticale and their relationship with grain hardness and baking quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7176-7181.
- Rao B.N., Pozniak C.J., Hucl P.J., Briggs C. 2010. Baking quality of emmer-derived durum wheat breeding lines. *Journal of Cereal Science*, 51: 299–304.
- Rao M.A. 1999. Capítulo 2a: Flow and functional models for rheological properties of fluid foods. En: *Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Rao M.A. 1999. Capítulo 4b: Rheology of food gum and starch dispersions. En: *Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Ratnayake W.S. y Jackson D.S. 2007. A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers* 67: 511-529.
- Rehman S., Paterson A., Piggott J.R. 2007. Chapatti quality from British wheat cultivar flours. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 775–784.
- Ribotta P.D., Colombo A., León A.E., Añón M.C. 2007. Effects of soy protein on physical and rheological properties of wheat starch. *Starch/Stärke* 59: 614-623.
- Ribotta P.D., Cuffini S., León A.E., Añón M.C. 2004. The staling of bread. An X-ray diffraction study. *European Food Research and Technology*, 218: 219-233.
- Ribotta P.D., León A.E., Aguirre A., Beltramo D. 2002 Medición instrumental del color en galletitas dulces de triticale: Influencia del contenido de cenizas. *Información Tecnológica (ISSN 0716-8756)*, 13: 171-174.
- Ribotta P.D., León A.E., Añón M.C. 2003. Effect of yeast freezing in frozen dough. *Cereal Chemistry*, 80: 454-458.
- Ribotta P.D., Pérez G.T., Añón M.C., León A.E. 2010. Optimization of additive combination for improved soy-wheat bread quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3: 395–405.
- Ridout M.J., Gunning A.O., Wilson R.H., Parker M.L., Morris, V.J. 2002. Using AFM to image the internal structure of starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 50: 123–132.

- Ridout M.J., Parker M.L., Hedley C.L., Bogracheva T.Y., Morris V.J. 2006. Atomic force microscopy of pea starch: Granule architecture of the rug3-a, rug4-b, rug5-a and lam-c mutants. *Carbohydrate Polymers*, 65: 64-74.
- Ridout M.J., Parker M.L., Hedley C.L., Bogracheva T.Y., Morris V.J. 2003. Atomic force microscopy of pea starch granules: Granule architecture of wild-type parent, r and rb single mutants, and the rrb double mutant. *Carbohydrate Research*, 338: 2135–2147.
- Ridout M.J., Parker M.L., Hedley C.L., Bogracheva T.Y., Morris V.J. 2004. Atomic force microscopy of pea starch: Origins of image contrast. *Biomacromolecules*, 5: 1519–1527.
- Ring S.G., Colona P., l'Anson K.J., Kalichevsky M.T., Miles M.J., Morris J., Orford P.D. 1987. The gelation and crystallization of amylopectin. *Carbohydrate research*, 162: 277-293.
- Robyt J.F. y French D. 1967. Multiple attack hypothesis of alpha-amylase action: Action of porcine pancreatic, human salivary and *Aspergillus oryzae* alpha amylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122: 8–16
- Roccia P., Moiraghi M., Ribotta P.D., Pérez G.T., Rubiolo O.J., León A.E. 2006. Use of solvent retention capacity profile to predict the quality of triticale flours. *Cereal Chemistry*, 83: 243-249.
- Roccia P., Ribotta P.D., Ferrero C., Pérez G.T., León A.E. 2012. Enzymes action on wheat-soy dough properties and bread quality. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*, 5: 1255-1264.
- Rogers D. y Hosenev R. 1989. A fractionation and reconstitution method for saltine cracker flours. *Cereal Chemistry*, 66: 3–6.
- Rojas J.A., Rosell C.M, Benedito de Barber C. 1999. Pasting properties of different wheat flour-hydrocolloid systems. *Food Hydrocolloids*, 13: 27-33.
- Rojas J.A., Rosell C.M., Benedito de Barber C. 2001. Role of maltodextrin in the staling of starch gels. *European Food Research and Technology*, 212: 364-368.
- Roos Y.H. 1995a. Capítulo 3a: Phase and state transitions in food. En: *Phase transitions in foods*. Academic Press, San Diego, CA.
- Roos, Y. H. 1995b. Capítulo 4b: Phase transitions and food structure. En: *Phase transitions in foods*, Academic Press Inc., California, USA.
