Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Formulación y Nutrición

Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Córdoba, Argentina. 2009

Gabriela Pérez y Alberto Edel León
Editores

Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Avances en Formulación y Nutrición. Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Córdoba, Argentina. 2009.
386 p., 24,5x17 cm
ISBN: 978-987-25617-0-3
Ciencia y tecnología de los alimentos

AUTORIDADES PROVINCIALES

Gobernador de la Provincia de Córdoba
Cr. Juan Schiaretti

Ministro de Ciencia y Tecnología
Ing. Tulio Abel Del Bono Verzura

Ministro de Agricultura, Ganadería y Alimentos
Don Carlos Mario Gutiérrez

Ministro de Industria, Comercio y Trabajo
Don Roberto Hugo Avalle

Secretario de Innovación y Vinculación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología
Dr. Carlos Walter Robledo

Secretario de Alimentos, Ministerio de Agricultura - Ganadería y Alimentos
Cr. Jose Luis Rovasio

Secretario de Industria, Ministerio de Industria - Comercio y Trabajo
Ing. Cesar Martinelli

SubSecretaria de Coordinación Técnica y Administrativa - Ministerio de Ciencia y Tecnología
Cra. Nancy Carrizo Aguilera

Directora de Vinculación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología
Dra. Victoria Rosati

Directora de Innovación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología
Dr. Mario Ignacio Buteler

PRESIDENCIA

Coordinador: Dr. Carlos Walter Robledo. Secretario de Innovación y Vinculación Tecnológica, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba (MINCYT Cba).

Cr. Jose Luis Rovasio. Secretario de Alimentos- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos de la Provincia de Córdoba. (MAGyA Cba)

Ing. Cesar Martinelli. Secretario de Industria- Ministerio de Industria, Comercio y Trabajo de la Provincia de Córdoba. (MICyT Cba)

COMITÉ ORGANIZADOR

Coordinadora: Dra. Victoria Rosati. Directora de Vinculación Tecnológica, MINCYT Cba.

Dr. Rafael Borneo. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Dr. Alberto Edel León. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

Bioq. Marcelo Daniel Machado. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Mgter. Natalia Paola Masferrer. MINCYT Cba.

Dra. Mirtha Nassetta. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Bioq. Esp. Nancy Passalacqua. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Lic. Carolina Pedreti. Secretaría de Alimentos, MAGyA Cba.

Dr. Pablo Daniel Ribotta. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

Ing. Manuel San Pedro. UVITEC - Unión Industrial Córdoba, Bolsa de Comercio y Cámara de Comercio Exterior.

Dr. Daniel Wunderlin. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

COMITÉ CIENTIFICO

Coordinador: Dr. Alberto Edel León. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dra. Analía Abraham. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. María Cristina Añón. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. Rafael Borneo. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Dra. Pilar Buera. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Dra. Sofía Chulze. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Dra. Concha Collar. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Miguel De Billerbeck. Gerencia Corporativa de Innovación. ARCOR S.A.I.C.

Dr. Marie De Lamballerie-Anton. Ecole Nationale D´Ingénieurs des techniques des industries agricoles et alimentaires, Francia.

Dra. Cristina Ferrero. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. John W. Finley. Louisana State University, USA.

Dr. Jurian Hoogewerff. University of East Anglia, United Kingdom.

Lic. Susana María Jiménez. Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Dr. Alain Le-BAIL. Ecole Nationale D´Ingénieurs des techniques des industries agricoles et alimentaires, Francia.

Mg. Mariane Lutz Riquelme. Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos Funcionales, Chile.

Dr. Rodolfo Mascheroni. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. Abel Guarda Moraga. Universidad de Santiago de Chile, Chile.

Dra. Mirtha Nassetta. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Mg. Sonia Olivarez Cortéz. Instituto de Nutricion y Tecnologia de los Alimentos, Chile.

Dr. Manuel Gómez Pallares. Universidad de Valladolid, España.

Bioq. Esp. Nancy Passalacqua. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Dra. Ruth Pedroza Islas. Universidad Iberoamericana, México.

Dra. Pilar Peral García. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. Gabriela Pérez. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dr. Pablo Daniel Ribotta. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Marta Rivas. Instituto Malbrán, Argentina.

Dra. Cristina Rosell. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Marcelo Rosmini. Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

Dra. Viviana Salvadori. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. Carmen C. Tadini. Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Dr. Fidel Toldrá. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Daniel Ramón Vidal. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Jorge Ricardo Wagner. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Dr. Daniel Wunderlin. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dr. Lorenzo Zacarías. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

COMITÉ TECNOLOGICO

Coordinador: Dr. Mario Ignacio Buteler. Director de Innovación Tecnológica. MINCYT Cba.

Cr. José Luis Rovasio. Secretaría de Alimentos, MAGyA Cba.
Ing. Cesar Martinelli. Secretaría de Industria, MICyT Cba.
Ing. Luis de La Cuesta. Secretaría de Industria, MICyT Cba.
Lic. Marta Domínguez. Gerencia de Legislación Alimentaria. ARCOR S.A.I.C.
Dr. Gabriel Raya Tonetti. Gerencia Corporativa de Innovación. ARCOR S.A.I.C.
Ing. Ricardo Cravero - Qinnova
Ing. Ivana Cavigliasso - Prodeman S.A.

SECRETARÍA TÉCNICA

Coordinadora: Mgter. Natalia Paola Masferrer. Dirección de Vinculación Tecnológica, MINCYT Cba.

Dipl. Verónica Amato. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Natalia Andretich. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Tec. Gastón Dunayevich. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Marisol Gomez Rojas. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Maribel Gonzalez. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Daniel Moyano. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Tec. Mirta Neira. Gestión de Proyectos. MINCYT Cba.
Tec. Sergio Rubino. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Irene Schubel. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Mariana Victoria. Secretaria de Alimentos, MAGyA Cba.
Tec. Ramón Roque Zapata. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.

SECRETARÍA ADMINISTRATIVA

Coordinadora: Cra. Nancy Carrizo Aguilera. SubSecretaria Técnica y Administrativa, MINCYT Cba.

As. Guillermo Ferreyra. MINCYT Cba.
As. Maria Cecilia Collino. MINCYT Cba.

SUBSECRETARÍA DE INFORMATICA Y TELECOMUNICACIONES

Coordinador: As. Daniel Pastorino

As. Horacio Velasco Vocos

PATROCINANTES

Gobierno de la Provincia de Córdoba

Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica -Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Third World Academy of Sciences

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED

Sealed Air

Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina

APOYO ECONÓMICO PARA ESTA EDICIÓN

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

AUSPICIANTES

Universidad Nacional de Córdoba

Universidad Católica de Córdoba

Universidad Blas Pascal

Universidad Empresarial Siglo 21

Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Córdoba, San Francisco y Villa María

Universidad Nacional de Río Cuarto

Universidad Nacional de Villa María

Instituto Universitario Aeronáutico

Instituto Nacional de Tecnología Industrial

INTI Córdoba

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Consejo del Centro Regional Córdoba

Organización Panamericana de la Salud- Argentina

SENASA Argentina

Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba

Colegio de Nutricionistas de la Provincia de Córdoba

Asociación Argentina de Ingenieros Químicos

ÍNDICE

Prólogo 2
Aguirre A. 3
Antonio C.M. 13
Bambicha R. 20
Barbosa Rodriguez E.C. 28
Barrera G.N. 35
Birocco M.J. 42
Borneo R. 51
Bosisio N.A. 57
Bustos M.C. 66
Cabezas D.M. 73
Casasola-Lozada S.E. 80
Cian R. 88
Colin O.J. 96
Colombo A. 102
Corregidor J. 112
Cueto D. 123
Eroles E. 131
Ferrero C. 139
Flores S.K. 146
Gómez A.V. 153
Graiver N. 159
López O.V. 165
Luggren P.J. 172
Martínez Albino N. 179
Martínez C.S. 186
Martínez K.D. 197
Martinez M.J. 209
Mignino L. 219
Moiraghi M. 227
Ortiz Miranda G.S. 234
Penci M.C. 240

Ponce Cevallos P.A. 254
Ponzio N. 263
Ramoneda X. 272
Ribotta P.D. 283
Richards N.S.P.S. 292
Rivero S. 299
Roccia P. 306
Sciarini L.S. 1 316
Sciarini L.S. 2 323
Scipioni G.P. 331
Sempé M.E. 339
Sosa-Herrera M.G. 349
Steffolani M.E. 355
Tavera Quiroz M.J. 364
Villa G.M. 371
Von Staszewski M. 379

Prólogo

A modo de cierre del IIIer Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, realizado en Córdoba en el mes de abril de 2009, presentamos los trabajos completos aceptados para su publicación en las áreas de Formulación y Desarrollo y Nutrición y Salud.

El éxito de la edición del congreso se expresó en la participación de más 1000 investigadores, empresarios, profesionales, productores, docentes y estudiantes del sector; con la edición de este libro esperamos difundir los mejores trabajos presentados en las áreas mencionadas.

En los trabajos se destaca la preocupación por desarrollar productos novedosos, por descubrir las interacciones que explican el comportamiento de los ingredientes y aditivos, por formular alimentos más saludables, por describir las propiedades funcionales de los componentes y por encontrar ingredientes novedosos aprovechando las condiciones de cada región.

El arduo trabajo de selección, corrección y edición fue posible gracias al esfuerzo desplegado por el Comité Científico del Congreso, tanto para la aprobación de los casi 150 resúmenes presentados en estas áreas, como para la de los 49 artículos presentados en forma completa.

Es nuestra intención que este volumen sea un reflejo de los desafíos que científicos y tecnólogos abordamos en la formulación y el desarrollo de alimentos y en el conocimiento de la estrecha relación entre la alimentación y la salud.

Finalmente, queremos agradecer a los autores por haber atendido prontamente a las sugerencias de correcciones realizadas por los revisores y por su colaboración apuntando a que esta edición fuera de óptima calidad.

Gabriela Pérez y Alberto Edel León

Desarrollo y caracterización de películas a partir de proteínas de triticale

Development and characterization of films from triticale proteins

Aguirre A (1, 2), Borneo R (1, 3), León A (4)

(1) FCEFy N – Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
(2) Becario de la Universidad Nacional de Córdoba
(3) CEPROCOR MCyT Córdoba, Argentina
(4) FCA - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
aaguirre@efn.uncor.edu

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron desarrollar películas biodegradables a partir de proteínas de harina de triticale (x *Triticosecale* Wittmack), caracterizarlas, evaluar sus propiedades de barrera y estudiar el efecto sobre ellas de tratamientos térmicos suaves. Las películas se obtuvieron por "casting" con glicerol como plastificante, se secaron a 40 *ºC* y se acondicionaron (32,78% HR y 25 *ºC*). El tratamiento térmico consistió en iniciar el secado a 60 *ºC* u 80 *ºC* durante 2h, y continuar a 40 *ºC*. Se determinó el contenido de humedad, la solubilidad en agua y en distintas concentraciones de ácido y la permeabilidad al vapor de agua (WVP). Las películas obtenidas fueron flexibles, de pálido color amarillento. Su porcentaje de humedad varió entre 21,94 y 25,02%. La pérdida de peso después de 24 h de inmersión en agua osciló entre 47,27 y 60,42%. El tratamiento térmico de las películas produjo una disminución significativa del contenido de humedad y solubilidad en agua. No hubo diferencias significativas en la solubilidad en HCl cuando la concentración de ácido es 0,1 y 0,5 N, pero sí entre la solubilidad en agua y en HCL 1 N. Se observaron valores de WVP de entre 1,61 y 2,10 $x10^{-10}$ g/msPa. Estos valores son mayores que los informados para polímeros sintéticos típicos de empaque, pero están en el mismo rango que los valores de permeabilidad de películas elaboradas en base a proteínas. WVP correlacionó con porcentaje de humedad y con solubilidad en agua de las películas y disminuyó con el tratamiento térmico. En películas con los mismos tratamientos y acondicionamientos, WVP aumentaba con la temperatura de medición. El tratamiento térmico mejoró WVP y la resistencia a la desintegración en agua. Sin embargo, a temperaturas mayores a 80 °C las películas de proteínas de triticale se vuelven frágiles y quebradizas.

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the filmogenic capacity of triticale (x *Triticosecale* Wittmack) flour proteins. The films were obtained by a casting process using glycerol as plasticizer. Moisture content, total soluble matter in water or acid and water vapor permeability were measured. Also, the effects of heat curing during the drying step on selected properties of triticale films were investigated. TSMs in water were in the range of 47.27-60.42% for water and 44.76-60.30% for 0.1N HCl. Values of 1.06-1.61 x10-10 g/m s Pa of WVP were observed. MC values and solubility in water significantly decreased with increasing the temperature of treatment from 40 to 80 *ºC*. Thermal treated films showed better water barrier properties than films without treatment. WVP values decreased to about 50% above a curing temperature of 80°C. These values were comparable with those found for other biodegradable polymers. Triticale flour proteins showed suitable filmogenic capacity and seem to be a very interesting material for the formulation of edible films.

PALABRAS CLAVE: *triticale, proteínas, películas.*

KEYWORDS: *triticale, proteins, films.*

INTRODUCCIÓN

Las películas biodegradables tienen gran potencial de aplicación en el área alimentaria, ya que son adecuadas para recubrir alimentos prolongando su vida útil, al tiempo que contribuyen a disminuir los

problemas de contaminación ambiental. Por ello permanentemente se buscan nuevos materiales para la obtención de películas que brinden diferentes posibilidades para la conservación de los alimentos. La harina de triticale (x *Triticosecale* Wittmack) es adecuada para la fabricación de productos que se preparan con gluten de baja tenacidad, como galletitas dulces (León *et al.* 1996 y Aguirre *et al.* 2002) y "crackers" (Perez *et al.* 2003). A partir de estos resultados el interés se amplía hacia la evaluación de la aptitud de las harinas de triticale para otros usos.
Los objetivos de este trabajo fueron desarrollar películas biodegradables a partir de proteínas de triticale, caracterizarlas, evaluar sus propiedades de barrera y estudiar el efecto sobre ellas de tratamientos térmicos suaves.

MATERIALES Y METODOS

Material

El estudio se llevó a cabo a partir de harina de triticale obtenida de la variedad *Buck* TK 205. La composición de la harina de triticale utilizada en este estudio se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de la harina de triticale.

Humedad%	Proteínas	Cenizas%
(13,26 ± 0,08)	(8,88 ± 0,02)	(0,61 ± 0,02)

Características físico químicas. Composición de la harina

Porcentaje de Humedad. Se determinó mediante el método 40-01 de la AACC (2000) que consiste en desecar en cápsulas de Petri 2,000 ± 0,005 g de cada muestra en una estufa a 135 ± 1 *ºC* durante 2 h El porcentaje de humedad se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{M - Ms}{M} \times 100$$

%H = porcentaje de humedad
M = peso de la muestra
Ms = peso de la muestra seca

Porcentaje de Proteínas (Método 46-10, AACC). El contenido de nitrógeno se valoró utilizando el micro método de Kjeldahl modificado para ácido bórico. Se basa en la destrucción oxidativa de los componentes de la muestra por calentamiento en ácido sulfúrico concentrado. El porcentaje de proteínas se calculó aplicando el factor 5,7 que se utiliza para harinas de trigo.
Cenizas. El contenido de cenizas se determinó por diferencia de pesada antes y después de calentar en mufla a 550 *ºC* hasta pesada constante aproximadamente 3,5 g de harina exactamente medidos. Los resultados se expresaron según el siguiente cálculo:

% Cenizas = peso residuo x 100/peso muestra

Preparación de soluciones ricas en proteínas de triticale

Las proteínas de triticale se extrajeron según Hernández-Muñoz *et al.* (2003), con modificaciones. Inicialmente, las albúminas y globulinas se extraen de la harina con una solución de NaCl 5%, con agitación durante 1 hora y centrifugando a 3500 rpm durante 15 min. Se descarta el sobrenadante y del precipitado se hace una extracción con solución de etanol 70% (v/v) agitando durante 1 hora y centrifugando a 3500 rpm durante 15 min a T ambiente, obteniéndose el sobrenadante I (SI). Al precipitado se lo suspende en una solución de etanol 50% (v/v) y se agita durante 1 hora. La parte insoluble conteniendo almidón y agregados de proteínas se elimina por centrifugación a 3500 rpm durante 15 min a T ambiente, obteniéndose un Sobrenadante II (SII). El precipitado remanente se descartó.

Preparación de las películas

Se realizarán dos diferentes clases de *films*, con SI y SII. Las películas se prepararon según la técnica de evaporación del disolvente ("casting"). La solución formadora del *film* se preparó con 7,5% de proteínas (gramos por 100 ml de solución), 33% de glicerol (gramos por 100 gramos de proteína) y

etanol al 70% (v/v) para SI y al 50% (v/v) para SII, agitando por 20 min. Luego se dejó reposar a T ambiente 3 min y las suspensiones se virtieron en moldes siliconados y se secaron durante 24 h a 40 *ºC*.

Tratamiento térmico de las películas

Diferentes soluciones formadoras de *film*s fueron calentados a 60 *ºC* y 80 *ºC* durante 2 h previo a su secado, el cual continuó a 40 *ºC* para la formación de la película. Se evaluó el efecto de este tratamiento térmico sobre los parámetros medidos y se comparó con los resultados de los *films* secados a 40 *ºC*.

Acondicionamiento de las películas

Las películas se acondicionaron previamente a las mediciones durante 72 hs a 32,78% de humedad relativa (HR) con solución saturada de $MgCl_2$ a 25 *ºC*.

Determinación del contenido de agua de las películas (WC)

Películas previamente pesadas (w_1) son secadas a 105 *ºC* por 24 horas y pesadas nuevamente (w_2). El contenido de agua de los *films* fue determinado como porcentaje y se calcula por la diferencia de peso antes y después del secado y se reporta en base al peso inicial (Cao *et al.* 2007).

$$WC\% = 100\ (w_1 - w_2) / w_1$$

Solubilidad en agua

El porcentaje de solubilidad es el porcentaje de materia seca en el *film* solubilizado después de 24 de inmersión en agua. El porcentaje de materia seca inicial en cada *film* fue determinado a 105 °C por 24 h. Se cortan otros discos de *film*, se colocan inmersos en 50 mL de agua destilada por 24 h a T ambiente. Luego se secan (105 °C por 24 h) para determinar el peso de la materia seca que no fue solubilizada en agua. El peso de la materia seca solubilizada fue calculada sustrayendo el peso de la materia seca no solubilizada del peso de la materia seca inicial y se reporta como porcentaje (Fakhouri, *et al.* 2004). El porcentaje de la pérdida de peso (%WL) de cada muestra de *film* fue calculada usando la siguiente ecuación (Hernández-Muñoz *et al.* 2003):

$$\%WL = [(\text{peso seco inicial} - \text{peso seco final})/ \text{peso seco inicial}] \times 100$$

El peso seco inicial se corrige con el porcentaje de agua de los *films*.

Solubilidad en ácido

El mismo procedimiento para solubilidad en agua, excepto que los *films* son sumergidos en una solución de HCl 1 N por 24 h a T ambiente (Fakhouri *et al.* 2004). También se realizó el mismo procedimiento pero sumergiendo los *films* en soluciones de HCl 0,1M, 0,5M y 1M.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Se evaluó según el método ASTM E-96-80 (1990) con algunas modificaciones. Este método indirectamente obtiene la permeabilidad cuantificando el índice de movimiento de vapor de agua a través de la película mediante los cambios de peso debido a la transferencia de humedad. Las muestras se ubicaron y sellaron en celdas de permeación de boca de área conocida, conteniendo sílica gel. Las celdas se pesaron y ubicaron en un ambiente de humedad relativa y temperatura controlada. La diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados del *film* proporciona la fuerza impulsora para el flujo de vapor a través de la película. La ganancia de peso de las celdas se monitorea en función del tiempo. La pendiente de las rectas se calcula por regresión lineal y el índice de transferencia al vapor de agua o coeficiente de transmisión de vapor de agua (WVTR, g m^{-2} s^{-1}) se calcula usando la siguiente ecuación:

$$WVTR = \frac{\Delta m}{A \times \Delta t}$$

donde : Δ **m** = masa de agua ganada, **A** = área expuesta, Δ **t** = tiempo, y la permeabilidad al vapor de agua, WVP (g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1}) se calcula usando la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{WVTR \times X}{\Delta P}$$

donde : ***X*** = espesor del *film* y Δ **P ($p_1 - p_2$)** es la diferencia (Pa) de presión de vapor de agua a través del *film* (Bravin *et al.* 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para preparar las películas, las proteínas se dispersaron primero en etanol con agitación constante y luego se agregó glicerol como plastificante. Se obtuvieron películas (espesor: 0,2±0,03 mm) de apariencia homogénea, suaves, flexibles aunque exhibieron un pálido color amarillento.
El contenido de agua de las películas de proteínas de triticale se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Contenido de agua y solubilidad en agua de las películas de proteínas de triticale con diferentes tratamientos térmicos.