- Rosell C.M., Haros M., Escriva C., Benedito de Barber C. 2001. Experimental approach to optimize the use of r-amylases in breadmaking. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49: 2973-2977.
- Ross A.S., Walker C.E., Booth R.I., Orth R.A., Wrigley C.W. 1987. The Rapid ViscoAnalyzer: A new technique for the estimation of sprout damage. *Cereal Foods World*, 32: 827-829.
- Roulet P., Macinnes W.M., Gumy D., Wursch P. 1990. Retrogradation kinetics of eight starches. *Starch/Stärke*; 42: 99-101.

- Rubiolo O.J., Ferretti S.A., Ribotta P.D., Aguirre A.V., León A.E. 1998. Incidencia del contenido proteico de las harinas de triticale sobre su aptitud para elaborar galletitas. *Informacion tecnológica*, 9: 87-91.
- Rudin A. 1999. Capítulo: Polymer mixtures. En: *The elements of polymer science and engineering*, 2nd ed., Academic Press: New York.
- Russell P. L. 1987a. Gelatinization of starches of different amylose/amylopectine content. A study by differential scanning calorimetry. *Journal of Cereal Science*, 6: 133–145.
- Russell P.L. 1983a. A kinetic study of bread staling by differential scanning calorimetry and compressibility measurements. The effect of different grists, *Journal of Cereal Science*, 1: 285-296.
- Russell P.L. 1983b. 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.
- Russell P.L. 1983c. A kinetic study of bread staling by differential scanning calorimetry. The effect of painting loaves with ethanol. *Starch/Stärke*, 35: 277-281.
- Russell P.L. 1987b. The ageing of gels from starches of different amylose/ amylopectin content studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Cereal Science*, 6: 147-158.
- Russell P.L. y Oliver G. 1989. The effect of pH and NaCl content on starch gel ageing. A study by differential scanning calorimetry and rheology. *Journal of Cereal Science*, 10: 123-138.
- Sahlstrøm S. y Brathen E. 1997. Effects of enzyme preparations for baking, mixing time and resting time on bread quality and bread staling. *Food Chemistry*, 58: 75–80.
- Sahlstrøm S., Bævre A.B., Brathen E. 2003. Impact of starch properties on hearth bread characteristics. I. Starch in wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 37: 275-284.
- Sandstedt R. 1961. The function of starch in the baking of bread. *Baker's Dig*, 35: 36-41.
- Santa cruz-Vázquez V., Santa cruz-Vázquez C., Chanona-Perez J., Alamilla-Beltrán L., Welti-Chanes J., Gutierrez-Lopez G. 2007. Fractal geometry and natural sciences applications, encyclopedia of agricultural. *Food and Biological Engineering*, 1: 1-3.
- Sarko A. y Wu H.C.H. 1978. The crystal structures of A-, B-, and C-polymorphs of amylose and starch. *Starch/Stärke*, 30: 73-78.
- Sciarini L.S., Ribotta P.D., León A.E., Pérez G.T. 2012. Incorporation of several additives into gluten free breads: Effect on dough properties and bread quality. *Journal of Food Engineering*, 111: 590–597.
- Searle S.R. 1971. *Linear Models*. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
- Searle, S.R. 1987. *Linear Models for Unbalanced Data*. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.

- Seymour R.B. y Carraher C.E. 1995. Capítulo 14: Plastificantes, estabilizadores, retardadores de llama y otros aditivos. En: *Introducción a la química de los polímeros*. Editado por Reverté SA Barcelona, España.
- Shahidi F., Farrell P.G., Edward J.T. 1976. Partial molar volumes of organic compounds in water. III. Carbohydrates. *Journal of Solution Chemistry*, 5: 807–816.
- Shannon J.C., Garwood D.L., Boyer C.D. 2009. Capítulo 3: Genetics and physiology of starch development. En: *Starch: chemistry and technology*, 3rd Edition. Editado por BeMiller J.N. y Whistler R.L. Academic Press, Elsevier Inc., New York, USA.
- Sharples A. 1966. Capítulo: Overall kinetics of crystallization. En: *Introduction to polymer crystallization*. 1st Edition. Editado por Sharples A. St. Martin's Press. Edward Arnold Ltd. London, England.
- Shewry P.R. y Tatham A.S. 1990. The prolamin storage of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemical Journal*, 267: 1-12.
- Shewry P.R. y Tatham A.S. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, 25: 207–227.
- Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 15: 105–120.
- Shewry P.R., Popineau Y., Lafiandra D., Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat Project. *Trend in Food Science and Technology*, 11: 433-441.
- 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 Cereal Science*, 4: 97–106.
- Shibanuma K., Takeda Y., Hizukuri S., Shibata S. 1994. Molecular structures of some wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, 25: 111-116.
- Shogren R.L. 1992. Effect of moisture content on the melting and subsequent physical aging of cornstarch. *Carbohydrate Polymers*, 19: 83-90.
- Si J.Q. 1997. Synergistic effect of enzymes for breadbaking. *Cereal Foods World*, 42: 802–807
- Sievert D. y Wursch P. 1993. Thermal behavior of potato amylase and enzyme-resistant starch from maize. *Cereal Chemistry*, 70: 333-338.
- Singh N., Singh J., Kaur L., Singh Sodhi N., Singh Gill B. 2003. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry* 81: 219–231.
- Sivaramakrishnan H.P., Senge B., Chattopadhyay P.K. 2004. Rheological properties of rice dough for making rice bread. *Journal of Food Engineering*. 62: 37–45.
- Skovmand B.P., Fox P.N., Villarreal L.R. 1984. Triticale in commercial agriculture: Progress and promise. *Advances in Agronomy*, 37: 1-45.

- Slade L. y Levine H. 1991. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *CRC Critical reviews in food science and nutrition*, 30: 115-360.
- Slade L. y Levine H. 1994. Capítulo 2: Structure-function relationships of cookie and cracker ingredients. En: *The Science of cookie and cracker production*. Editado por Faridi H. Chapman and Hall/AVI. New York, USA.
- Slaughter D.C., Norris K.H., Hruschka W.R. 1992. Quality and classification of hard red wheat. *Cereal Chemistry*, 69: 428–432.
- Sluimer P. 2005a. Capítulo 2: Basic ingredients. En: *Principles of breadmaking: functionality of raw materials and process steps*. Published by American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota, USA.
- Sluimer P. 2005b. Capítulo 4: Mixing. En: *Principles of breadmaking: functionality of raw materials and process steps*. Published by American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota, USA.
- Sluimer P. 2005c. Capítulo 5: Fermentation and proof. En: *Principles of breadmaking: functionality of raw materials and process steps*. Published by American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota, USA.
- Sopadea P.A., Halley P.J., Junming L.L. 2004. Gelatinisation of starch in mixtures of sugars. II. Application of differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 58: 311–321.
- Sozer N. y Dalgic C.A. 2006. Modelling of rheological characteristics of various spaghetti types. *European Food Research and Technology*, 225: 183-190
- Spies R.D. y Hosenev R.C. 1982. Effect of sugars on starch gelatinization. *Cereal Chemistry*, 59: 128–131.
- Stark J.R. y Lynn A. 1992. Biochemistry of plant polysaccharides: starch granules, large and small. *Biochemical Society Transactions*, 20: 7-12.
- Stark J.R., Aisien A.O., Palmer G.H. 1983. Studies on starches from Nigerian sorghum. *Starch/Staerke*, 35: 73-76.
- Steffe J.F. 1996a. Capítulo 1: Introduction to rheology. En: *Rheological methods in food process engineering*. 2th Edition. Freeman Press., Michigan, USA.
- Steffe J.F. 1996b. Capítulo 5: Viscoelasticity. En: *Rheological methods in food process engineering*. 2th Edition. Freeman Press., Michigan, USA.
- Steffolani M.E., Ribotta P.D., Pérez G.T., Puppo M.C., León A.E. 2012a. Use of enzymes to minimize dough freezing damage. *Food Bioprocess Technology*, 5: 2242–2255.
- Steffolani M.E., Ribotta P.D., Pérez G.T., León A.E. 2012b. Combinations of glucose oxidase, α -amylase and xylanase affect dough properties and bread quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 525–534.

- Stevens D.J. 1987. Water absorption of flour. En: *Cereals in a European Context*, First European Conference on Food Science and Technology. Editado por Morton I.D. VCH, New York, USA.
- Stevens D.J. y Elton G.A.H. 1971. Thermal properties of the starch/water system. I. Measurement of heat of gelatinization by DSC. *Starch/Stärke*, 23: 8 – 11.
- Stevenson S.G., Fok P.Y., Edwards N.M. 2010. Evaluating sugar-snap cookie quality using digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 87: 137–140.