	Temperatura de tratamiento (°C)	SI	SII
Contenido	40	21,94±3,60	25,02±0,20
de humedad	60	15,54±0,71	21,53±1,10
(%)	80	16,65±0,13	15,03±0,90
Total de materia	40	47,27±1,46	60,42±3,10
soluble en	60	42,10±7,50	63,88±1,90
agua (%)	80	34,48±0,96	51,75±1,85

A este nivel de glicerol el valor observado fue similar a otros reportados en la bibliografía para *films* preparados a partir de proteínas de distinto origen (Wei Yin *et al.* 2007, Hernández-Muñoz *et al.* 2004, Rhim *et al.* 2000, Cao *et al.* 2007). Los plastificantes son uno de los aditivos básicos en los polímeros formadores de *films*. Ellos reducen las fuerzas intermoleculares, incrementando la movilidad de las cadenas de biopolímeros. La adición de un agente plastificante es necesaria para superar la fragilidad de las películas, mejorando su flexibilidad e incrementando su fuerza y resistencia. Los grupos polares (-OH) de las cadenas de los plastificantes desarrollan puentes hidrógeno polímero-plastificante que reemplaza las interacciones polímero-polímero en los *films*. Debido a sus características y a su pequeño peso molecular (92 D) el glicerol es muy efectivo y ampliamente usado. El glicerol es una molécula higroscópica que induce un interespaciado en la red del *film* y cuyo punto de ebullición es 290 °C, aunque disminuye en presencia de agua. Niveles de glicerol por encima de 0,3 g/g proteína resultan en películas pegajosas y húmedas (Cao *et al.* 2007) ya que absorben más humedad por la hidrofilicidad del plastificante.
Los *films* tratados con calor tienen menor contenido de agua que las otras películas, aunque hayan sido acondicionadas de la misma manera. Quizá, el entrecruzamiento inducido por el tratamiento térmico aumentó la hidrofobicidad de los *films*, disminuyendo así la captación de agua durante el acondicionamiento.
La resistencia al agua es una propiedad importante de las películas biodegradables para sus aplicaciones en la protección de alimentos cuando la actividad del agua es alta o cuando el *film* debe estar en contacto con el agua durante el procesamiento de alimentos recubiertos para evitar exudación de productos frescos o congelados. Sin embargo, películas con alta solubilidad en agua pueden ser requeridos por ejemplo para contener porciones pre-medidas, las cuales van a ser disueltas en agua o en un alimento caliente (Guilbert *et al.* 1989).

Se midió la solubilidad en agua de los *films* de triticale. Después de 24 hs de inmersión en agua los *films* no lograron mantener totalmente su integridad, cambiando su forma (examen visual). Los resultados de la pérdida de peso después de 24 hs en agua se muestran en la **Tabla 2.** Las películas estudiadas se han hinchado fácilmente cuando se colocaron en agua y esto puede ser debido a la absorción de agua de las proteínas y del glicerol, y facilitó que más masa soluble se escapara del *film*.
Hernández-Muñoz *et al.* (2004) encontraron que *films* de gluteninas de trigo mantenían su integridad después de 24 hs de inmersión en agua, mientras que los de gliadinas se desintegraban.
Los resultados de Tanada-Palmu, *et al.* (2003) muestran que la solubilidad en agua de *films* preparados a partir de trigos "soft" con 25% de glicerol mostraban valores significativamente mayores que aquellos preparados a partir de trigos semiduros y de gluten vital en el siguiente orden: trigos "soft" > trigos semiduros > gluten vital. Considerando que el glicerol es totalmente soluble en agua, las diferencias en solubilidad pueden ser debidas a las diferencias en la intensidad de la asociación polimérica, donde los *films* preparados a partir de trigos "soft" no son capaces de prevenir la pérdida de glicerol de la matriz a la solución acuosa.
Las diferencias en el total de la materia soluble en diferentes películas de proteínas de diferentes orígenes pueden ser atribuidas a diferentes fuerzas interactivas que mantienen la red del *film* (Wei Yin *et al.* 2007).
Tang *et al.* (2005) encontraron que valores bajos de contenido de agua parecen estar acompañados de altos porcentajes de materia soluble en *films* proteicos, sugiriendo que la absorción de agua y el hinchamiento de las películas puede ser importante para el contenido de agua y el total de la material soluble.
Gennadios *et al.*. (1996) reportaron la reducción en la solubilidad en agua de *films* de proteínas de soja por tratamiento térmico. Los resultados de Hernández-Muñoz *et al.* (2004) con gliadinas y gluteninas de trigo mostraron que *films* de gluteninas tratados térmicamente mantuvieron su integridad después de 24 h de inmersión en agua, mientras que los *films* de gliadinas no se desintegraron sólo después de aplicar temperaturas más altas que 70 °C.
Nuestros resultados muestran una disminución en la solubilidad en agua de los *films* cuando la temperatura aumenta de 40 a 80 °C (**Tabla 2**)**.** Esto sería debido a la formación de uniones intermoleculares durante el tratamiento térmico a más de 70 °C que llevaría a obtener una red más compacta e intercruzada en los *films*, tal como fue reportado por Booth *et al.*. (1980) y Schofield *et al.*. (1983) para proteínas del gluten. La formación del entrecruzado inducido por el calor mejora la integridad del *film* en agua también por una menor difusión del glicerol.
La solubilidad en ácido es una importante propiedad de las películas en contacto con alimentos de diferente pH durante su procesamiento y almacenamiento. Fakhouri *et al.* (2004) informaron solubilidad en HCl 1N de 50,69% para películas de celulosa-gluten (1:4) y de 30% para películas de celulosa.

Tabla 3. Materia total soluble en agua y en distintas concentraciones de HCl de las películas de proteínas de triticale.

Muestra	T de tratamiento (°C)	Materia total soluble en agua (%)*	Materia total soluble en HCl 0.1M (%)*	Materia total soluble en HCl 0.5M (%)*	Materia total soluble en HCl 1M (%)*
SI	40	$47,27\pm1,46^{a}$	$47,04\pm1,47^{a}$	$45,13\pm3,64^{a,b}$	$44,76\pm0,84^{c}$
SII	40	$60,42\pm3,10^{d}$	$60,20\pm4,40^{d}$	$59,30\pm5,25^{d}$	$60,30\pm6,60^{d}$

*Media y desviación estandar ($n\geq2$), $^{a-d}$Diferentes letras indicant medias significativamente diferentes ($p<0.05$)

Los resultados de la pérdida de peso después de 24 h de inmersión en ácido se muestran en la **Tabla 3.** A medida que aumenta la concentración de HCl, la solubilidad de las películas de proteínas de triticale disminuye en el caso de aquellas preparadas a partir de SI. No hay diferencias significativas en la solubilidad en HCl cuando la concentración de ácido es 0.1 y 0,5 N, pero si cuando se comparan la solubilidad en agua con la de HCl 1 N. Rhim *et al.* (2000) tampoco encontraron diferencias significativas en la solubilidad de *films* de proteínas de soja en agua y en HCl 0,01N, aunque no estudiaron concentraciones mayores de ácido.

En las películas la permeabilidad es igual al producto del coeficiente de difusión (D) que representa la movilidad de las moléculas del permeante en el polímero, y del coeficiente de solubilidad (S) que representa la concentración del permeante en el *film* en equilibrio con la presión externa:

$$P = D \times S$$

En la mayoría de los *films* comestibles D y S dependen de la diferencia de presión parcial del permeante y son afectados por la temperatura, el tamaño, forma y polaridad de la molécula de permeante que difunde y las características del *film*.
Se asume que la permeabilidad de un *film* es independiente del gradiente de presión de vapor aplicado a través del *film*. Sin embargo, los materiales hidrofílicos (comestibles o no), tales como las películas de proteínas, se desvían de este comportamiento ideal debido a las interacciones de las moléculas permeantes de vapor de agua y los grupos polares de la estructura del *film* (Gennadios *et al.* 1993). Como resultado de esto los valores reportados deben aplicarse a las condiciones experimentales específicas.
Para estudiar la influencia de la humedad relativa ambiente en la permeabilidad al vapor de agua se midieron sus valores a 25 °C (**Figura 1).**

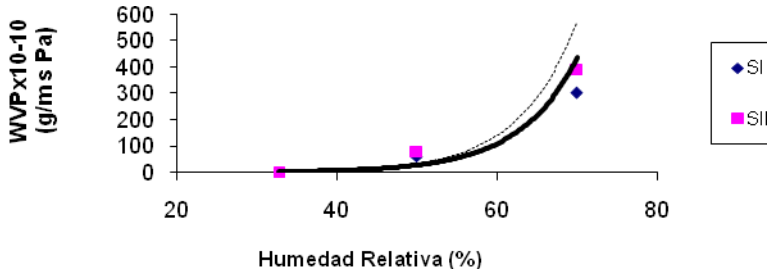


Figura 1. Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) a distintas humedades relativas de películas preparadas con SI y SII a 25 °C.

Lens et al. (2003) mostraron que el contenido de agua de *films* preparados a partir de gluten de trigo aumentaba con un incremento en la humedad relativa durante el almacenamiento a temperatura ambiente.
Las películas de proteínas de triticale mostraron ser muy hidrofílicas: el aumento de la humedad relativa del ambiente las tornó pegajosas y poco maleables y su permeabilidad al vapor de agua aumentaba exponencialmente con la HR. Por eso, y si bien en la bibliografía se reportan valores de WVP altos [por ejemplo, 1.93×10^{-9} g/m s Pa en películas de gluten de trigo (Ali *et al.*.,1997) o 9.14×10^{-8} g/m s Pa en *films* con proteínas de maní (Liu *et al.* 2004)] se decidió mantener sus valores dentro del rango de otros *films* de proteínas y trabajar al 32,78% HR, que además permite obtener películas menos pegajosas y menos frágiles.
Los valores de permeabilidad al vapor de agua para los *films* de proteínas de triticale estudiados a distintas temperatura de tratamiento térmico y de medición se muestran en la **Tabla 4.** Estos valores (0,93-4,22 $\times 10^{-10}$ g/m s Pa) son de 2 a 3 veces órdenes de magnitud mayores que los polímeros sintéticos típicos de empaque pero están en el mismo rango que los valores de permeabilidad de películas comestibles elaboradas en base a proteínas (**Tabla 5)**.
En nuestro estudio se presentó una correlación entre la velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR) y el porcentaje de contenido de agua de los *films* (**Figura 2)**. Las películas con más moléculas de agua penetrando en los volúmenes libres de los *films* también permiten que mayor masa de vapor de agua las atraviese por unidad de área y de tiempo.

Tabla 4. Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) para los *films* de proteínas de triticale

Muestra	T de tratamiento (°C)	T de medición (°C)	Humedad Relativa de medición%	ΔP (Pa)	WVPx10-10 (g/m s Pa)
SI	40	25	32,78	1029,13	1,61 ±0,15
SI	60	25	32,78	1029,13	1,46 ±0,04
SI	80	25	32,78	1029,13	0,93 ±0,08
SI	40	50	30,54	3737,31	2,48 ±0,17
SI	60	50	30,54	3737,31	1,82 ±0,13
SI	80	50	30,54	3737,31	1,06 ±0,07
SII	40	25	32,78	1029,13	2,10 ±0,20
SII	60	25	32,78	1029,13	1,86 ±0,15
SII	80	25	32,78	1029,13	1,09 ± 0,11
SII	40	50	30,54	3737,31	4,22 ±0,07
SII	60	50	30,54	3737,31	2,94±0,21
SII	80	50	30,54	3737,31	2,40 ±0,14

Tabla 5. Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas comestibles y poliméricas.

Film	**WVP (g/m s Pa)**
Cloruro de polivinilideno[a]	0,7-2,4 x 10^{-13}
Polietileno de alta densidad[a,b]	2,4 x 10^{-13}
Polietileno de baja densidad[a,b]	7,3-9,7 x 10^{-13}
Etilen-vinil acetato[a]	2,4-4,9 x 10^{-13}
Poliester[a]	1,2-1,5 x 10^{-12}
Celofán[b]	7,7-8,4 x 10^{-11}
Acetato de celulosa[a]	0,5-1,6 x 10^{-11}
Gliadina de trigo[c]	2,5-7,0 x 10^{-11}
Glutenina de trigo[c]	1,9-19 x 10^{-11}
Almidón de alta amilosa	2,0-10 x 10^{-10}
Proteínas de lentejas[e]	3,09 x 10^{-10}
Proteínas de soja[d]	2,28 x 10^{-10}
Gluten de trigo[a]	1,4-4,6 x 10^{-9}
Aislado de proteína de soja[a]	1,6-4,4 x 10^{-9}

[a]Gennadios *et al.* 1994, [b] Krochta, 1992, [c]Hernández-Muñoz *et al.*2003, [d] Denavi *et al.*,. [e] Bamdad *et al.* 2006

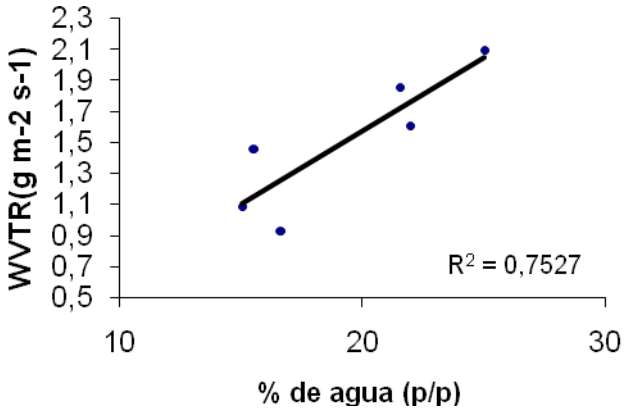


Figura 2. Correlación entre la velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR) y el porcentaje de contenido de agua de los *films*

Cuando se estudió la influencia del tratamiento térmico sobre WVP se observó que en el rango de temperaturas estudiadas los valores de permeabilidad de las películas preparadas con SI y SII decrecen a medida que aumenta la temperatura del tratamiento (**Tabla 4)**

Un comportamiento similar en trigo fue observado por Hernández-Muñoz *et al.* (2003). Gennadios *et al.*. (1996) observaron una disminución por un factor de 2 en WVP de *films* de soja tratados térmicamente a 80 y 95 °C. El tratamiento con calor también disminuyó WVP de *films* preparados a partir de proteínas de maní (Liu *et al.* 2004), sugiriendo que el calentamiento puede alterar la estructura tridimensional de las proteínas.
La permeación al agua es un fenómeno que implica solubilidad y difusión de las moléculas a través de la matriz del *film*. Debido al calentamiento de las películas la movilidad de las cadenas polipeptídicas se vería disminuída, lo que contribuiría a reducir la difusión de las moléculas de agua. El incremento en la temperatura probablemente modifique la densidad de entrecruzamiento entre proteínas y una disminución en la hidrofilicidad de las proteínas (Micard, *et al.* 2000). Los grupos reactivos de los aminoácidos de las proteínas, tales como grupos hidroxilos, carbonilos, sulfidrilos y aminos, son los responsables de las reacciones de entrecruzamiento durante el calentamiento.
El trabajo de Ali *et al.* (1997) con *films* de gluten de trigo mostró que a un determinado tiempo de exposición, la WVP disminuye a medida que aumenta la temperatura, atribuyendo este comportamiento a la formación de uniones covalentes durante el tratamiento térmico y a una disminución de la hidrofilicidad de los *films*.
El tratamiento térmico mejoró las propiedades de barrera al agua de los *films* preparados con proteínas de triticale y además mejoró su resistencia a la desintegración en agua. En el rango de temperaturas estudiadas, los valores de WVP correlacionan con TMS en agua (**Figura 3**).

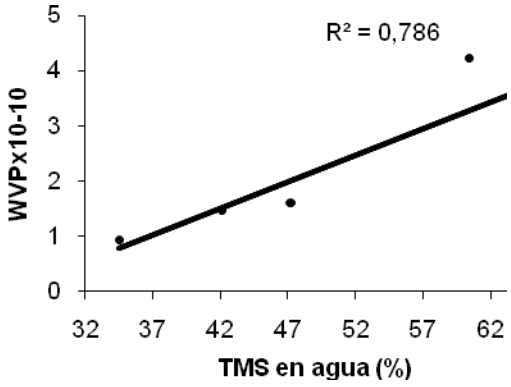


Figura 3. Correlación de WVP con TSM en agua.

Además, las películas a temperaturas mayores de 80 °C se vuelven secas, frágiles y resquebradizas. En ese sentido no es recomendable temperaturas mayores para los tratamientos.

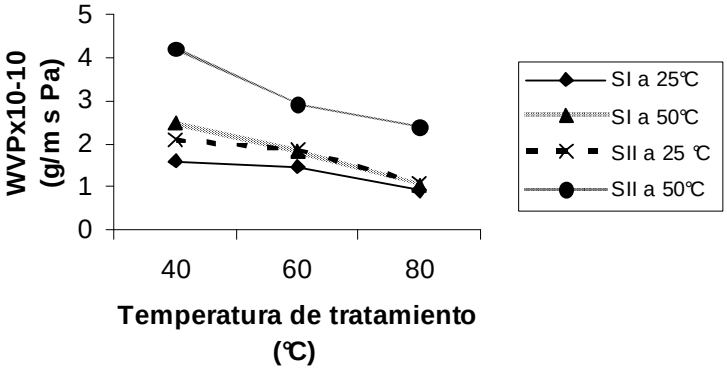


Figura 4. Valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas a distintas temperaturas de medición.

Cuando se midieron los valores de WVP a distintas temperaturas se observó que en *films* con los mismos tratamientos y acondicionamientos, la permeabilidad al vapor de agua aumentaba con la temperatura de las mediciones (**Figura 4)** . Esto estaría relacionado con el incremento en el volumen libre del polímero formador del *film* por aumento de la movilidad molecular y por aumento de la

entropía del sistema con la temperatura. Además la energía cinética promedio de las moléculas de vapor de agua que interaccionan con la matriz proteica es proporcional a la temperatura. De acuerdo con la teoría cinético molecular, cada molécula gaseosa tiene una cierta cantidad de energía. Cuando una molécula alcanza la superficie del *film* necesita espacio para pasar a través de él. Sólo una cierta fracción de las moléculas de vapor de agua que tienen cierta energía pueden pasar. Esta energía de activación es dependiente de la presión en la superficie del *film* y de algunas propiedades intrínsecas de la película (Farajzadeh *et al.* 2008). Cuando se aumenta la temperatura el promedio de energía de las moléculas gaseosas y la frecuencia de las colisiones de las moléculas gaseosas y la superficie del *film* aumenta. Por lo tanto, el número de moléculas de vapor de agua que puede atravesar la película aumenta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC, 10th ed. St. Paul, MN: The Association, Methods 40-01 y 46-10.

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.

Ali Y, Ghorpade M, Hanna M. 1997. Properties of thermally-treated wheat gluten films. Industrial crops and products 6:177-184.

ASTM 1990. Standar test method for water vapour transmisión in materials. Annual book of ASTM standards. Philadelphia, Pennsylvania: American Society for Testing and Materials, E-96-80.

Bamdad F, Hossein A, Kadivar M. 2006. Preparation and characterization of proteinous film from gentil (*Lens culinaris*). Food Research International, 39: 106-111.

Booth MR, Bottomley RC, Ellis JR, Malloch G, Schofields JD, Timms MF. 1980. The effects of heat on gluten-physico-chemical properties and baking quality. Annales de Technologie Agricole, 29: 399-408.

Bravin B, Peressini D, Sensidoni A. 2006. Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. Journal of Food Engineering, 76: 280-290.

Cao N, Fu Y, He J. 2007. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatine composite films. Food hidrocolloids, 21: 1153-1162.

Fakhouri F, Tanada-Palmu P, Grosso, C. 2004. Characterization of composite biofilms of wheat gluten and cellulose acetate phtalate. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 21: 261-264.

Farajzadeh R, Krastev R, Zitha P. 2008. Foam film permability: theory and experiment. Advance in Colloid and Interface Science, 137:27-44.

Gennadios A, Brandenburg A, Weller C, Testin R. 1993. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41: 1835-1839.

Gennadios A, Ghorpade VM, Weller C, Anna MA. 1996. Heat curing of soy protein films. Transactions of the ASAE, 39 : 575-579.

Guilbert S, Biquet B, 1989 Les films et enrobage comestibles. En Bureau G & Multon JL, Editores. L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation. Lavoisier, Apria, Paris France.p.320.

Hernández-Muñoz P, Kanavouras A, Ng P, Gavara R. 2003. Development and characterization of biodegradable films made from wheat gluten protein fractions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 7647-7654.

Hernández-Muñoz P, Villalobos R, Chiralt A. 2004. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. Food Hydrocolloids 18: 647-654.
Krochta JM. 1992. Control of mass transfer in food with edible-coating and films. Sing RP, Wirakartakusumah MA editores. Advances in Food Engineering. CRC Press, Florida. pág. 517-537.

Lens JP, de Graaf LA, Stevels W, Dietz CH, Verhelst KCS, Vereijken JM, Kolster P. 2003. Influence of processing and storage conditions on the mechanical and barrier properties of film cast from aqueous wheat gluten dispersions. Industrial Crops and Products, 17: 119-130.

León A, Rubiolo O, Añón MC. 1996. Use of Triticale flours in cookies. Quality factors. Cereal Chemistry, 73: 779-784.

Liu CC, Tellez-Garay A, Castell-Perez ME. 2004. Physical and mechanical properties of peanut protein films. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 37: 731-738.

Micard V, Belamri R, Morel M, Guilbert S. 2000. Properties of chemical and physically treated wheat gluten films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2948-2953.

Pérez GT, León AE, Ribotta PD, Aguirre AV, Rubiolo OJ, Añón MC. 2003. Use of triticale flours in cracker-making. European Food Research and Technology, 217:134-137.

Rhim J, Gennadios A, Handa A, Weller C, Hanna M. 2000. Solubility, tensile and color properties of modified soy protein isolate films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 4937-4941.

Schofield JD, Bottomley RC, Timms MF, Booth MR.1983. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphydryl-disulphide interchange reactions. Journal of Cereal Science, 1: 241-253.

Tanada-Palmu P, Grosso C. 2003. Development and characterization of edible films based on gluten from semi-hard and soft Brazilian wheat flours. Ciênc. Tecnol. Alimentos, 23: 2

Tang CH, Jiang Y, Wen QB, Yang XQ. 2005. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. Journal of biotechnology, 120: 296-307.

Wei Yin S, Tang C, Wen Q, Yang X. 2007. Properties of cast films from hemp (Cannabis sativa L.) and soy protein isolates. A comparative study. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 7399-7404.

Elaboración de mermelada de chayote con semilla de chía

Chayote marmalade with chia seed

Antonio CM, Beltrán MI, Alonso CAIA, Montalvo PC

Universidad Politécnica de Puebla. Tercer Carril del ejido "Serrano" S/N San Mateo Cuanalá, Municipio Juan C. Bonilla, Puebla, México.
cpaquini@yahoo.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue utilizar al chayote como ingrediente principal para elaborar productos con aceptación entre la población para fomentar el consumo de esta hortaliza. Se realizaron dos formulaciones de mermelada de chayote, una de ellas con semilla de chía (8 gramos de semilla por cada 500 gramos de mermelada); ambas formulaciones contenían además azúcar, jugo de naranja y ácido cítrico. A los productos elaborados se les realizaron análisis sensoriales, fisicoquímicos (A.O.A.C. 1984, NOM-SSA1-1994) y microbiológicos (NOM-092, NOM-111, NOM-113, NOM-114). Sensorialmente ambas formulaciones fueron evaluadas favorablemente por el panel, la característica que obtuvo un mayor puntaje fue el sabor, seguida de consistencia, color y aroma. Las características fisicoquímicas cumplieron con lo que indica las normas mexicanas ya que los productos tenían 62º Brix y pH de 3,8. En la formulación con semilla de chía se observó un mayor contenido de pectina, mientras que los azúcares solubles disminuyeron en comparación con la formulación sin chía. Se obtuvieron productos novedosos elaborados con chayote y semilla de chía, que fueron ampliamente aceptados por los consumidores. También se logró diversificar el consumo de chayote y semilla de chía, cultivos nativos de nuestro país, que además de tener importantes aportes nutrimentales, presentan efectos benéficos para la salud.

ABSTRACT

The objective was to use chayote like principal ingredient to get alternative products. During the development of this work were made two marmalade formulations: using chayote (formulation 1) and chayote with chia seed (formulation 2); both formulations also contain sugar, orange juice and citric acid. In formulation 2 were used 8 grams of chia seed per 500 grams of marmalade. The products obtained were analyzed for sensorial evaluation, physicochemical according to AOAC (1984), (NOM-SSA1-1994) and microbiological (NOM-092, NOM-111, NOM-113, NOM-114). In sensorial analysis both formulations were widely accepted by evaluation panel. The best feature evaluated was taste, followed by texture, color and flavor. In the products the results of analysis of physicochemical and bromatological were within the requirements according to NOM (62 ° Brix and pH of 3,8). Pectin content in formulation with chia seed was higher than in the other formulation but soluble sugars decreased and the fat content increased because chia seed was including. Two products were obtained like alternative to diversify the use of chia seed and chayote, these also have an important contributions in nutritional and health benefits. The options to incorporate chayote and chia seed in the human diet are unlimited.

PALABRAS CLAVE: *mermelada, chayote, chía.*

KEYWORDS: *marmalade, chayote, chia seed.*

INTRODUCCIÓN

El chayote (*Sechium edule* (Jacq.) *Swartz*) es una especie nativa de México, subutilizada, con altos rendimientos y gran potencial, ya que a partir de su procesamiento podrían generarse mayores ingresos familiares que permitan mantener las áreas agrícolas ocupadas por este cultivo. El chayote se encuentra normalmente sembrado en huertos familiares, junto a plantas arbóreas, las cuales son utilizadas como soporte, en estos huertos se cultivan una gran cantidad de especies con diferentes usos en donde el chayote además de ser consumido como hortaliza (fruto, tallos, hojas, flores tiernas y

chayotextle) es un apoyo económico para las familias (Cadena 2000). En México se cultivan 2714 hectáreas con una producción de 100.620 toneladas por año; siendo los estados de mayor producción: Veracruz, Jalisco, Michoacán, Puebla y Guanajuato (Sagarpa 2004). En la comunidad de Santa Catarina Villanueva ubicada en el municipio de Quecholac en Puebla, el manejo del chayote representa una fuente de ingreso al comercializarse en fresco, de esta planta sólo utilizan el fruto lo que representa una mínima parte de la planta. Esta hortaliza es cultivada aproximadamente por el 20% de la comunidad pero puede llegar a representar una oportunidad de ingreso adicional para las familias que principalmente se dedican al cultivo de nopal y tuna. Se estima que una caja de chayote (30 Kg) se comercializa en 50 pesos mexicanos (3,7 dólares), sin embargo cuando este producto no es vendido en su totalidad es desechado en los mercados regionales o se da al ganado como alimento. Actualmente la mayoría de los estudios relacionados con esta hortaliza se han enfocado a los procedimientos de producción y calidad nutrimental ya que se ha propuesto que se puede utilizar para contrarrestar problemas cardiovasculares, renales, gastritis y úlceras (Newstrom, 1989). El chayote se consume comúnmente en forma cruda para ensaladas y hervido o asado, pero también podría ser empleado para elaborar productos con mayor vida de anaquel como la mermelada. Una buena mermelada es un preparado complejo, que requiere de un óptimo balance entre los ingredientes, como edulcorantes que se utilizan para darle el sabor dulce al alimento. Uno de ellos es el azúcar común, que se utiliza como ingrediente esencial por desempeñar un papel vital en la gelificación de mermeladas, es importante señalar que la concentración de azúcar en las mermeladas impide la fermentación y la cristalización. Otro muy importante es la pectina, que se utiliza para la gelificación de las mermeladas, esta también confiere brillo al color de la mermelada, y para mejorar el sabor. También prolongan su tiempo de vida útil a aquellas sustancias que se añaden a los alimentos para prevenir su deterioro, evitando de esta manera el desarrollo de microorganismos, principalmente hongos y levaduras (Aleixandre 1999, Coronado e Hilario 2001). Al tener una forma alternativa de comercialización de esta hortaliza se espera que comunidades aledañas, con condiciones climáticas similares, implementen este cultivo que es considerado muchas veces como una planta herbácea. Además se busca que, con la promoción de este cultivo, se contribuirá a evitar la erosión del suelo de estas comunidades.

Por otro lado la chía (*Salvia hispánica*, L.) es un alimento prehispánico que constituyó la base de la dieta de los aztecas junto con el fríjol, maíz y amaranto y cuyo uso cayó en el olvido, pero recientemente se ha encontrado que es una buena fuente de ácidos grasos, proteína y fibra dietética (Beltrán 2007). En la actualidad, mucha gente utiliza esta milenaria semilla en la preparación de una bebida refrescante y popular llamada "chía fresca", que se consume tanto en México y América Central como en California y Arizona (Beltrán y Romero 2007). La semilla de la chía tiene un alto contenido proteínico por lo que se utiliza principalmente como alimento para el ganado. Por otro lado el consumo de fibra dietaría de la semilla resulta ser una alternativa valiosa que mejora la formación del bolo fecal y la correcta evacuación de las heces, lo cual ayuda a prevenir la obesidad, el cáncer de colon, así como, los altos niveles de colesterol y glucosa en sangre. Además estas semillas representan una fuente abundante de calcio y de boro, este último actúa como un catalizador para la absorción y utilización del calcio. Por otro lado los extractos de agua y metanol de la semilla de chía una vez que se ha prensado y extraído el aceite, este tiene una fuerte actividad antioxidante (Bushway 1981). En México encontramos en el estado de Puebla a dos municipios productores de semilla de Chía estos municipios son Atzizihuacán y Tochimilco con una superficie sembrada de 29 hectáreas y una producción de 14,5 toneladas por año (SDR 2005).

Con el desarrollo de este proyecto se busca darle un valor agregado al chayote además de reactivar el uso de la semilla de chía y con ello contribuir a la economía de comunidades como Santa Catarina Villanueva, donde el 80% de la población se dedica a la agricultura.

El objetivo de este trabajo fue obtener una mermelada de chayote y chía que cumpla con los parámetros de las normas oficiales mexicanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizó chayote espinoso que provenía de Santa Catarina Villanueva y semilla de chía de San Mateo Coatepec, ambas comunidades del estado de Puebla.

Elaboración de mermelada

El proceso de elaboración de la mermelada se realizó considerando las siguientes etapas:

Selección, se utilizaron piezas de chayote de tamaño pequeño (250 g / pieza). *Lavado*, se lavó en una solución de hipoclorito de sodio al 0,05% en un tiempo no menor a 15 minutos, después se enjuagó con agua abundante. *Pelado*, se realizó de forma manual con cuchillo y se trozó en pequeños cuadros para facilitar el pulpeado. *Pulpeado*, se licuaron los trozos de chayote con 400 mL de jugo de naranja. *Cocción*, se realizó una precocción de la pulpa, en una cacerola por 10 minutos a 85 *ºC*. Después de este tiempo de precocción se añadió la mitad de azúcar total (283 g / 900 g de pulpa), el resto del azúcar (283 g) se añadió 10 minutos más tarde; también se adicionó ácido cítrico como conservador 5 minutos antes de terminar la cocción. *Prueba de la gota en el vaso de agua*, para indicar el punto final de cocción de la mermelada en un vaso con agua se colocaron gotas de mermelada, el indicador fue cuando las gotas llegaron al fondo del vaso sin desintegrarse. *Envasado*, La mermelada se envasó en caliente, a una temperatura de 85 *ºC*. Al producto final se le determinaron grados brix, se utilizó un refractómetro de mano marca Atago y se midió su pH para ello se utilizó un potenciómetro marca Conductronic.

Análisis fisico-químicos

Estos fueron realizados para asegurar la calidad del producto terminado (NMX-F-127), los cuales fueron: pH (NMX-F-317), grados brix (NMX-F-112), pectina (NMX-F-347), acidez titulable, fibra total, humedad, ceniza, extracto etéreo, azúcares y proteína (A.O.A.C. 1984).

Análisis microbiológicos

Se realizaron los análisis microbiológicos para asegurar que se hayan llevado a cabo buenas prácticas de manufactura y se evaluó cuenta de bacterias aerobias en placa, cuenta de hongos y levaduras, coliformes, *E.coli* y *Salmonella*, basándonos en las siguientes normas:

Norma Oficial Mexicana (NOM)-109-SSA1-1994. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Análisis Sensorial

Para la realización de este tipo de pruebas se utilizaron pruebas de aceptación, en el cual el equipo de evaluadores clasificó las muestras con relación a la preferencia o a su nivel de satisfacción, entre los posibles consumidores. Para ello se elaboraron las mermeladas un día previo a la encuesta y se presentaron los productos sin indicar su composición a un número de 60 personas: 30 mujeres y 30 hombres. La evaluación de estos productos se basó en el empleo de una escala de 6 categorías: 6 excelente, 5 muy bueno, 4 bueno, 3 regular, 2 malo y 1 muy malo.

Análisis Estadístico

Todos los análisis fueron realizados por triplicado y se presentó como resultado el promedio de los mismos. Se realizaron análisis estadístico mediante análisis de varianza, utilizando el método de diferencia mínima significativa (α= 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Materia Prima

Se realizaron análisis fisicoquímicos al chayote para determinar su composición química (**Tabla 1**) y se realizó el análisis bromatológico completo para chayote y semilla de chía (**Tabla 2**).

El análisis bromatológico nos proporcionó información acerca del aporte nutrimental del chayote, que es casi en su totalidad agua (95%) y el componente que sigue en orden de importancia son los carbohidratos, los datos obtenidos son similares a los reportados por Becerra (1996) para variedades de chayote no espinosas nativas del estado de Veracruz. Mientras que en el caso de la semilla de chía el principal aporte está dado por la grasa, lo cual coincide con lo reportado por Beltrán (2004), quien indica un 32%. Mientras que Averza (1995) determinó que aproximadamente el 20% del contenido de acidos grasosos corresponden al ácido linolénico (omega 3).

Tabla 1. Análisis Fisicoquímico del Chayote.

% Pectina	6,56 ± 0,81
%Fibra Cruda	9,8 ± 0,36
%Indice de acidez	0,03 ± 0,00
pH	6,46 ± 0,00
ºBrix	4,50 ± 0,00

Tabla 2. Análisis Bromatológicos de las materias primas.

	Chayote	**Semilla de Chía**
% Humedad	95,03 ± 0,05	6,15 ± 0,14
%Grasa	0,24 ± 0,01	30,70 ± 0,63
%Cenizas	0,43 ± 0,07	4,10 ± 0,26
%Proteína	0,90 ± 0,05	17,90 ± 0,98
%Carbohidratos	3,50 ± 0,20	8,90 ± 0,54

Formulaciones de Mermelada

Para las formulaciones de mermelada de chayote se buscó que los productos cumplieran con las características de color, textura, brillantez, consistencia y sabor y que además cumpliera con las normas mexicanas (NMX-F-127). Primero se elaboró la formulación utilizando como ingrediente principal al chayote, una vez que se establecieron las cantidades adecuadas de ingredientes se adicionó la formulación con semilla de chía (**Tabla 3**).

Tabla 3. Formulaciones elaboradas para obtener 1000 g de mermelada.

Ingredientes	**Formulación 1**	**Formulación 2**
Chayote	480 g	480 g
Azúcar	576 g	576 g
Jugo de naranja	400 ml	400 ml
Acido cítrico	0,8 g	0,8 g
Semilla de Chía	0	16 g

Se realizaron diversas pruebas para encontrar la cantidad adecuada de chía que debía agregarse a la formulación, se realizaron pruebas adicionando chía en 0,2%, 0,4%, 0,8% y 1,6%; sin embargo se observó que cuando se adicionaron cantidades mayores su apariencia no era aceptada por el consumidor, además no presentaba el aspecto característico de una mermelada, ya que perdía consistencia. Lo anterior es debido a que la semilla de chía es capaz de absorber 9 veces su peso en agua y en consecuencia formar un mucílago que es el responsable en el cambio de textura. Se encontró que con el 1,6% de semilla de chía en la formulación se obtenía un producto de consistencia y sabor agradable. Para la incorporación de la chía a la formulación se buscaron las condiciones idóneas. Se realizaron pruebas de adición durante la etapa de cocción, sin embargo el producto adquiría una coloración oscura y con menor brillantez. Motivo por el cual se decidió adicionarla justo antes de envasar el producto, cuando este tenía una temperatura aproximada de 90 *ºC*.

Se verificó la consistencia de la mermelada realizando la prueba de la gota, esto para indicar el punto final de la cocción, en seguida se adicionó la semilla de la chía a la mermelada, midiendo constantemente los ºBrix. Después de cinco minutos se añadió el acido cítrico y se envasó el producto terminado a una temperatura de 90 *ºC* en frascos previamente esterilizados.

Análisis Sensorial

Se presentaron las cuatro formulaciones a un grupo de 60 personas cuyas edades fluctuaban entre 18 y 29 años, considerándolos como potenciales consumidores del producto en cuestión. El análisis se realizó en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Puebla, de las personas encuestadas la mayoría eran estudiantes y habituales consumidores de mermelada (al menos 1 vez por semana); los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Análisis físico-químicos y bromatológicos de las mermeladas.

	Formulación 1	Formulación 2
Fisico-químicos		
%Pectina	5,90± 1,68	7,36±0,23
%Fibra Cruda	0,96± 0,25	2,80± 0,10
%Índice de acidez	0,30± 0,00	0,28± 0,01
pH	3,85± 0,00	3,95± 0,00
°Brix	66,00 ± 0,00	62,00± 0,00
Bromatológicos		
% Humedad	32,22± 2,64	32,82 ± 0,77
%Grasa	0,12± 0,03	1,03 ± 0,70
%Cenizas	0,33 ± 0,10	0,12± 0,03
%Proteína	1,05 ± 0,07	1,33± 0,08
%Carbohidratos	66,28± 1,30	64,45± 2,50

Todas las formulaciones fueran aceptadas por los consumidores, a excepción de uno de los encuestados que evaluó como "mala" la consistencia de la formulación 2, ninguno de los evaluadores restantes calificó las características de los productos como "malo" o "muy malo" (equivalente a valores de 2 y 1, respectivamente). La característica que obtuvo un mayor puntaje fue el sabor ($p<0,01$), seguida de aroma, consistencia y color. Se observó que en la formulación 1, los encuestadores que dieron las calificaciones más altas en su mayoría fueron mujeres, quienes dieron calificaciones de "Excelente". Por parte de los hombres fueron bien recibidas las formulaciones calificando principalmente como "Excelente" y "Muy Buenas". La formulación 1 fue la que tuvo en general mayor aceptación sobre todo entre la población femenina en comparación con la formulación 2 (**Figura 1**), esto seguramente es debido a la apariencia que dá al producto la presencia de semilla de chía. Con los datos anteriores podemos afirmar que existe una buena aceptación de estas formulaciones por el público estudiantil (potenciales compradores), lo que nos sugiere que podrían tener éxito si se introdujeran al mercado; inclusive si consideramos que las mujeres es el grupo al que más agradó el producto ya que generalmente quienes realizan las compras son las amas de casa.