- Surowka K. 2002. Texture of food and methods of its investigation. *Przemysł Spożywczy*, 10: 12-17.
- Szymoska J., Krok F., Komorowska-Czepirska E., Rebilas K. 2003. Modification of granular potato starch by multiple deep-freezing and thawing. *Carbohydrate Polymers*, 52: 1-10.
- Takahashi S. y Seib P.A. 1988. Paste and gel properties of prime corn and wheat starches with and without native lipids. *Cereal Chemistry*, 65: 474-483.
- Takeda C., Takeda Y., Hizukuri S. 1989. Structure of amylo maize amylose. *Cereal Chemistry*, 66: 22-25.
- Tara K.A. y Bains G.S. 1976. A note on the relation of sample size to Hagberg falling number values. *Cereal Chemistry*, 53: 28-32.
- Tara K.A., Finney P.L., Bains G.S. 1972. Damaged starch and protein content in relation with water absorption of flour of Indian wheats. *Starch/Stärke*, 24: 342-
- Tatham A.S. 1995. Capítulo: The structures of wheat protein. En: *Wheat Structure. Biochemistry and functionality*. Editado por Schofield, Journal Royal society of Chemistry, England.
- Tatham A.S. y Shewry P.R. 1985. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of a-, b-, g and o-gliadins. *Journal of Cereal Science*, 3: 104–113.
- Tatham A.S., Field J.M., Smith S.J., Shewry P.R. 1987. The conformations of wheat gluten proteins. II. Aggregated gliadins and low molecular subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 5: 203-214.
- Tester R.F. 1997. Properties of damaged starch granules: composition and swelling properties of maize, rice, pea and potato starch fractions in water at various temperatures. *Food Hydrocolloids*, 11: 293-301.
- Tester R.F. y Debon S.J.J. 2000. Annealing of starch-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27: 1-12.
- Tester R.F. y Morrison W.R. 1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. *Cereal Chemistry*, 67: 558–563.
- Tester R.F. y Morrison W.R. 1994. Properties of damaged starch granules. V. Composition and swelling of fractions of wheat starch in water at various temperatures. *Journal of Cereal Science*, 20: 175-181.

- Tester R.F. y Sommerville M.D. 2003. The effects of non-starch polysaccharides on the extent of gelatinization, swelling and α -amylase hydrolysis of maize and wheat starches. *Food hydrocolloids*, 17: 41-54.
- Tester R.F., Morrison W.R., Gidley M.J., Kirkland M., Karkalas J. 1994. Properties of damaged starch granules. III. Microscopy and particle size analysis of undamaged granules remnants. *Journal of Cereal Science*, 20: 59-67.
- Tester R.F., Patel T., Harding S. 2006. Damaged starch characterization by ultracentrifugation. *Carbohydrate Research*, 341: 130-137
- Thompson D.B. 2000. On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydrate Polymers*, 43: 223-239.
- Tipples K.H. 1969. The relation of damaged starch to the baking performance of flour. *Bakers' Digest*, 43: 28-34.
- Tipples K.H., Meredith J.O., Holas J. 1978. Factors affecting farinograph and baking absorption. II. Relative influence of flour components. *Cereal chemistry*, 55: 652-660.
- Tohver M., Kann A., Taht R., Mihhalevski A., Hakman J. 2005. Quality of triticale cultivars suitable for growing and bread-making in northern conditions. *Food Chemistry*, 89: 125-132.
- Torri C.L., Ribotta P.D., Morcillo M.H., Rubiolo O.J., Pérez G.T., León A.E. 2003. Determinación del contenido de almidón dañado en harinas de triticale. Su influencia sobre la calidad galletitera. *Agrisciencia*, 20: 3-8.
- Toufeili I., Dagher S., Shadarevian S., Nouredine A., Sarakbi M., Farran M.T. 1994. Formulation of gluten-free pocket type flat breads: Optimisation of methylcellulose, gum arabic, and egg albumen levels by RSM. *Cereal Chemistry*, 71: 594-601.
- Tsen C. 1974. Capítulo: Bakery products from triticale flour. En: *Triticale first man-made cereal*. Editado por Tsen C.C. Published by American Association of Cereal Chemists Inc. St Paul Minnesota, USA.
- van der Maarel J.E.C., van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology* 94: 137-155.