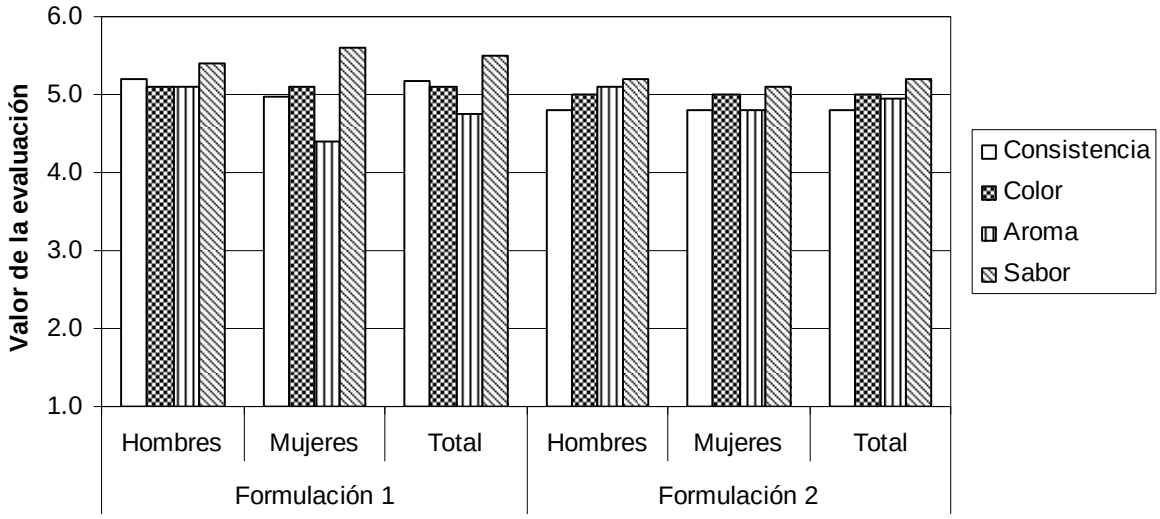


Figura 1. Evaluación sensorial de las formulaciones de mermelada de Chayote (valor promedio de 30 hombres, 30 mujeres y de la sumatoria de ambos grupos para cada una de las formulaciones).

Caracterización de las Formulaciones

Al realizar los análisis fisicoquímicos y bromatológicos de cada una de las formulaciones se comprobó que todas ellas se encuentran dentro de las Normas Mexicanas ya que para el caso de mermeladas, se indica que éstas deben presentar alrededor de 66 ºBrix y un pH de 3 a 3,6 (Corornado 2001, NMX-F-127). Con rangos de pH ácidos el producto se puede conservar libre de microorganismos que puedan

deteriorar las características del producto. Además se puede observar que el contenido de fibra cruda es menor en comparación a los resultados obtenidos de la materia prima. En las formulaciones suplementadas con chía el contenido de pectina se incrementó, gracias a la capacidad que tiene la semilla de formar un gel, el cual incrementó ligeramente la viscosidad del producto. Además al formarse el gel disminuyeron los azúcares solubles, lo cual se reflejó en las determinaciones de ºBrix y en el sabor menos dulce de las formulaciones con chía. El análisis bromatológico es importante por que gracias a él se puede determinar el aporte energético por porción de producto y nos indica el valor nutrimental del mismo; como sería el incremento de grasa (aproximadamente 20% de este corresponde a ácido linolénico) debido a la adición de semilla de chía (**Tabla 4**).

Análisis microbiológicos

Se garantizó la ausencia de bacterias patógenas y en consecuencia las buenas prácticas de manufactura llevadas a cabo durante el proceso de elaboración (**Tabla 5**).

Tabla 5. Análisis microbiológicos de las mermeladas de chayote.

Organismos	Formulación 1	Formulación 2
Coliformes	< 1 UFC/ ml	< 1 UFC/ ml
Hongos y Levaduras	< 1 UFC/ ml	< 1 UFC/ ml
Salmonella	Negativo	Negativo
Escherichia coli	Negativo	Negativo

CONCLUSIONES

Las formulaciones cumplen con las características fisico-químicas que indican las normas mexicanas (NMX y NOM). Se lograron obtener productos de consistencia y apariencia equiparable a las mermeladas que se encuentran en el mercado.

Se logró obtener un producto a base de chayote con mayor valor agregado y con amplia aceptación entre los consumidores (hombres y mujeres), aunque se encontró que la formulación sin semilla de chía tuvo una mejor calificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis. 14th. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists. pag 7-26.

Aleixandre JL. 1999. Industrias Agroalimentarias. 1ª ed. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. pag 548-567.

Ayerza R. 1995. Oil Content and Fatty Acid Composition of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Five Northwestern Locations in Argentina. Journal of the American Oil Chemists' Society, 72:1079-1081

Becerra ZJ. 1996. Estudio agroecológico del chayote (*Sechium edule* (Jacq) Swartz en el estado de Veracruz. 1ª ed. Xalapa: Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. pag 12 -118.

Beltrán OMC, Romero MR. 2007. La chía alimento milenario. 1ª ed. México Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos de la E.N.C.B.-I.P.N. pag 6-12.

Bushway AB. 1981. Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. Journal of Food Science, 46:1349-1356.

Cadena CI. 2000. Intercambio de Gases, Relaciones Hídricas e Identificación de Alteraciones Fisiológicas y Morfológicas en *Sechium edule(Jacq.) Swartz* por cambio de hábitat. 1ª ed. Colegio de posgraduados. pag 20.

Coronado TM, Hilario RR. 2001. Elaboración de mermeladas. 2ª ed. Lima, Perú: CIED pag. 5-17.

Newstrom LE. 1989. Studies in the origin and evolution of chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). (cucurbitaceae) Thesis published by University of California Berkeley. USA. pag 134-135.

NMX-F-112 Método de prueba para la determinación de sólidos solubles por lectura refractométrica en productos derivados de las frutas.

NMX-F-127-1982 Para humanos- frutas y derivados-Mermelada de piña.

NMX-F-317-S Alimentos - Determinación de pH.

NMX-F-347-S Frutas y derivados - Determinación de pectina.

SAGARPA. 2004. Consulta de Indicadores de Producción Nacional y Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON. 1ª ed. Anuario Agrícola. pag 70

Secretaria Desarrollo Rural (SDR). 2005. Cultivos del estado de Puebla. 1ª ed. Gobierno del estado de Puebla. pag 558-561.

Evaluación de atributos fisicoquímicos y organolépticos en mermeladas elaboradas a partir de kiwis deshidratados osmóticamente

Evaluation of physicochemical and sensory attributes in marmalades prepared from osmotically dehydrated Kiwifruit

Bambicha R [(1)], Agnelli M E [(1) (2)]

(1) CIDCA (CONICET La Plata y Universidad Nacional La Plata)
(2) Fac. Ingeniería, Universidad Nacional La Plata
magnelli@ing.unlp.edu.ar

RESUMEN

El efecto del agregado de calcio en mermeladas elaboradas a partir de kiwis deshidratados osmóticamente fue determinado mediante la evaluación de atributos fisicoquímicos y organolépticos.

La deshidratación osmótica (DO), empleada como etapa previa a la cocción de mermeladas, permite usar tiempos menores durante la concentración por evaporación, evitando el daño térmico severo y asegura un producto con un contenido mínimo de fruta del 40% y un contenido de sólidos solubles finales de 65ºBrix.

En una primera etapa, se prepararon las soluciones empleando como agentes deshidratantes: sacarosa (de grado comercial) y una mezcla de xilitol (edulcorante no nutritivo) – jmaf (jarabe de maíz de alta fructosa) y se adicionaron distintas sales de Ca2+: gluconato de calcio, cloruro de calcio e hidróxido de calcio de grado alimenticio en dos niveles de concentración: 1 y 2% (p/p). Los kiwis fueron deshidratados durante 4 horas para alcanzar la máxima impregnación con calcio y posteriormente se los utilizó para la elaboración de mermelada.

En el presente trabajo se evaluó la influencia de las sales presentes en las mermeladas, mediante la determinación de los parámetros: color, textura y propiedades fisicoquímicas (pH, contenido de humedad, a_w y sólidos solubles).

El análisis colorimétrico indica que el agregado de hidróxido de calcio modificó significativamente los parámetros L*, a* y b*. El incremento observado respecto del control fue de 13%, 51% y 43%, respectivamente.

El análisis de textura indica que la adición de calcio provoca cambios significativos en los parámetros de fluencia: firmeza, elasticidad, consistencia y cohesividad tanto respecto de las mermeladas elaboradas con frutas DO como con respecto de la mermelada tradicional.

La evaluación de los parámetros físico-químicos muestra que la presencia de calcio en los dos niveles ensayados no provoca una variación significativa respecto de las mermeladas obtenidas a partir de DO.

En conclusión, la adición de calcio mediante gluconato y cloruro de calcio no modifica el color original del producto final, en cambio debería desestimarse la utilización de hidróxido de calcio como fuente de este mineral. Por otro lado, tomando en cuenta los resultados de textura, se puede inferir que la incorporación de cloruro de calcio en los dos niveles estudiados produce un producto de mayor firmeza y consistencia.

ABSTRACT

The effect of calcium addition in kiwi jam made from osmodehydrated fruits (OD) was determined.

The osmotic dehydration, used as a previous stage to cooking process of jam, allows reducing time process during concentration. Thus, serious thermal damage is avoided and a product with a minimum fruit content of 40% and a final soluble solid content of 65º Brix is assured.

Two basic 69 ºBrix dehydration agents were prepared: one of sucrose (commercial grade) and another of xilitol (low nutritive sweeteners) and high fructose corn syrup mixture. Different salts of calcium: calcium gluconate; calcium clorure and hydroxide of calcium were added to both in two levels of concentration: 1 y 2% (w/w). Kiwis were dehydrated during 4 hours to reach the maximum Ca^{2+} impregnation and then used to prepare jams.

In this work, the influence of calcium salts present in kiwi marmalade was evaluated. The physicochemical (pH, moisture content, a_w and soluble solid content) and organoleptic properties (color and mechanical properties) were analyzed.
Colorimetric measurement indicated that the addition of hydroxide of calcium changed significantly the colour parameters L*, a* and b*. The increase observed as regards the control sample was: 13%, 51% and 43%, respectively.
The measurement of mechanical properties indicated that the addition of calcium induced to significant changes on parameters as consistency, hardness, elasticity and cohesiveness with respect to marmalade made with osmodehydrated fruits without Ca^{2+} and to jam prepared in the traditional way.
The evaluation of physicochemical properties suggested that the addition of calcium did not produce appreciable changes respect to control sample.
In conclusion, the addition of calcium gluconate and clorure induced no differences in the original colour of the final product, however it is not recommended the utilization of hydroxide of calcium. On the order hand, the results of texture parameters showed that incorporation of calcium clorure in both concentration levels, produced marmalade with greater consistency and hardness than the traditional made jam.

PALABRAS CLAVE: *deshidratación osmótica, mermelada, calcio.*

KEYWORDS: *osmotic dehydration, marmalade, calcium.*

INTRODUCCIÓN

Una alternativa en la formulación de mermeladas es utilizar fruta deshidratada osmóticamente. La deshidratación osmótica (DO) reduce los tiempos requeridos durante la concentración de pulpa en el proceso de elaboración de mermelada (Shi *et al.* 1996). La utilización de fruta deshidratada en la manufactura de mermeladas, permite obtener un producto con atributos sensoriales superiores a los de los restantes tipos (Wais *et al.* 2005) y parámetros físico químicos iguales o superiores a los exigidos por la legislación actual, que especifica un contenido mínimo de fruta del 40% y un contenido final de sólidos solubles de 65 ºBrix.
En la manufactura de mermeladas resulta interesante e innovador, para el consumo humano, la obtención de alimentos fortificados. El Código Alimentario Argentino define como alimento fortificado, al alimento en el cual la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente. El alimento fortificado deberá aportar entre 20 y 100% de los requerimientos diarios recomendados, según la ingesta diaria indicada en el rotulado del alimento.
Una ventaja que ofrece el uso de DO es la incorporación de sustancias tales como vitaminas, minerales, los cuales son suministrados por la solución que se utiliza para deshidratar. A su vez, la utilización de soluciones azucaradas previene el pardeamiento oxidativo enzimático y no enzimático de la fruta (Shi *et al.* 1996).
El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la adición de calcio en mermeladas elaboradas a partir de kiwi deshidratado osmóticamente (kiwi DO) y la solución deshidratante (SO), evaluando parámetros organolépticos de calidad (determinación colorimétrica y de fluencia) y fisicoquímicos (a_w, pH, sólidos solubles y contenido de agua). Estas fueron comparadas con las elaboradas tradicionalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras

Se elaboraron mermeladas a partir de kiwi DO y la SO resultante de la deshidratación, con agregado de pectina. Sus propiedades fueron comparadas con las de las elaboradas por el método tradicional, sin agregado de pectina (denominada Tradic).

Para ello, se emplearon dos tipos de soluciones:
- Una mezcla de xilitol (hasta alcanzar su solubilidad máxima) y jarabe de maíz de alta fructosa de modo de alcanzar un contenido de sólidos de solubles de 68 ºBrix. A esta solución mezcla se la denominó xil-jmaf.
- Una solución de sacarosa de 68 ºBrix denominada sac.

Cada una de estas soluciones, a su vez fue enriquecida con distintas sales de calcio: cloruro de calcio, gluconato de calcio e hidróxido de calcio en distintas concentraciones (1% o 2%). De esta manera se formularon las siguientes soluciones:
- xil-jmaf con 1% y 2% de Cl_2Ca denominadas xil-jmaf + 1% Cl_2Ca y xil-jmaf + 2% Cl_2Ca, respectivamente.
- xil-jmaf con 1% y 2% de gluconato de Ca denominadas xil-jmaf + 1% Gluc Ca y xil-jmaf + 2% Gluc Ca, respectivamente.
- xil-jmaf con 1% de $Ca(OH)_2$ denominadas xil-jmaf + 1% $Ca(OH)_2$
- sac con 1% y 2% de Cl_2Ca denominadas sac + 1% Cl_2Ca y sac + 2% Cl_2Ca, respectivamente.
- sac con 1% y 2% de gluconato de Ca denominadas sac + 1% Gluc Ca y sac + 2% Gluc Ca, respectivamente.
- sac con 1% $Ca(OH)_2$ denominadas sac + 1% $Ca(OH)_2$.

Proceso de deshidratación osmótica

Se emplearon kiwis frescos (*Actinidia Chinensis P.)* comprados en el mercado local. Las frutas fueron peladas y cortadas en rodajas de 1 cm de espesor y sumergidas en las soluciones deshidratantes. La DO se efectuó a 30 *ºC* durante 4 horas, tiempo necesario para alcanzar la máxima incorporación de sólidos en las condiciones de trabajo. Las muestras fueron colocadas en vasos de precipitado, los cuales se ubicaron en un shaker termostatizado con agitación constante a 100 ciclos/min. Transcurrido el tiempo de deshidratación, se escurrieron en papel secante dispuesto en bandejas de plástico en esta primera etapa.

Preparación de mermelada tradicional y a partir de kiwis DO

La elaboración de mermelada tradicional se realizó mezclando fruta fresca, pelada, cortada y triturada posteriormente con una procesadora y luego fue sometida a cocción a fuego lento hasta la disminución de volumen inicial de fruta de 1/3 aproximadamente. Luego se adicionó el azúcar y se cocinó hasta alcanzar la consistencia propia de una mermelada.

La mermelada a partir de fruta DO fue preparado mezclando la misma, triturada mediante una procesadora, junto con la solución deshidratante ya utilizada (que reemplaza al azúcar). Al finalizar el proceso de cocción se agregó como agente gelificante, pectina cítrica (distribuida por Droguería Saporiti SACIFIA, Parafarm).

En ambos casos, se procedió posteriormente al envasado manual del producto en frascos de vidrio con una capacidad volumétrica de 270 cm^3.

Propiedades fisicoquímicas

La medición de actividad acuosa (a_w) se realizó utilizando un higrómetro de punto de rocío Aqualab Serie 3 (Decagon Inc.) a temperatura ambiente (25 *ºC*).

Se determinó el pH con pH-metro, utilizando electrodo de punta.

El contenido de sólidos solubles fue determinado por medición de ºBrix a 20 *ºC* (refractómetro Bellingham –Stanley Limited).

El contenido de humedad fue determinado siguiendo la técnica establecida por método 20103, AOAC (1980).

Ensayos de textura

Se evaluaron las propiedades de flujo, a través del siguiente análisis del Test de compresión:

La muestra fue sometida a un ensayo de compresión, utilizando la zonda P/05R a una velocidad de ensayo de 2 mm/s, utilizando el Analizador de textura: TA.XA2i (Stable Micro Systems, Reino Unido). Las propiedades analizadas a partir de este ensayo son: firmeza, elasticidad, consistencia y cohesividad.

Ensayos de color

Para la representación del color en el espacio tridimensional, se utilizó el sistema CIE 1976, L*, a* y b*. Se realizó el ensayo sobre una película de 3 cm de espesor de mermelada colocada en una cápsula

de Petri, utilizando el colorímetro Minolta modelo CR300 para la determinación de las coordenadas cromáticas L*: luminosidad; a*: enrojecimiento y b*: amarillamiento.

Análisis estadístico

En todos los casos se realizaron determinaciones por triplicado y los resultados se informaron como el valor promedio. Los datos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) mediante el empleo del software STATGRAPHICS Plus 4.0. (Manugistics Inc., USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las **figuras 1, 2, 3 y 4** (a y b, respectivamente) se muestran los valores obtenidos para los parámetros fisicoquímicos evaluados: pH, contenido de humedad, sólidos solubles y a_w para las mermeladas elaboradas a partir de las soluciones deshidratantes de xilitol-jmaf y sacarosa.

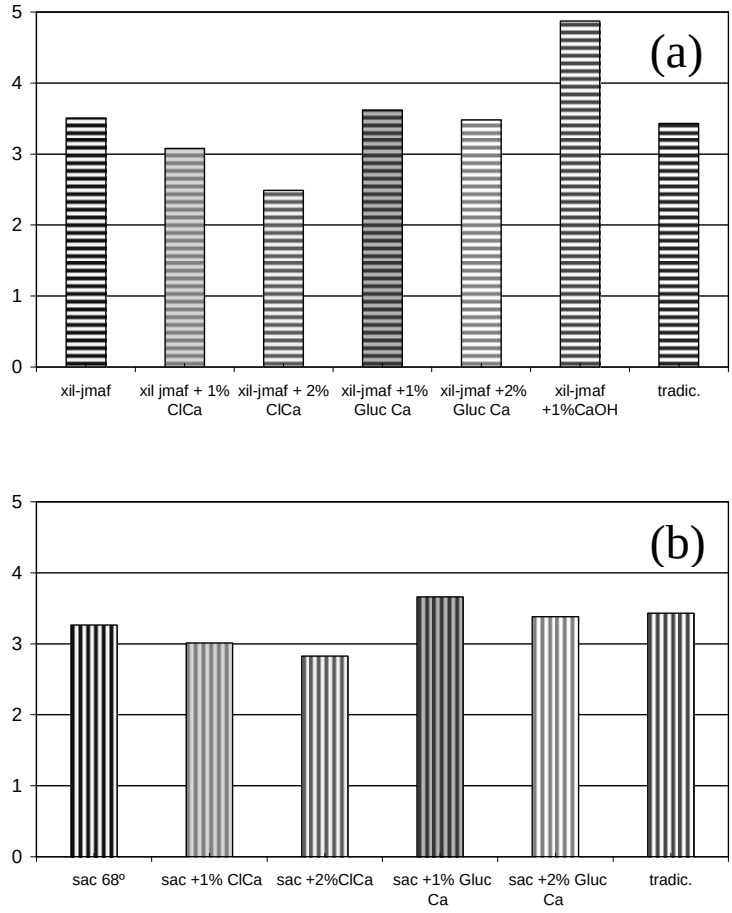


Figura 1. Valores de pH en mermeladas elaboradas a partir de soluciones (a) de xilitol-jmaf, (b) de sacarosa.

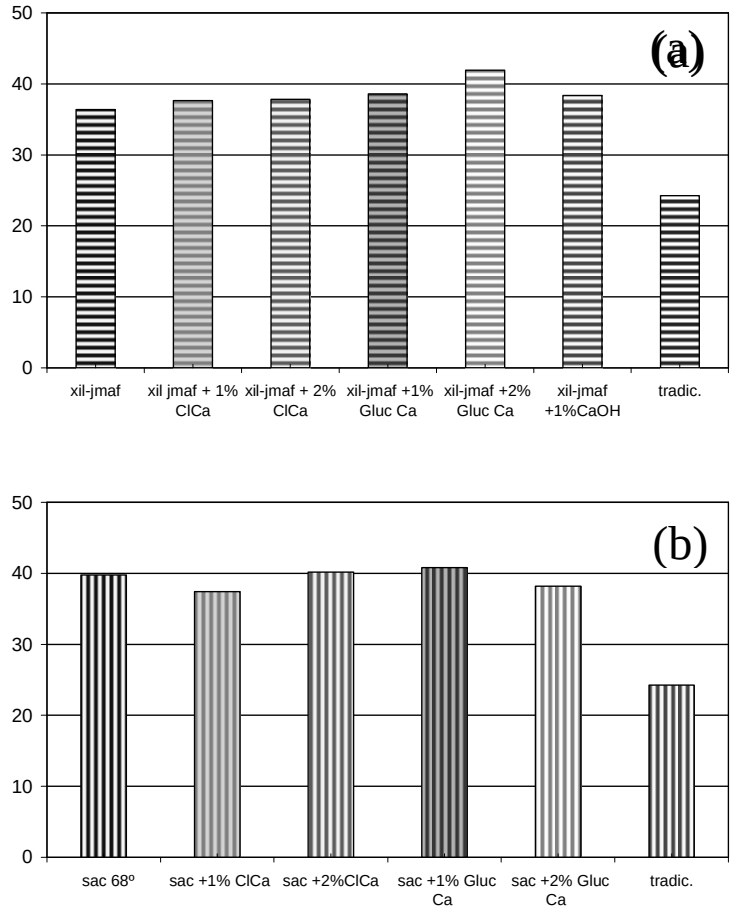
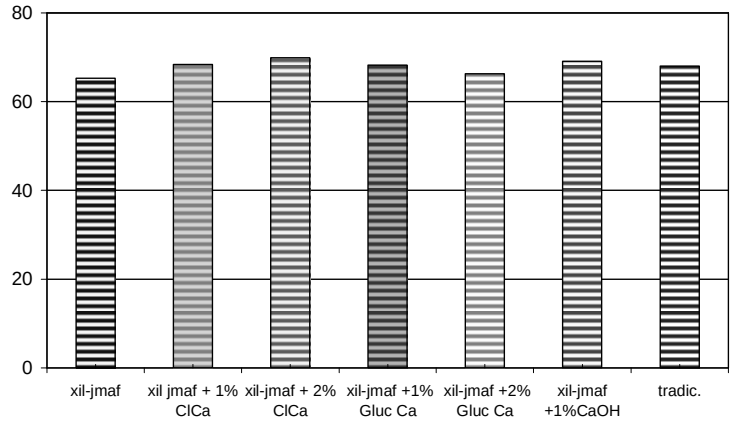


Figura 2. Contenido de humedad en mermeladas elaboradas (a) a partir de soluciones de xilitol-jmaf, (b) a partir de solución de sacarosa.



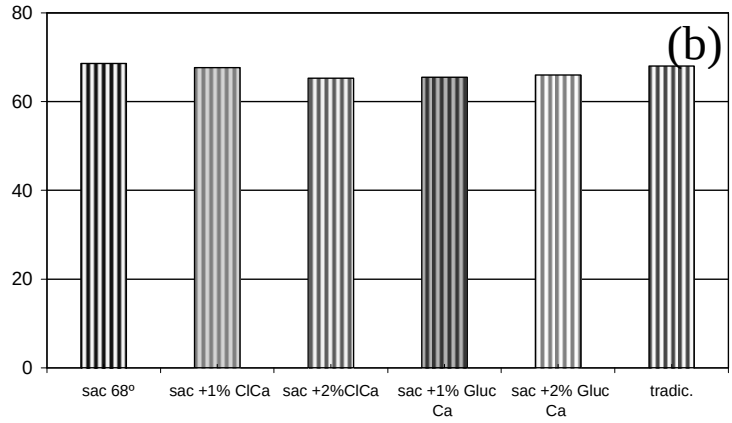
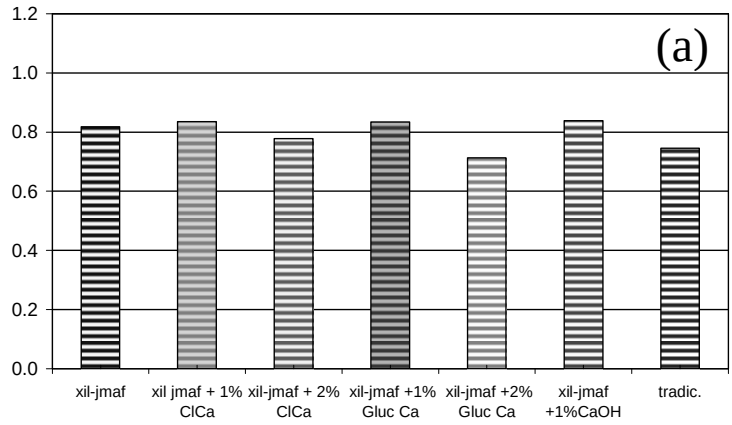


Figura 3. Valores de sólidos solubles en mermeladas elaboradas a partir de soluciones (a) de xilitol-jmaf y (b) de sacarosa



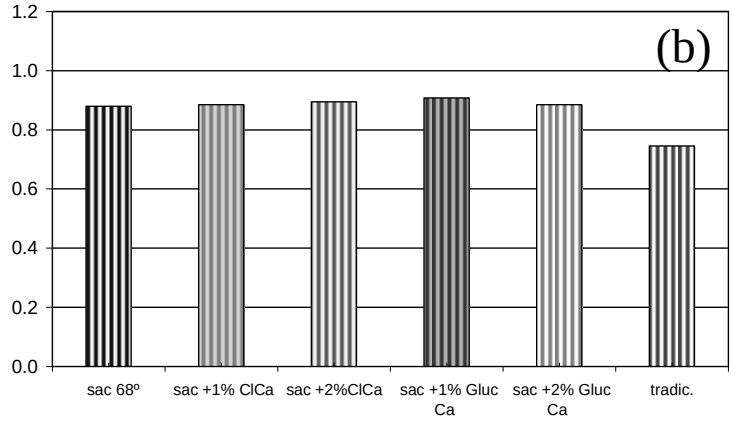


Figura 4. Valores de a_w en mermeladas elaboradas (a) a partir de soluciones de xilitol-jmaf, (b) a partir de solución de sacarosa.

La mermelada obtenida a partir de fruta DO, deshidratada tanto en sacarosa como en la solución mezcla de xilitol-jmaf, presentó un rango de valores de pH inferiores a 4,5, con lo cual se descarta el riesgo de desarrollo de *C. Botullinum* durante su posterior almacenamiento. Asimismo los valores evaluados son de igual magnitud a los hallados en la bibliografía (García-Martínez *et al.* 2002) para las mermeladas comerciales de frutilla, durazno, damasco y ciruela, a excepción de la mermelada adicionada con 1% de hidróxido de calcio (pH = 4,88).

La humedad promedio obtenida para las mermeladas DO es mayor significativamente ($p<0,05$) que en la elaborada de modo tradicional. Este comportamiento se observa tanto en aquellas obtenidas de deshidratar en soluciones de sacarosa como de xilitol-jmaf. El agregado de calcio no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de agua.

Los valores experimentales obtenidos para a_w en los productos obtenidos a partir de kiwis deshidratados con y sin adición de calcio, en soluciones de sacarosa y xilitol-jmaf, son superiores a los correspondientes elaborados de modo tradicional, no obstante es suficientemente baja para asegurar la conservación del producto durante su almacenamiento.

Los valores experimentales obtenidos para sólidos solubles en las mermeladas elaboradas bajo la tecnología propuesta, presentan un rango de valores desde 65 a 70 ºBrix que satisfacen los requerimientos legales actuales. La adición de calcio no tuvo un efecto significativo estadístico ($p<0,05$) sobre el contenido de sólidos solubles valorados.

En las **figuras 5** (a) y (b) se presentan los valores de L*, a* y b*, determinados en mermeladas formuladas a partir de kiwis deshidratados en solución de xilitol-jmaf y sacarosa, respectivamente.

En general, los productos obtenidos con fruta parcialmente deshidratada mediante DO presenta una tonalidad más verdosa y menos amarillenta que los obtenidos de modo tradicional.

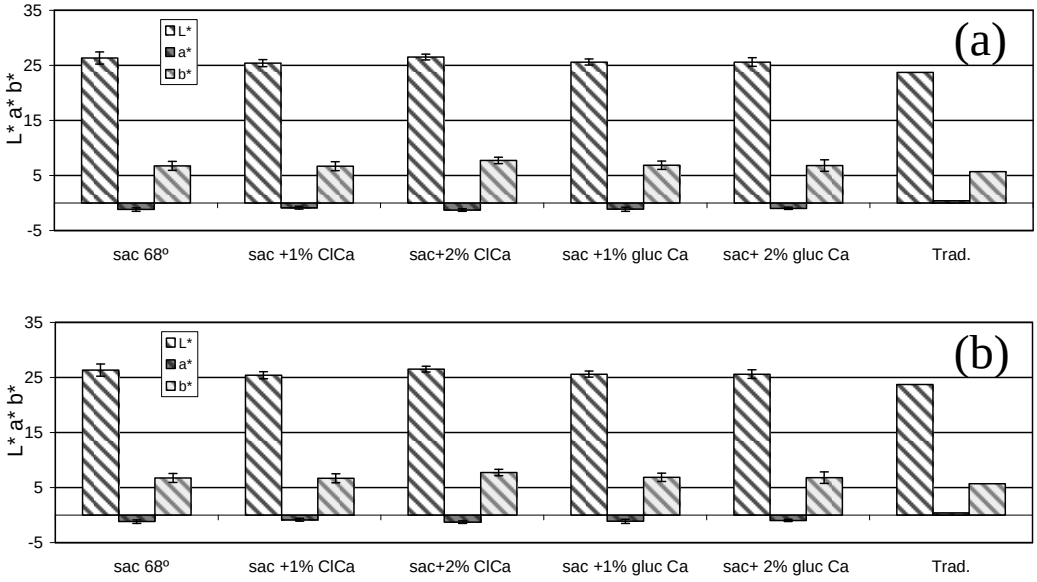


Figura 5. Determinación de color en mermeladas elaboradas a partir de soluciones de (a) xilitol-jmaf y (b) sacarosa.

El análisis colorimétrico indica que el agregado de calcio en los dos niveles estudiados no modifica el color respecto de las mermeladas elaboradas sin adición de calcio, exceptuando la adicionada con hidróxido de calcio que exhibió un aumento significativo ($p<0.05$) en L*, a* y b*. El incremento observado respecto al control fue de 13%, 51% y 43%, respectivamente.

Los valores obtenidos para los parámetros de textura: firmeza, elasticidad, consistencia y cohesividad, medidos en mermeladas formuladas con kiwis deshidratados en soluciones de sacarosa y xilitol-jmaf se muestran en las **figuras 6** (a) y (b), respectivamente. Estos muestran en general que el agregado de calcio, en los dos niveles evaluados, provoca cambios significativos ($p<0,05$) en la consistencia y cohesividad. Las mermeladas elaboradas a partir de kiwis deshidratados en ambas soluciones presentan una consistencia y firmeza significativamente mucho menor ($p<0,05$) en comparación con la mermelada tradicional. Resultados previos (García-Martínez *et al.* 2002) proponen la selección de un adecuado agente gelificante.

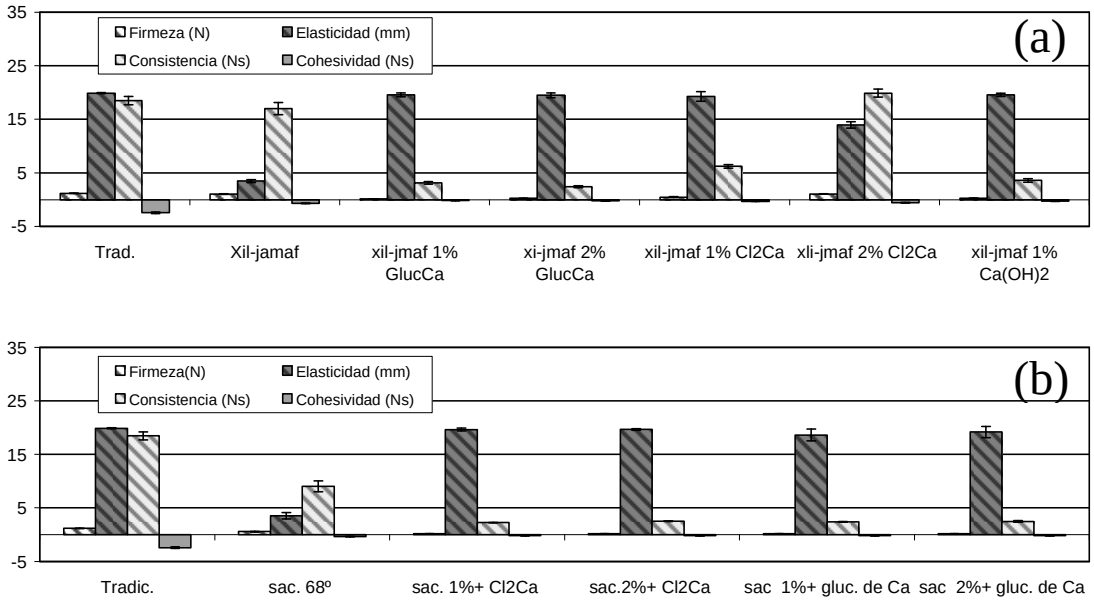


Figura 6. Determinación de parámetros texturales en mermeladas elaboradas a partir de soluciones de (a) xilitol-jmaf y (b) sacarosa.

Los valores de cohesividad encontrados para las mermeladas formuladas con calcio, alcanzaron valores inferiores significativamente ($p<0,05$) a los obtenidos para muestra control y mermelada tradicional. Las disminuciones fueron del 80% respecto de la mermelada comercial.
La naturaleza de la sal de calcio no tuvieron un efecto significativo ($p<0,05$) sobre la elasticidad en los niveles de concentración estudiados.

CONCLUSIONES

La inclusión de la deshidratación osmótica como etapa previa en la elaboración de mermeladas, permitió obtener un producto con mejores atributos organolépticos que la mermelada elaborada por método tradicional. Esta mejora resultó más evidente en el color, parámetro de calidad mayormente considerado por el consumidor en el momento de seleccionar una mermelada envasada en frasco. La adición de calcio mediante gluconato de calcio y cloruro de calcio no modificó el color respecto a la muestra control, mientras que la incorporación de hidróxido de calcio alteró significativamente las tres coordenadas de color, por lo que debería desestimarse la utilización de esta fuente de calcio en la elaboración de mermeladas.
Por otra parte, tomando en cuenta los resultados de textura, se puede inferir que en las mermeladas obtenidas a partir de kiwis DO en sacarosa, la adición de calcio provocó una disminución significativa en los parámetros de firmeza, consistencia y cohesividad respecto de la mermelada control y la comercial; mientras que el parámetro elasticidad aumentó significativamente respecto del control y fue de valor similar al obtenido para la mermelada comercial.
Para las mermeladas obtenidas a partir de kiwis DO en xilitol-jmaf, la adición de 2% de cloruro de calcio permitió lograr valores de firmeza, consistencia y elasticidad similares a los obtenidos para la muestra control. Mientras que para el parámetro cohesividad disminuyó significativamente en todas las muestras de mermeladas evaluadas.
Futuros estudios estarán orientados a definir la optimización de los atributos organolépticos de los productos evaluados en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

García-Martínez EG, Ruiz-Diaz J, Martínez-Monzó MM, Camacho N, Martínez Navarrete NA. 2002. Jam manufacture with osmodehydrated fruit. Food Research International, 35:301-306.

Shi XQ, Chiralt A, Fito P, Serra J, Escoin C, Gasque L. 1996. Application of osmotic dehydration technology on jam processing. Drying Technology, 14:841 – 857.

Wais N, Agnelli ME, Mascheroni RH. 2005. Deshidratación osmótica de frutas. Aplicación a la producción de mermeladas y bocadillos de kiwi. CD X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, tomo I; (133-141).

Extrusión de Cereal de Desayuno con Mezcla de Harina de Trigo y Avena

Extrusion of Breakfast Cereal with Wheat and Oat blend

Barbosa Rodríguez, EC (1), Hernández Viveros, J (1), Hurtado López, C (1), Santana Pérez, DE (1), Vázquez Ávila, T L (1), Gutiérrez Cortez, E (1), Ramírez Ortiz, ME (1) y Corzo Ríos, LJ (2)

(1) Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México.
(2) Instituto Politécnico Nacional, UPIBI, Av. Acueducto s/n, Barrio La Laguna, Col. Ticomán,, México, D.F., México.
lcorzo@ipn.mx

RESUMEN

La extrusión es una operación unitaria que está ganando popularidad por su versatilidad, su bajo costo y la automatización del proceso. También se ha convertido en una importante herramienta para procesar alimentos y mejorar su digestibilidad y otros aspectos nutricionales. Debido a la intensa ruptura y mezclado estructural que provoca este proceso, se facilitan reacciones que, de otro modo, estarían limitadas por las características de los productos y reactivos implicados. El objetivo de este estudio fue determinar experimentalmente las mejores condiciones de proceso: la configuración del tornillo, la temperatura de acondicionamiento, la proporción de la mezcla de harina de trigo con harina de avena, evaluando los cambios en: densidad volumétrica, expansión, y comportamiento reológico y tiempo de residencia. Se estudiaron 50-50, 60-40, 70-30 (trigo/avena) en la mezcla que se alimentaba al extrusor, 2 configuraciones de tornillo (álabes abiertos y cerrados) y 3 temperaturas de acondicionamiento de la masa (55, 65 y 70 *ºC*). Con respecto a la proporción de harina de trigo y avena, se observó que a menor contenido de avena el valor de K disminuye significativamente (P= 0,05), de la misma forma que ocurre con la densidad volumétrica mientras que n y la expansión aumentan significativamente (P=0,02, y 0,04 respectivamente). Para el caso del número de alabes se tiene que esta variable influye en la densidad volumétrica (P=0,0001) que disminuye con el aumento de número de alabes y en el tiempo de residencia que aumenta con el número de alabes de manera significativa (P=0,017). En el caso de la temperatura de acondicionamiento se tiene que cuando se incrementa, el valor de K (P=0,017) y densidad volumétrica aumentan mientras que el valor de expansión (P=0,0001) disminuye. Del estudio, se concluye que la proporción de harina de trigo-harina de avena presente en la formulación determina tanto la expansión como la viscosidad que presenta el producto final. El número de alabes influye en las características del cereal, dado que los almidones se pueden dañar mediante fuerzas mecánicas; es decir, al aumentar el tiempo de residencia del granulado dentro del cilindro, este tuvo mayor cizallamiento. La temperatura de acondicionamiento favorece la gelatinización del almidón y con ello favorece las propiedades de interacción con el agua y también favorece algunas características texturales como la dureza y la fractura.