- Van Eijk J.H. 1991. Retarding the firming of bread crumb during storage. Patent application US5023094.
- van Oort M., van Straaten F., Laane C. 1995. Pentosans and pentosanases in bread-making. *International Food Ingredients*, 2: 23-27.
- van Soest J.J.G., de Witt D., Tournois H., Vliegthart J.F.G. 1994. The influence of glycerol on structural changes in waxy maize starch as studied by Fourier transform infra-red spectroscopy. *Polymer*, 35: 4722-4727.

- Varriano-Marston E., Ke V., Huang G., Ponte J. G. 1980. Comparison of methods to determine starch gelatinisation in bakery foods. *Cereal Chemistry*, 57: 242–248.
- Veraverbeke W.S. y Delcour J.A. 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42: 179–208.
- Vermeylen R., Goderis B., Reynaers H., Delcour J.A. 2005. Gelatinisation related structural aspects of small and large wheat starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 62: 170–181.
- Vernière C.I. y Feillet P. 1999. Effects of mixing conditions on pasta dough development and biochemical changes. *Cereal Chemistry*, 76: 558-565.
- Vidal F.D. y Gerrity A.B. 1979. Antistaling agent for bakery products. Patent application US4160848.
- Voisey P.W., Paton D., Timbers D.E. 1977. The Ottawa Starch Viscometer-A New Instrument for Research and Quality Control Applications. *Cereal Chemistry*, 54: 534-557.
- Wade P. 1988. Capítulo: Wheat and wheat flour. En: *Biscuits, cookies and crackers, Vol I: The principles of the craft*. Editado por Wade P. Elsevier Applied Science. London, England.
- Waigh T.A., Gidley M.J., Komanshek B.U., Donald A.M. 2000. The phase transformations in starch during gelatinisation: a liquid crystalline approach. *Carbohydrate Research*, 328: 165–176.
- Walker S., Seetharaman K., Goldstein A. 2012. Characterizing physicochemical changes of cookies baked in a commercial oven. *Food Research International* 48: 249–256.
- Wang C. y Kovacs M.I.P. 2001. Swelling index of glutenin test. I. Method and comparison with sedimentation, gel-protein, and insoluble glutenin tests. *Cereal Chemistry*, 79: 183-189.
- Wang C. y Kovacs M.I.P. 2002. Swelling index of glutenin test. II. Application in prediction of dough properties and end-use quality. *Cereal Chemistry* 79: 190–196.
- Wang F.C. y Sun X.S. 2002. Creep-recovery of wheat flour doughs and relationship to other physical dough tests and breadmaking performance. *Cereal Chemistry*, 79: 567–571.
- Wang W., Oudgenoeg G., van Vliet T., Hamer R.J. 2003. Interaction of water unextractable solids with gluten protein: Effect on dough properties and gluten quality. *Journal of Cereal Science*, 38: 95-104.
- Wang Y.J. y Jane J. 1994. Correlation between glass transition temperature and starch retrogradation in the presence of sugars and maltodextrins. *Cereal Chemistry*, 71: 527–531.
- Webb C. y Owens G.W. 2003. Parte I: Wheat and flour quality: Capítulo 10: Milling and flour quality. En: *Bread making: Improving quality*. Editado por Cauvain S.P. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. Cambridge, England
- Weegels P.L, van der Pijpekamp A.M., Graveland A., Harmer R.J., Schofield J.D. 1996. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Journal of Cereal Science*, 23: 103-111.

- Weegels P.L., Hamer R.J., Schofield J.D. 1997b. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. II. Changes in composition. *Journal of Cereal Science*, 25: 155-163.
- Weegels P.L., Hamer R.J., Schofield J.D. 1997a. Functional properties of low Mr wheat proteins. III. Effects on composition of the glutenin macropolymer during dough mixing and resting. *Journal of Cereal Science*, 25: 165-173.
- Wehmann F., Geiger H.H., Loock A. 1991. Quantitative-genetic basis of sprouting resistance in rye. *Plant Breeding*, 106: 196-203.
- Weltman R.N. 1943. Breakdown of thixotropic structure as a function of time. *Journal of Applied Physics*, 14: 343-350.
- Wen-Shiung Ch., Shang-Yuan Y., Chih-Ming H. 2003. Two algorithms to estimate fractal dimension of gray-level images. *Optical Engineering*, 42: 2452-2464.
- Whittam M.A., Noel T.R., Ring S.G. 1990. Melting behaviour of A- and B-type crystalline starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12: 359-362.