ABSTRACT

Extrusion is a unit operation which is gaining popularity due to its versatility, its operational costs and the process automatization. It also has become an important tool for processing foods y better their digestibility and other nutritional aspects. Chemical reactions take place easily; this is by means of the intense rupture and structural mix produced by extrusion, otherwise these reactions would be limited by the reactants and the characteristics of the products themselves. The objective of this study was experimentally to determine the best conditions of process: The setting of the screw, conditioning temperature, mixture proportion (oat powder and wheat powder). Changes in volumetric density, expansion, rheological behavior and residence time were evaluated. Mixtures of 50-50, 60-40, 70-30 (wheat/oat) were studied into the mixture that fed the extruder, 2 screw settings (open blades, close blades), and 3 conditioning temperatures of the dough (55, 65 and 70°C). Respect to the wheat and oat ratio it was observed that at lower content of oat decrease K significantly (P= 0.05), as the same way that occurs with volumetric density, while n and expansion augment significantly (P=0.02, 0.04,

respectively). The screw settings change volumetric density (P=0.0001) which decreases while the number of blades is bigger and the residence time increased significantly (P=0.017) when the number of blades was increased. In the case of the conditioning temperature it shown that when this value increases the value of K (P=0.017) and volumetric density boost as well, while the expansion rate (P=0.0001) decreases. From this study, it has been conclude that the proportion of the mixture wheat/oat in the formulation influence both the expansion and the viscosity that is current in the final product. The number of blades in the screw influences the characteristics of the extruded product, the starch can suffer damage due to mechanical forces, increasing the time residence of the granulate in the cylinder, this had more share stress. The conditioning temperature promotes the gelatinization of the starch and thus favors the properties of interaction with water; it also favors some textural characteristics such as hardness and fracturability.

PALABRAS CLAVE: *Extrusión, cereal de desayuno, mezclas, avena y trigo.*

KEYWORDS: *Extrusion, breakfast cereal, blends, oat and wheat*

INTRODUCCIÓN

La extrusión es un proceso que está ganando popularidad por su versatilidad, su bajo costo y la automatización del proceso, además de ser un proceso amigable con el medio ambiente. Es un proceso que combina diversas operaciones unitarias como el mezclado, la cocción, el amasado y el moldeado. También se ha convertido en una importante herramienta para procesar alimentos y mejorar su digestibilidad y otros aspectos nutricionales (Robin 2002, Fellows 1994).

La extrusión puede modificar distintos materiales alimenticios a partir de ingredientes básicos (frijol, trigo, maíz) para producir una diversidad de nuevos productos en distintos sectores (alimentación animal, snacks y aperitivos, cereales para desayuno, productos para confitería, alimentación infantil, análogos de carne, etc.). Debido a la intensa ruptura y mezclado estructural que provoca este proceso, se facilitan reacciones que, de otro modo, estarían limitadas por las características de los productos y reactivos implicados, dando como resultado, alimentos de distinta forma, textura, color y *bouquet* (Bossen y Miller 1973, Robin 2002).

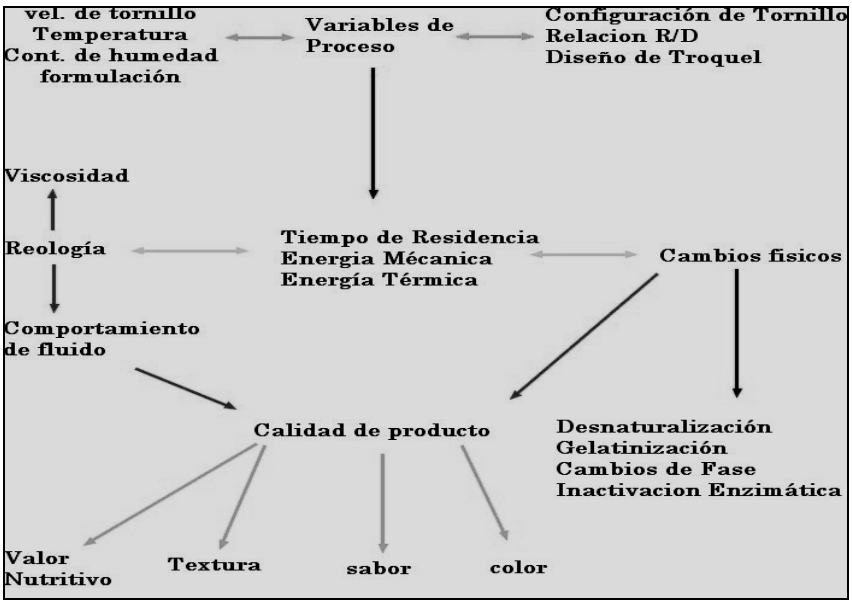


Figura 1. Efectos de las variables del proceso en los atributos del producto final (Choudhury y Gautam, 1999).

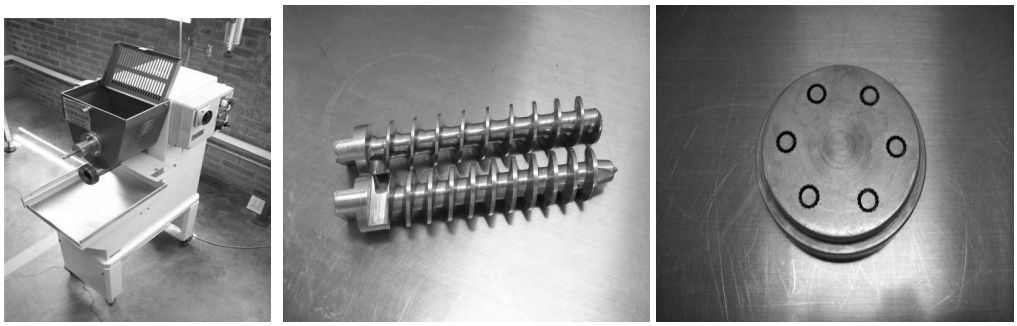
El estudio de la operación de extrusión tiene varias vertientes, desde los aspectos propiamente de ingeniería de la operación (como el diseño del equipo, las condiciones de operación, etc.) y los aspectos de tecnología (tipo de cereal, cambios en la formulación, etc.) y aspectos funcionales (adición de fibra, enriquecimiento con vitaminas, etc.), todos estos aspectos relacionados íntimamente en el

resultado final del producto. En la **figura 1** se puede observar la relación existente entre las variables del proceso de extrusión y las propiedades del producto, propuesta por Choudhury y Gautam (1999).
Ante esta perspectiva el estudio de los factores de extrusión que afecten las características del producto final es necesario para conocer el grado de influencia y poder recomendar algunas condiciones para establecer texturas, propiedades reológicas y sensoriales en función del producto que se desea obtener. Por ello el objetivo de este estudio fue: Determinar experimentalmente las mejores condiciones de proceso: la configuración del tornillo, temperatura de acondicionamiento, proporción de la mezcla de harina de trigo con harina de avena, evaluando los cambios en: densidad volumétrica, expansión, y comportamiento reológico y tiempo de residencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron para este estudio harinas de obtención propia con las siguientes características: harina de trigo con 9,98% de humedad y un tamaño promedio de partícula de 0,12mm y harina de avena con 13,71% de humedad y un tamaño promedio de partícula de 0,19mm.
La extrusión se llevo a cabo en un extrusor Modelo D45TETA6/D, código 946936 sin las paletas de mezclado, con dos configuraciones de tornillo, a una velocidad de 46 rpm y la boquilla para elaborar macarrones como se puede observar en la **figura 2**.



(a) (b) (c)

Figura 2. Extrusor (a) Tornillos (b) y Boquilla (c) empleados en este estudio.

Para el secado el cereal de desayuno se colocó en charolas en un horno de alta temperatura modelo D45, durante un lapso de 2 horas a una temperatura de 40 °C.

Diagrama de proceso

Para la fabricación del cereal se utilizó el diagrama de proceso descrito en la **Figura 3**.

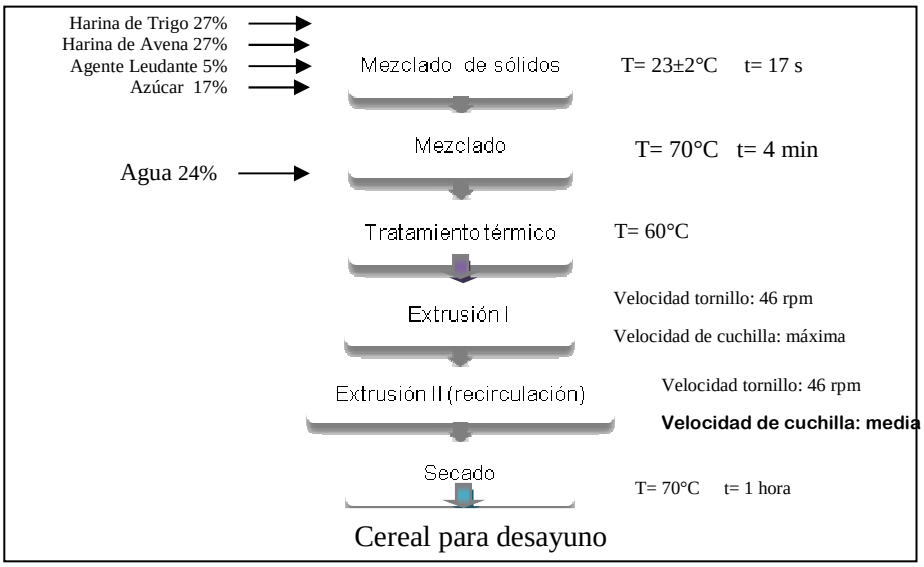


Figura 3. Proceso para la elaboración de cereal para desayuno.

Formulación

Preparación de muestra. Las harinas (500g de mezcla) fueron acondicionadas con el contenido de agua para obtener la humedad necesaria (38%), de acuerdo con las formulaciones planteadas (**Tabla 1**). Las muestras fueron puestas en un mezclador (Batidora Kitchen Aid Classic) donde la dispersión preparada fue atomizada a una velocidad de mezclado constante en un período de tiempo suficiente para la integración del agua. Las muestras fueron colocadas en charolas y cubiertas con una hoja de aluminio y llevadas a un horno (horno de alta temperatura modelo D45) donde se acondicionó a las diferentes temperaturas planteadas y posteriormente extrudida.

Tabla 1. Formulaciones en porcentaje para la elaboración de cereal para desayuno.

Ingredientes	Proporción de harinas en la mezcla				
	100% Harina de trigo	100% Harina de avena	50-50% H. trigo-H. avena	60-40% H. trigo-H. avena	70-30% H. trigo-H. avena
H.de trigo	54	-	27	32.4	37.8
H.de avena	-	54	27	21.6	16.2
Agua	24	24	24	24	24
Azúcar	17	17	17	17	17
Agente leudante	5	5	5	5	5

Se estudiaron relaciones 50-50, 60-40, 70-30 (trigo/avena) en la mezcla de alimentación al extrusor, 2 configuraciones de tornillo (álabes abiertos y cerrados) y 3 temperaturas de acondicionamiento de la masa (55, 65 y 70 *ºC*).

Métodos de evaluación

Viscosidad. Se realizó en un viscosímetro de cilindros concéntricos marca Rheomat RM 180. La muestra triturada se paso por la malla 60 (0.250 mm).Se dispersaron 9g de muestra triturada en 82 mL de agua a una temperatura de 80 °C. Se corrió un programa de 152 hasta 1291 s^{-1} y se obtuvieron los datos de esfuerzo de cizalla. Posteriormente se ajustaron los datos al modelo de la Potencia y se obtuvieron *n* y *K* que se emplearon en la ecuación (1) para el cálculo de la viscosidad aparente.

$$n_{app} = K\,\gamma^{(n-1)} \qquad (1)$$

η_{app} (Pa•s) = viscosidad aparente
n = Índice de comportamiento al flujo
K (Pa•s^n) = Índice de consistencia
□
(s^{-1}) = velocidad de cizalla

Expansión. Se evaluó la expansión por diferencia de dimensiones entre la boquilla y el diámetro del cereal.

Densidad Volumétrica. La densidad volumétrica fue determinada por el método propuesto por Fernández Gutiérrez *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se pesaron 2 g de muestra que se coloca una probeta de 100 mL. En este estudio se utilizó semilla de mijo y se empleó un volumen control de 70 mL. Este volumen se dejó caer en la probeta, posteriormente se toma el volumen de la semilla y se relaciona con el peso de la muestra para obtener la densidad. El promedio de tres medidas de cada extrudido fue reportado y expresado en gramos por litro. Se sustituyeron los datos obtenidos en la ecuación (2).

$$\rho = \frac{m}{V} \qquad (2)$$

m = masa (2g)
V = Diferencia de Volumen (mL)

Tiempo de residencia. Se tomo con un cronometro el tiempo desde la entrada de la muestra al extrusor y hasta que aparecía el producto por la boquilla.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Design-Expert 5.0 (Stat-Ease Inc. Minneapolis, MN) y empleando un análisis de varianza con $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viscosidad aparente

Experimentalmente se encontró que la concentración de la harina de trigo influye significativamente en la viscosidad del producto (P=0,05), como puede observarse en la **figura 4a**, debido probablemente a que el contenido de almidón en la harina de trigo es mayor (61%) en comparación con la harina de avena (45%) (Kent 1983), en tanto que la avena es el cereal con mayor cantidad de aceites vegetales (alrededor de un 65% de grasas no saturadas y un 35% de ácido linóleico) y una buena cantidad de fibras (Rafael 2009), componentes que limitan la interacción del almidón con el agua y por lo tanto con el desarrollo de la viscosidad de la pasta que se preparó.

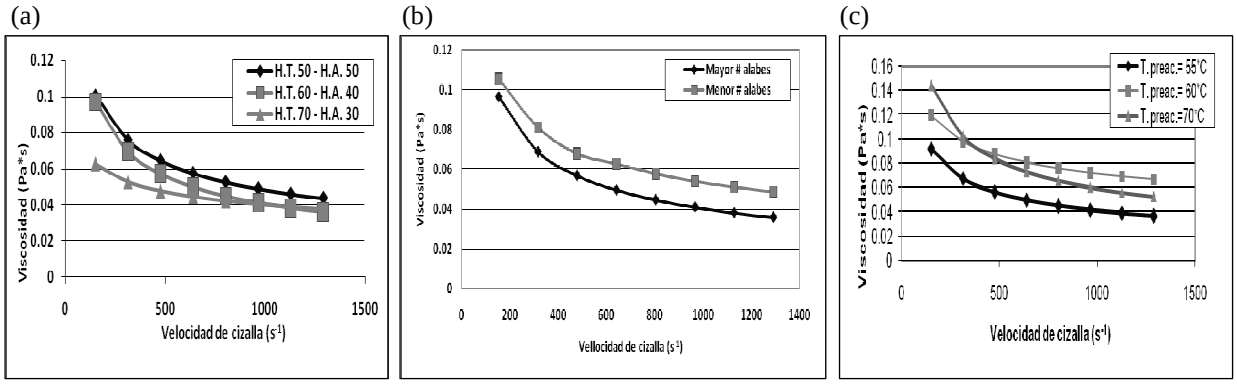
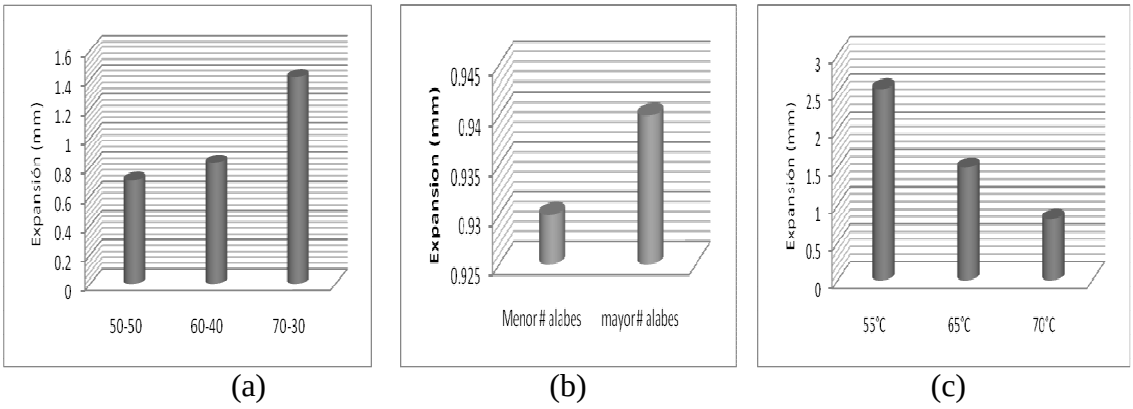


Figura 4. Curvas deViscosidad para las variables estudiadas (a) Formulación (b) Configuración del tornillo y (c) Temperatura de preacondicionamiento.

La temperatura influye directamente sobre la viscosidad y en forma significativa (P= 0,02) (ver **Figura 4b**) esto podría explicarse al porcentaje de gelatinización que alcanzaron los almidones presentes en cada harina, debido que al aumentar la temperatura aumenta el porcentaje de almidón gelatinizado y por lo tanto la viscosidad, en el caso del almidón de trigo la temperatura de gelatinización está entre 58-64 °C (Belitz 1992) en tanto que para el almidón de avena es mayor, lo cual también influye en el grado de hidratación, el grado de rompimiento de los gránulos de almidón y las propiedades desarrolladas.

La viscosidad está influenciada de forma significativa por la temperatura de pre condicionamiento y la mezcla de harinas en la alimentación (P=0,05) en tanto que la configuración del tornillo no influye en esta variable (P= 0,27).



(a) (b) (c)

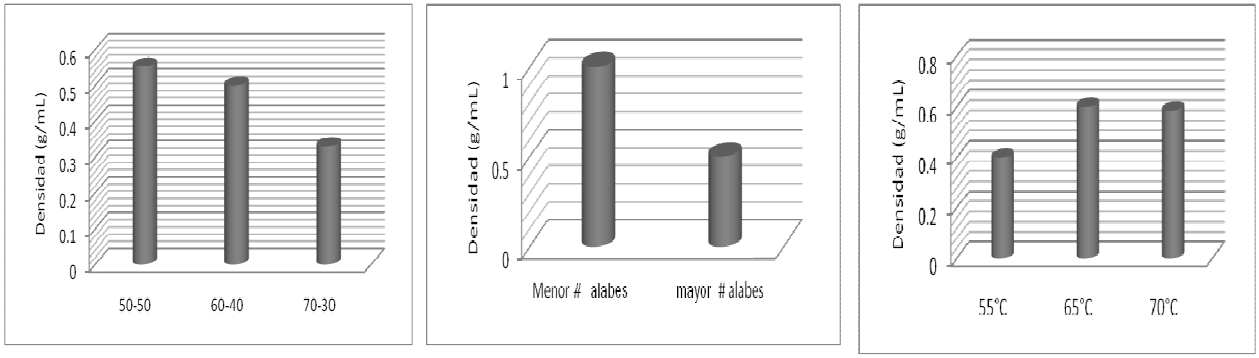
Figura 5. Efecto en la Expansión de las variables estudiadas (a) Formulación (b) Configuración del tornillo y (c) Temperatura de preacondicionamiento

Expansión

En la **figura 5c** se observa que el incremento en la temperatura disminuye la expansión del producto extrudido, en este sentido la temperatura fue la única variable que presentó influencia significativa (P<0,0001) sobre la expansión, en tanto que la proporción de harina en la mezcla de alimentación (P= 0,10) y la configuración del tornillo (P= 0,90) no modifican de manera significativa a esta propiedad. Suponemos que la influencia de la temperatura está relacionada con el grado de gelatinización de los almidones por un lado y por otro si se prolonga el tratamiento térmico y la cizalla, puede surgir una ruptura de los gránulos, hidrólisis parcial y disolución más o menos completa de las moléculas constituyentes, lo que origina un descenso de la viscosidad (Brauna 2003) y con ello presenta una menor cohesividad a la salida de la boquilla lo que limita la expansión.

Densidad volumétrica

La densidad esta mayormente afectada por la configuración del tornillo (P<0,0001) y por la proporción de harinas en la alimentación (P= 0,005). Esta propiedad igual que la anterior está relacionada con la temperatura de gelatinización del almidón en la formulación y con el descenso de la viscosidad debida a la disolución completa del almidón. Como se puede observar en la **figura 6**, mientras más harina de trigo se incorpora a la mezcla y mas número de álabes presenta el tornillo, la densidad disminuye.



(a) (b) (c)

Figura 6. Efecto en la Densidad de las variables estudiadas (a) Formulación (b) Configuración del tornillo y (c) Temperatura de preacondicionamiento.

Tiempo de residencia

El tiempo de residencia es influenciado de manera significativa por las tres variables estudiadas: la temperatura (P= 0,008), la configuración del tornillo (P= 0,02) y la proporción de las harinas en la alimentación (P= 0,03). El aumento de la viscosidad en el granulado repercute directamente sobre el tiempo de residencia debido probablemente al aumento de viscosidad en el granulado, el tornillo sinfín necesita aplicar un mayor esfuerzo para hacer fluir el material.

(a) (b) (c)

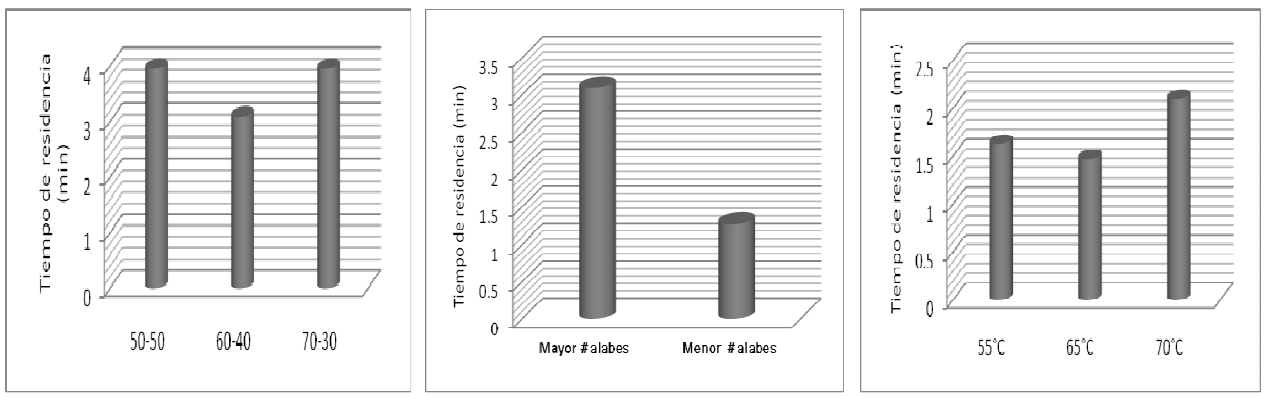


Figura 7. Efecto en el Tiempo de Residencia de las variables estudiadas (a) Formulación, (b) Configuración del tornillo y (c) Temperatura de preacondicionamiento.

CONCLUSIONES

La mayor proporción de harina de trigo presente en la formulación incrementa la expansión mientras que disminuye la viscosidad que presenta el producto final. El número de alabes influye en las características del cereal dado que los almidones se pueden dañar mediante fuerzas mecánicas es decir, y al aumentar el tiempo de residencia del granulado dentro del cilindro, este tuvo mayor cizallamiento.

La temperatura de preacondicionamiento favorece algunas características texturales como la dureza y la fractura, debido a la mayor de interacción del almidón con el agua lo que favorece la gelatinización del almidón.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió apoyo económico por parte de la Comisión de Fomento de Actividades Económicas (COFAA) del Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Belitz H D, Grosch W. 1992. Química de los alimentos. 2ª ed. Zaragoza. Ed. Acribia. pag. 335.

Brauna R O. 2003. Técnicas de procesamiento de granos que mejoran la eficiencia alimentaria en la producción animal. Disponible en: http://www.agronet.com.mx/cgi/articles.cgi. fecha de consulta: enero de 2009.

Choudhury G S, Gautam A. 1999. Screw Configuration Effects on Macroscopic Characteristics of Extrudates Produced by Twin-screw Extrusion of Rice Flour. Journal of Food Science. 64 (3): 479-488.

Ding Q, Ainsworth P, Tucker G, Marson H. 2005. The effect of Extrusion Conditions on the Physicochemical Properties and Sensory Characteristics of Rice-Based Expanded Snacks. Journal of food engineering. 66 (3):283-289.

Farag A, Vasanthan T, Hoover R. 2004. The effect of Extrusion Cooking on Resistant Starch formation in waxy and regular barley flours. Food Research International. 37(5): 517-525.

Fellows Peter. 1994. Tecnología de procesado de los alimentos. Principios y prácticas, Zaragoza. Ed. Acribia S A. pag. 420.

Fernández Gutiérrez J A, San Martín Martínez E, Martínez-Bustos F, Cruz-Orea A. 2004. Physicochemical properties of casein-starch interaction obtained by extrusion process. Starch. 56(5):190-198.

Kent N L. 1983. Technology of Cereals: An introduction for students of food science and agriculture. Oxford. Ed. Pergamon Press Ltd. pag. 350.

Lin S, Huff H E, Hsieh F. 2002. Extrusion Process Parameters, Sensory Characteristics, & Structural Properties of a High Moisture Soy Protein Meat Analog. Journal of food Science. 67(3):1066-1072.

Rafael B. 2009. Los cereales en el mundo: Avena. disponible en: http://cytcereales.blogspot.com/2008/07/los-cereales-en-el-mundo-avena.html, fecha de consulta: enero de 2009.

Robin G. 2002. Extrusión de los Alimentos. Zaragoza. Ed. Acribia. pag. 255.

Uso de enzimas amilolíticas para mejorar las propiedades de masas con alto contenido de almidón dañado

Use of amylolytic enzymes to improve dough properties with high-damaged starch content

Barrera GN (1), Ribotta PD (2), León AE (2)

(1) Ministerio de Ciencia y Tecnología, Subsecretaria CEPROCOR, Córdoba, Argentina.
(2) CONICET- Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
gbarrera@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

Una fracción de los amiloplastos puede ser lesionada durante la molienda produciendo así lo que se domina almidón dañado. El almidón dañado es susceptible a la hidrólisis enzimática y modifica las propiedades de las harinas, principalmente incrementa la absorción de agua, por lo que afecta negativamente las propiedades fisicoquímicas y reológicas de la masa. Las amilasas son ampliamente utilizadas como aditivos para prolongar la vida útil de los panificados y mejorar su textura, al mismo tiempo, es probable ayuden a reducir los problemas que los altos contenidos de almidón dañado producen sobre la calidad de las masas. En este estudio se analizó el efecto de enzimas amilolíticas sobre el comportamiento reológico de masas con diferente contenido de almidón dañado con el objeto de explorar alternativas para reducir los problemas asociados a altos niveles de almidón dañado. Las enzimas utilizadas fueron α-amilasa, amilasa maltogénica y amiloglucosidasa, y mezclas de estas, α-amilasa + amilasa maltogénica, α-amilasa + amiloglucosidasa y α-amilasa + amilasa maltogénica + amiloglucosidasa. El almidón de trigo fue tratado en un molino a disco para aumentar el grado de amiloplastos lesionados. Se prepararon mezclas de almidón:gluten vital (85:15) con 4,1 y 14,2% de almidón dañado, las cuales se amasaron incorporando las enzimas y agua (absorción farinográfica). Las propiedades reológicas de las masas se determinaron mediante ensayos de micro-extensión uniaxial y compresión. La absorción farinográfica aumentó de 60,4 a 74,8 cuando se incrementó el almidón dañado de 4,1 a 14,2%. Paralelamente, la extensibilidad (E) y el trabajo de deformación (área debajo de la curva, A) disminuyeron mientras que la resistencia (Rm) incrementó con el aumento de almidón dañado. En masas con alto contenido de gránulos lesionados el agregado de enzimas causó una disminución del A y Rm. Únicamente los valores de Rm alcanzaron valores similares a los de la masa elaborada con 4,1% de almidón dañado. La capacitancia elástica instantánea (J_0), la capacitancia elástica retardada (J_1) y la deformación máxima (J_{max}) disminuyeron significativamente con el porcentaje de almidón dañado, mientras que la viscosidad newtoniana (η) aumentó. En masas con alto contenido de almidón lesionado, J_0 aumentó significativamente como consecuencia de la adición de enzimas, excepto cuando se utilizó amilasa maltogénica y α-amilasa + amilasa maltogénica + amiloglucosidasa. J_1 sufrió incrementos significativos mientras que η disminuyó con las adiciones enzimáticas, solamente amilasa maltogénica y amiloglucosidasa no modificaron estos parámetros. La incorporación de enzimas modificó positivamente los valores de J_0, J_1 y η, sin alcanzar los encontrados para la masa con menor contenido de almidón dañado. La inclusión de amilasa maltogénica al sistema no causó modificaciones sobre J_{max}, sin embargo todos los demás agregados ocasionaron incrementos en sus valores. Acorde con estos resultados la adición de estas enzimas podría ser utilizada para corregir problemas reológicos generados durante el procesamiento de masas elaboradas con harinas de elevado contenido de almidón dañado.

ABSTRACT

During wheat milling a part of starch granules could be damage. Damage starch is susceptible to enzymic hydrolysis and modifies the water absorption capacity of flour. Thus causes a negative effect on rheological and physicochemical properties of the doughs. Amylases are used to improve the antistaling properties and the texture and flavour of baked goods, at the same time, these enzymes probably could help to reduce the problems causes to presence of damaged starch. In this study was

analyzed the impact of different amylases on rheological behaviour of dough with different levels of damaged starch in order to explore alternatives to reduce the problems related whit high levels of damaged starch. Enzymes used were α-amylase, maltogenic amylase and amyloglucosidase, and blends of them, α-amylase + maltogenic amylase, α-amylase + amyloglucosidase and α-amylase + maltogenic amylase + amyloglucosidase. Unmodified wheat starch was milled in a disc mill in order to cause a greater rupture of starch granules. Two flours were prepared mixing partially damaged wheat starch and vital gluten (85:15 starch:gluten ratio). Flour 1 and flour 2 had 4.1% and 14.2% damaged starch content, respectively. Both flours were mixing with water and the enzymes (farinografic water absorption). The rheological properties of dough were examined using uniaxial extension and compression measurements. The farinografic water absorption incremented from 60.4 to 74.8% when damaged starch content increased. The uniaxial extension parameters were modified by damaged starch content. The extensibility (E) and the area under the curve (A) decreased whereas the maximum resistance (Rm) increased with the increment damaged starch content. The additions of enzymes to high-damaged starch dough (14.2%) produced a decreased of the A and Rm. Only the Rm values increased to reach similar values of the low-damaged starch dough (4.1%). Dough newtonian viscosity (η) increased while and instantaneous (J_0) and retarded compliance (J_1) and the maximum strain (J_{max}) decreased when damaged starch content increased. J_0 increased significantly as consequence of enzymes additions on high-damaged starch dough, except with the incorporation of maltogenic amylase and α-amylase + maltogenic amylase + amyloglucosidase. J_1 increased significantly but η decreased as result of enzyme additions. Only maltogenic amylase and amyloglucosidase didn't alter these parameters. The inclusion of enzymes modified J_0, J_1 and η positively, but the values found didn't reach the values of low-damaged starch dough. Enzyme addition, except maltogenic amylase, increased the dough strain (J_{max}). According to these results adding these enzymes could be used to correct flour deficiencies due to high content of damaged starch.

PALABRAS CLAVE: *almidón dañado, amilasas, masa.*

KEYWORDS: *damaged starch, amylases, dough.*

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de la molienda de los granos de trigo en la obtención de harinas, la integridad de los amiloplastos puede ser afectada, membrana y estructura granular pueden ser dañadas por esta operación produciendo así lo que se denomina almidón dañado. Los niveles de almidón dañado dependen de la dureza de los granos y del tipo y las condiciones 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 (Hoseney 1994). El almidón dañado cambia la estructura granular y polimérica del almidón y esto impacta directamente sobre las propiedades funcionales y reológicas (Faridi 1990). Los gránulos dañados de almidón poseen la capacidad de absorber agua hasta 3 veces más que los gránulos sanos (Bushuk 1998) y las diferentes amilasas degradan en mayor proporción a las moléculas de almidón provenientes de los amiloplastos dañados presentes en la harina. Esto se debe a que la capacidad de degradación de las amilasas depende de la penetración y difusión de las enzimas amilolíticas dentro del amiloplasto, lo que esta directamente relacionado con el grado de hidratación y el estado superficial de la membrana del amiloplasto (Drapon y Godon 1987). La degradación de estas moléculas durante la elaboración de la masa genera glúcidos de menor peso molecular y, en consecuencia, produce modificaciones en la actividad de las levaduras (Bettge *et al.* 1995). En la elaboración de pan, la presencia de un limitado nivel de amiloplastos lesionados es deseable ya que favorece la hidratación de la harina y promueve la fermentación, sin embargo, fracciones mayores afectan las propiedades de las harinas, fundamentalmente, provocan un aumento en la capacidad de absorción de agua (Bushuk 1998), lo que produce masas de difícil manipulación. Las dextrinas generadas por la degradación enzimática afectan la capacidad de retención de agua, la porosidad de la masa y la textura de los productos terminados (Drapron y Godon 1987). Aunque la producción de oligosacáridos representa un aspecto positivo para la actividad amilásica, el efecto negativo de la producción de dextrinas sobre las propiedades reológicas no debe ser descuidado. Varios aditivos son utilizados en las formulaciones de pan con el objeto de prolongar su vida útil, inhibiendo cambios que

conducen al incremento de la firmeza de la miga, mejorando así su calidad. Algunas enzimas son utilizadas en estos propósitos (Spendler y Jørgensen, 1997), siendo las amilasas el grupo de enzimas más populares y aplicadas en la industria panadera. Entre ellas se han empleado α- y β-amilasas y amiloglusidasas (De Stefanis y Turner 1981, Cole 1982, Wursch y Gumy 1994, Vidal y Gerrity 1979). Es probable que este grupo de enzimas, además de prolongar la vida útil de los panificados y mejorar su textura, ayuden a reducir los problemas que los altos contenidos de almidón dañado producen sobre la calidad de las masas.
Con el objeto de explorar alternativas para reducir los problemas asociados a altos niveles de almidón dañado se analizó el efecto de enzimas amilolíticas sobre el comportamiento reológico de masas con diferente contenido de almidón dañado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizaron dos harinas preparadas con diferente contenido de almidón dañado, la harina 1 con 4,1% y la harina 2 con 14,2% de almidón dañado. Las muestras de harina 1 y 2 se prepararon mezclando almidón parcialmente dañado y gluten en una proporción de 85:15 almidón:gluten. Se utilizó almidón de trigo sin modificar y gluten vital para el armado de las harinas.
Para lograr una mayor ruptura de los gránulos de almidón, el almidón de trigo sin modificar fue tratado en un molino a disco Whisper Series Bench Top (Rocklabs, Nueva Zelanda). La determinación del contenido de almidón dañado se llevo a cabo según AACC (2000).
Las harinas obtenidas mezclando gluten y almidón de trigo se amasaron incorporando las enzimas y agua (absorción farinográfica). Las enzimas empleadas fueron α-amilasa (AMI) (Fungamyl 2500SG), amilasa maltogenica (AMIM) (Novamyl 10000BG) y amiloglucosidasa (AMG) (AMG 800BG), y sus mezclas, α-amilasa + amilasa maltogénica (AMI+AMIM), α-amilasa + amiloglucosidasa (AMI+AMG) y α-amilasa + amilasa maltogénica + amiloglucosidasa (AMI+AMIM+AMG).
La dosis de cada enzima utilizada para 30 g de harina se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Dosis de enzimas.

Enzima	**Dosis***
AMI	0,6 mg
AMIM	5 mg
AMG	12 mg

* Dosis enzimáticas para 30 g de harina.

Determinaciones Reológicas

Análisis farinográfico. Las alteraciones en la absorción de agua de los componentes de la masa y las propiedades relacionadas con el proceso de amasado se evaluaron mediante un Farinógrafo Brabender. La consistencia de la masa, medida en Unidades Brabender, es evaluada en función del tiempo durante su formación. La cantidad de agua necesaria para lograr una masa de consistencia ideal es determinada a través de este ensayo. Una curva farinográfica informa acerca de los cambios de las propiedades reológicas durante el amasado.
Determinación de la extensibilidad y resistencia de la masa. Las propiedades reológicas de las masas se determinaron mediante un Analizador de Textura TA.XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido). Se realizaron ensayos de micro-extensión uniaxial, según el método de SMS/Kieffer. Durante este ensayo la masa fue sometida a una fuerza de tracción hasta su ruptura. Para esto, pequeños trozos de masa, de longitud y espesor constante, fueron extendidos a una velocidad constante hasta su ruptura. La fuerza con la cual el material resistió la elongación fue graficada versos la distancia (d) que recorrida durante la elongación. A partir de las curvas se obtuvieron los siguientes parámetros: fuerza máxima (resistencia a la extensión de la masa, Rm), distancia hasta la ruptura (extensibilidad de la masa, E) y el trabajo de deformación necesario para estirar el material hasta su ruptura (área bajo la curva, A).
Determinación de las propiedades viscoelásticas. El carácter viscoelástico de las muestra se evaluó mediante un ensayo de deformación (*creep*) a través de un ensayo de compresión. En este ensayo se aplicó un esfuerzo constante y normal al material durante un intervalo de tiempo, y posteriormente, el

esfuerzo fue removido. La deformación ocasionada en el material durante la aplicación y eliminación de la fuerza es registrada en el tiempo. Los datos de deformación se describieron en términos de la relación entre la deformación y esfuerzo aplicado, capacitancia lineal (J). Para expresar los resultados de deformación derivados del análisis en el TA.XT2i en términos de capacitancia, los datos de deformación se ajustaron usando el modelo en serie propuesto por Kelvin y Maxwell (Modelo de Burgers) a través del software Regressi 2.753. Los ajustes se llevaron a cabo según la siguiente ecuación: $J(t) = J_0 + J_1 (1 – \exp (-t/\lambda ret)$

Donde J_0 es la capacitancia instantánea, J_1 la capacitancia retardada y η la viscosidad newtoniana. J_0 está relacionada con las propiedades elásticas del material, J_1 simboliza la elasticidad asociada al elemento viscoelástico del modelo y η está vinculado con las propiedades viscosas. La deformación máxima J_{max} alcanzada por el material también fue analizada ya que está asociada a la rigidez de la matriz.

Análisis Estadístico

Todos los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de la varianza y comparados a través del test de LSD Fisher con un nivel de significancia de 0,05, en ambos casos se empleo el software estadístico INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El agua incorporada a una harina durante la etapa de mezclado y amasado impacta sobre la dispersión, disolución e 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 de la masa viscoelástica. El análisis farinográfico reveló un aumento de 60,4 a 74,8 en la absorción de agua cuando se incrementó el contenido de almidón dañado de 4,1 a 14,2%. Este fenómeno coincide con los resultados publicados por Bushuk (1998). Los amiloplastos lesionados tienen la capacidad de hidratarse con mayor facilidad durante la elaboración de la masa y poseen una capacidad de retención de agua mayor que los gránulos sanos. El almidón de trigo puede absorber entre un 39 y un 87% de su peso en agua mientras que los gránulos dañados de almidón entre un 200 y 430% (Berton B *et al.* 2002*).* La capacidad de absorción de agua de una harina en general define su calidad y aptitud para formar una masa viscoelástica, por lo tanto la hidratación de una harina es crucial en la elaboración de una masa ya que afecta las propiedades funcionales y la calidad de los productos panaderos.