- Wieser H. 2003. Parte II: Dough and bread quality: Capítulo 20: The use of redox agents. En: *Bread making: Improving quality*. Editado por Cauvain S.P. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. Cambridge, England
- Wieser H. 2006. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24: 115-119.
- Wieser H., Hsam S.L.K., Zeller F.J. 2003. Relationship between the qualitative and quantitative compositions of gluten protein types and technological properties of synthetic hexaploid wheat derived from *Triticum durum* and *Aegilops tauschii*. *Cereal Chemistry*, 80: 247-251.
- Wong R.B.K. y Lelievre J. 1982. Rheological characteristics of wheat starch pastes measured under steady shear conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 27: 1433-1440.
- Wrigley C., Andrews J., Bekes F., Gras P., Gupta R., MacRitchie F., Skerritt J. 1998. Protein-protein interactions-essential to dough rheology. En: *Interactions: The keys to cereal quality*. Editado por Hamer R. y Hosenev R. American Association of Cereal Chemists, USA.
- Wursch P. y Gumy D. 1994. Inhibition of amylopectin retrogradation by partial beta amylolysis. *Carbohydrate Research*, 256: 129-137.
- Xiao Z.S., Park S.H., Chung O.K., Caley M.S., Seib P.A. 2006. Solvent retention capacity values in relation to hard winter wheat and flour properties and straight-dough breadmaking quality. *Cereal Chemistry*, 83: 465-471
- Xie F., Yu L., Chen L., Li L. 2008. A new study of starch gelatinization under shear stress using dynamic mechanical analysis. *Carbohydrate Polymers*, 72: 229-234.
- 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.

- Yamazaki W. 1953. An alkaline water retention capacity test for the evaluation of cookie baking potentialities of soft winter wheat flours. *Cereal Chemistry*, 30: 242-246.
- Yamazaki W. y Lord D. 1988. Capítulo: Soft wheat products. En: *Wheat: chemistry and technology*, Vol. II. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota, USA.
- Yamin F.F., Lee M., Pollak L.M., White P.J. 1999. Thermal properties of starch in corn variants isolated after chemical mutagenesis of in bred line B73. *Cereal Chemistry*, 76: 175–181.
- Yaoqi T., Yin L., Frank M., Xueming X. 2009. Influence of β -cyclodextrin on the short-term retrogradation of rice starch. *Journal of Food Chemistry*, 116: 54–58.
- Ylimaki G., Hawrysh Z.J., Hardin R.T., Thomson A.B.R. 1988. Application of response surface methodology to the development of rice flour yeast breads: Objective measurements. *Journal of Food Science*, 53: 1800-1805.
- Zelezna K.J. y Hosney R.C. 1986. The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chemistry*, 63: 407-411.
- Zhang W. y Jackson D.S. 1992. Retrogradation behavior of wheat starch gels with differing molecular profiles. *Journal of Food Science*, 57: 1428–1432.
- Zheng H., Morgenstern M.P., Campanella O.H., Larsen N.G. 2000. Rheological properties of dough during mechanical dough development. *Journal of Cereal Science*, 32: 293–306.
- Zhou X., Baik B.K., Wang R., Lim S.T. 2010. Retrogradation of waxy and normal corn starch gels by temperature cycling. *Journal of Cereal Science*, 51: 57–65.
- Zhou Z., Wang R., Yoo S.H., Lim S.T. 2011. Water effect on the interaction between amylose and amylopectin during retrogradation. *Carbohydrate Polymers*, 86: 1671-1674.
- Zobel H. F. y Senti, F.R. 1959. The bread staling problem. X-ray diffraction studies on breads containing a cross-linked starch and a heat-stable amylase. *Cereal Chemistry*, 36: 441–451.
- Zobel H.F. 1988. Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/Stärke* 40: 1-7.
- Zobel H.F. y Kulp K. 1996. Capítulo 1: The staling mechanism. En: *Baked goods freshness: Technology, evaluation, and inhibition of staling*. Editado por Hebeda R.E., y Zobel H.F. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Zobel H.F., Young S.N., Rocca L.A. 1988. Starch gelatinization: An X-ray study. *Cereal Chemistry*, 65: 443–446.
- Zounis S. y Quail K.J. 1997. Predicting test bakery requirements from laboratory mixing tests *Journal of Cereal Science*, 25: 185–196.