El tiempo de desarrollo de la masa aumentó de 3,3 a 6,3 min cuando el contenido de almidón dañado incrementó de 4,1 a 14,2%. El tiempo de desarrollo de la masa aumentó de 3,3 a 6,3 min cuando el contenido de almidón dañado incrementó de 4,1 a 14,2%. Las proteínas del gluten necesitan de agua para desarrollar una red elástica y cohesiva, el agua es esencial durante este proceso; lo que indica que el almidón dañado interfiere en la hidratación de las proteínas del gluten incrementando el tiempo necesario para lograr una consistencia de 500 UB.

Por otro lado la estabilidad disminuyó y el grado de ablandamiento aumentó con el contenido de gránulos lesionados, mostrando la pérdida de la tolerancia al amasado provocada por el almidón dañado. La red de gluten requiere de agua para su formación, la presencia de almidón dañado podría disminuir la cantidad de agua disponible para el óptimo desarrollo del gluten durante el amasado, explicando la tolerancia al amasado en estas harinas.

En la **Tabla 2** puede observarse el efecto de la cantidad de almidón dañado y la incorporación de enzimas sobre el perfil reológico de las masas. La resistencia y elasticidad de las masas fueron afectadas significativamente por el incremento de amiloplastos lesionados. El aumento en la cantidad de gránulos lesionados ocasionó un incremento de los valores de Rm y una disminución de E, lo que produjo masas más resistentes a la deformación y menos extensibles. Este efecto puede observarse claramente en la **Figura 1**, donde se presenta las gráficas de fuerza versus distancia (extensión uniaxial) de las masas elaboradas con la harina 1 y 2.

Con respecto al efecto de las enzimas, ningún agregado a la harina con menor contenido de almidón dañado consiguió modificar significativamente el trabajo de deformación necesario para estirar el material hasta su ruptura, sin embargo, todas las enzimas disminuyeron significativamente la extensibilidad. La resistencia a la ruptura de la masa aumentó a partir de las incorporaciones enzimáticas a excepción del agregado de AMI+AMIM, el cual no mostró cambios.

Tabla 2: Efectos del contenido de almidón dañado y la incorporación de enzimas sobre los parámetros de micro-extensión uniaxial. Resistencia máxima a la extensión (Rm), Extensibilidad del material (E) y trabajo de deformación (A).

Muestras	Rm (g)		E (mm)		A (g mm)	
	Harina 1	Harina 2	Harina 1	Harina 2	Harina 1	Harina 2
Control	46,3	64,7	21,6	17,3	788,7	692,1
AMI	86,4	48,1	15,0	17,6	657,5	570,3
AMIM	66,4	40,5	17,8	18,8	786,2	529,0
AMG	85,8	41,8	18,5	16,2	946,8	582,8
AMI+AMIM	55,8	47,7	17,3	15,7	808,3	488,0
AMI+AMG	94,9	43,5	14,4	18,5	934,8	472,2
AMI+AMIM+AMG	89,7	42,4	15,2	17,1	730,9	584,1

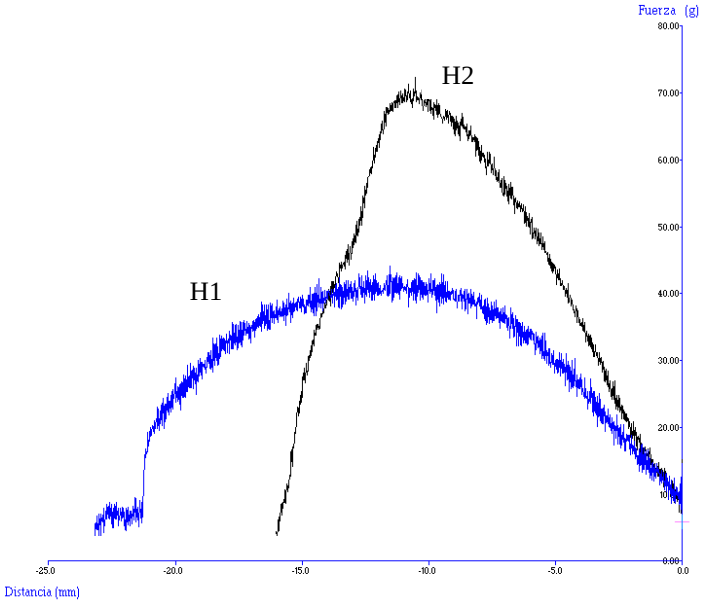


Figura 1: Efectos del contenido de almidón dañado sobre los parámetros de micro-extensión uniaxial.

Los incrementos en Rm hallados en las masas elaboradas con harina con alto contenido de amiloplastos lesionados (14,2%) lograron ser disminuidos por el agregado de las enzimas. En todos los casos Rm se redujo alcanzando valores similares a los de la masa control elaborada con la harina de menor nivel de almidón dañado (4,1%). La adición de enzimas amilolíticas produjo una disminución del trabajo de deformación (A) para estirar la masa hasta su ruptura, mientras que no afectó la extensibilidad de la masa.

Las gráficas de la deformación (distancia: altura de la muestra) versus el tiempo durante el ensayo de viscoelásticidad de las masas producidas con la harina control 1 y 2 se presentan en la **Figura 2**. Las curvas muestran la gran diferencia de comportamiento viscoelástico cuando estas masas fueron sometidas a un esfuerzo constante y normal durante un intervalo de tiempo, y posteriormente, el esfuerzo fue removido. Las masas con mayor contenido de almidón dañado sufrieron menor deformación frente al mismo esfuerzo que las masas con menor contenido de almidón dañado, pese a la diferencia de la cantidad de agua agregada.

Los resultados del análisis viscoelástico indicaron que η, J_0, J_1 y J_{max} fueron afectadas por el incremento en el nivel de gránulos lesionados (**Tabla 3**). Se observó un aumento de η y una disminución de J_0, J_1 y J_{max}. La caída de J_0 y J_1 estuvieron asociadas con la pérdida de elasticidad de la masa, mientras que, el crecimiento del parámetro η reflejó el aumento en la viscosidad de la mezcla, y

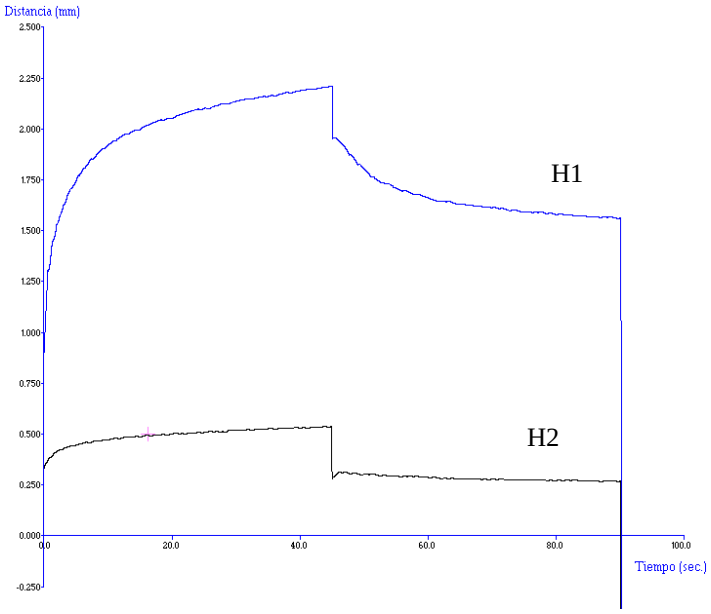


Figura 2: Efectos del contenido de almidón dañado sobre el perfil viscoelástico de las masas elaboradas con harina control 1 y 2.

Tabla 3: Incidencia del% AD y enzimas sobre los parámetros Creep. Complianse Instantánea (J_0), Complianse Retardada (J_1), Viscosidad Newtoniana (η) y Deformación Máxima (J_{max}).

Muestras	J_0 (Pa^{-1}) x 10^{-05}		J_1 (Pa^{-1}) x 10^{-05}		η (Pa.s) x 10^{06}		J_{max} (Pa^{-1}) x 10^{-05}	
	Harina 1	Harina 2	Harina 1	Harina 2	Harina 1	Harina 2	Harina 1	Harina 2
Control	7,2	2,4	7,5	1,3	1,8	6,6	0,17	4,4
AMI	5,8	4,4	5,9	2,9	2,1	3,8	0,14	8,6
AMIM	6,3	2,2	6,5	1,2	1,8	7,0	0,15	4,1
AMG	5,7	3,8	5,8	1,5	2,3	6,6	0,14	6,0
AMI+AMIM	5,9	4,2	6,6	3,8	1,9	3,3	0,15	9,3
AMI+AMG	5,7	4,7	5,8	3,1	2,3	4,0	0,13	9,0
AMI+AMIM+AMG	5,0	3,2	5,3	2,2	2,5	4,7	0,12	6,3

por lo tanto, una mayor resistencia a fluir. Debido a que masas de mayor consistencia muestran una menor deformación frente a la aplicación de un esfuerzo que las masas más débiles, se puede afirmar que el aumento del almidón dañado incrementó la consistencia de las masas, como pudo observarse por los cambios en J_{max}.

Las enzimas adicionadas a la harina con menor contenido de almidón dañado disminuyeron significativamente J_0 respecto a la harina control. Asimismo, los agregados disminuyeron J_1 y aumentaron η, a excepción de AMIM y AMI+AMIM, las cuales no modificaron estos parámetros.

La inclusión de enzimas a la harina con mayor porcentaje de gránulos lesionados logró disminuir el valor de η y aumentar el de J_1, a excepción de AMIM y AMG que no afectaron los registros hallados con respecto al control de la harina 2. Los valores de J_0 aumentaron, excepto cuando se utilizó AMIM y AMI+AMIM+AMG. El valor de J_{max} aumentó por la incorporación de enzimas a la harina, a excepción de AMIM.

CONCLUSIÓN

En general, el aumento de almidón dañado incrementó la cantidad de agua necesaria para desarrollar la masa y disminuyó su estabilidad durante al amasado. Asimismo, el incremento en la cantidad de gránulos lesionados ocasionó un aumento de la resistencia y una disminución de la extensibilidad de la masa, también una pérdida de elasticidad y una mayor resistencia a fluir de la masa.

Los efectos de la incorporación de enzimas amilolíticas sobre las propiedades reológicas de las masas estuvieron relacionados con el contenido de almidón dañado. En general, las enzimas utilizadas lograron modificar positivamente estas propiedades, lo que posibilita su utilización como correctores de harinas con elevadas cantidades de almidón dañado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC. Ninth Edition. The Association. 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.

Bettge AD, Morris CF, Greenblatt GA. 1995. Aseessing genotypic sofness in single wheat kernel using starch granule – associated friabilin as a biochemical marker. Euphytica 86:65–72.

Bushuk W. 1998. Interactions in wheat doughs. En: Interactions the key to cereal quality (Hamer & Hoseney eds.) American Association of cereal chemists. Inc. St Paul MN, USA, 1–16.

Cole MS. 1982. Antistaling baking composition. Patent Application US4320151.

De Stefanis VA, Turner EW. 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.

Drapron R, Godon B. 1987. Role of enzymes in baking. In: Enzymes and their role in cereal technology (Kruger, Lineback and Stauffer eds.) St Paul MN, USA, 281–324.

Faridi, H. 1990. Applications of rheology in the cookies and cracker industry, in *Dough Rheology and Baked Product Texture*, ed. By Faridi H and Faubion JM. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, pp. 363-384.

Hoseney, RC. 1994. Dry Milling of cereal. En: Principles of cereal science and technology 2nd Ed. American Association of cereal chemists. Inc. St Paul MN, USA, 125-145.

Spadler T, Jørgesen O. 1997. Use of a branching enzyme in baking. Patent application WO 97/41 736.
Vidal FD, Gerrity AB. 1979. Antistaling agent for bakery products. Patent application US4160848.

Wursch P and Gumy D. 1994. Inhibition of amylopectin retrogradation by partial beta amylolysis. Carbohydrate Research 256:129–137.

Características fisicoquímicas y disponibilidad de minerales de texturizados de soja fortificados con hemoglobina bovina.

Physicochemical characteristics and mineral availability from texturized soy fortified with bovine hemoglobin

Birocco MJ, Caballero MS, Drago SR*, De Greef DM, Torres RL, González RJ

Instituto de Tecnología de Alimentos – FIQ-UNL, 1º de Mayo 3250, Santa Fe, Argentina; *CONICET
e- mail: sdrago@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

Es sabido que la composición del alimento tiene poca influencia en la absorción del Fe-hem mientras que afecta en gran medida la absorción del Fe no-hem. Sin embargo, hay poca información respecto a la disponibilidad de hierro hemínico en productos no cárnicos fortificados con hemoglobina. El objetivo fue evaluar las características fisicoquímicas y disponibilidad de minerales de texturizados de soja fortificados con hemoglobina bovina con el agregado o no de promotores de la absorción del Fe. Los texturizados se elaboraron con harina de soja desgrasada, con agregado o no de 0,5% de hemoglobina bovina y promotores de la absorción del Fe (Na_2EDTA y Citrato de sodio). Las características físicas evaluadas fueron el Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM), la pérdida de sólidos solubles e insolubles en la cocción y la absorción de agua. La disponibilidad del Fe y del Zn (DFe% y DZn%) se estimó mediante la técnica de dializabilidad, que mide el mineral dializado luego de una doble digestión que simula los procesos fisiológicos. Se observó que la adición de Citrato a la soja tendió a dar valores de CEEM bajos como consecuencia del aumento del caudal de sólidos a la salida del extrusor. La muestra con agregado de hemoglobina y EDTA fue la que presentó menor pérdida de sólidos solubles. Por otro lado, las muestras con agregado de ambos promotores y la muestra con hemoglobina y citrato fueron las que presentaron mayor cantidad de pérdidas de insolubles y las que absorbieron mayor cantidad de agua. La DFe% y la DZn% de la soja texturizada fueron bajas, pero mejoraron con el agregado de Citrato o EDTA. La adición de hemoglobina al texturizado de soja no modificó la DFe% y la DZn% con respecto al control. Además el agregado de promotores de la absorción a la muestra con hemoglobina sólo produjo un ligero incremento en la DFe% y no tuvo efecto en la DZn%. Se podría concluir que las muestras que tuvieron adicionado Citrato como promotor perdieron mayor cantidad de sólidos (solubles e insolubles) probablemente como consecuencia de una ineficiente texturización. Por otra parte, el agregado de hemoglobina al texturizado de soja no presentó ninguna ventaja desde el punto de vista de la disponibilidad de minerales.

ABSTRACT

It is known that food composition have little influence on heme-iron absorption but have an important influence on non-heme iron absorption. However, there is scarce information about heme-iron availability from non-meat foods fortified with hemoglobin. The objective of this work was to evaluate physicochemical characteristics and iron and zinc availability from texturized soy products fortified with bovine hemoglobin and enhancers of iron absorption. Extrudates were obtained using defatted soy flour and mixed or not with bovine hemoglobin and enhancers of iron absorption (Na_2EDTA y Sodium Citrate). The physical characteristics evaluated were: specific consumption of mechanical energy (CEEM), the loss of soluble and insoluble solids on cooking and water absorption. The iron and zinc availability were estimated by the dializability method which measures the dialyzated mineral after a double digestion simulating physiological processes. The addition of Citrate produced low values of CEEM due to the increase of solid flow on the extruder output. The sample with hemoglobin and EDTA showed the lowest loss of soluble solids. On the other hand, the samples with EDTA, Citrate and hemoglobin - Citrate showed the highest loss of insoluble solids and water absorption. The iron and zinc dializability of textured soy was low, but increased with the addition of Citrate or EDTA. The addition of hemoglobin to textured soy did not modify the iron and zinc

dializability respect to the control. Also the additions of enhancers at hemoglobin samples did not have effects on iron and zinc dializability. It is necessary to pointed out that the sample with Citrate had the highest loss of solids (soluble and insoluble) due to a deficient texturizing process. Also, the addition of hemoglobin to texturized soy showed no advantages respect to minerals availability.

PALABRAS CLAVE: *hemoglobina, disponibilidad de minerales, hierro, zinc, soja texturizada*

KEYWORDS: *hemoglobin, availability, iron, zinc, texturized soy*

INTRODUCCIÓN

Las deficiencias de Fe y Zn son comunes no sólo en países subdesarrollados, donde la dieta está basada en el consumo de cereales y tubérculos, sino también en algunos países desarrollados. Se estima que alrededor de la mitad de la población mundial consume una cantidad insuficiente de Fe y Zn (King 2000). Los principales factores alimentarios causantes de estas deficiencias son el pobre contenido de estos minerales en los alimentos, su baja biodisponibilidad, o ambas, relacionadas a las dietas basadas en cereales y tubérculos que son típicamente consumidas en muchos países de bajos ingresos (Mendoza *et al.* 2001).

La anemia por deficiencia de Fe retrasa el desarrollo mental y psicomotor en niños, incrementa la morbilidad y la mortalidad de madres e hijos en el parto, disminuye el rendimiento laboral en adultos y afecta la resistencia a las infecciones (King 2000, Stevent 2004). Es crítica durante periodos de crecimiento, cuando los requerimientos y/o pérdidas son elevados. Por estas razones, los grupos vulnerables para desarrollar deficiencia de Fe y anemia son los infantes, adolescentes, mujeres en edad reproductiva y mujeres embarazadas (García-Casal *et al.* 2003).

Una de las estrategias para combatir la deficiencia de Fe es la fortificación de alimentos básicos, que además de ser la más económica, tiene la ventaja de no requerir modificaciones en los hábitos alimenticios (García-Casal *et al.* 2003, Mendoza 2001). Consiste en la adición de micronutrientes esenciales a los alimentos (Blum 1997) en un nivel superior al que habitualmente contienen.

Un factor importante en la fortificación es la selección de la fuente del mineral, que debe estar basada en su biodisponibilidad, en sus efectos físico-químicos sobre el alimento y el costo (Nelson y Potter 1979, Mendoza *et al.* 2001, García-Casal *et al.* 2003)

Otra estrategia importante para incrementar el aporte de minerales intrínsecos de los alimentos o de fortificación es incorporar sustancias que actúan como promotoras de la absorción o eliminar sustancias que actúan como inhibidores (Gibson *et al.* 1998).

La biodisponibilidad puede ser definida como la proporción de un nutriente en una dieta o alimento dado, que es absorbido y utilizado por el cuerpo. Ello depende de que el nutriente se encuentre presente en la dieta en una forma química que pueda ser transportada a través de la mucosa, o que tras su digestión pueda ser absorbido de forma que pueda ser utilizado en el metabolismo normal. (Martínez *et al.* 1999, Benito y Miller 1998).

La absorción del Fe de las comidas varía considerablemente. Existen dos tipos de Fe en los alimentos, el Fe no hemínico presente tanto en alimentos vegetales como en los tejidos cárnicos y el Fe hemínico proveniente de la hemoglobina y de la mioglobina de productos de origen cárnico. Es sabido que la composición del alimento tiene poca influencia en la absorción del Fe-hem mientras que afecta en gran medida la absorción del Fe no-hem. Sin embargo hay poca información respecto a la disponibilidad de hierro hemínico en productos no cárnicos fortificados con hemoglobina.

La soja se destaca entre los cultivos de leguminosas tanto por su contenido proteico como por su calidad nutritiva, ya que contiene un buen perfil aminoacídico. Las principales características de la soja como fuente de proteína son su gran producción mundial, su costo relativamente bajo y las propiedades funcionales y nutritivas debidas a su alto contenido de aminoácidos esenciales, particularmente lisina, leucina e isoleucina. Su valor nutricional se ha estudiado ampliamente, presentando una buena digestibilidad, aunque menor que la de proteínas animales como la carne, huevos y leche (De la Mella y Moya Cribeiro 2007). Si bien contiene un alto contenido de minerales, su biodisponibilidad puede resultar baja debido a la presencia de inhibidores de la absorción.

El texturizado de soja se obtiene a partir de la harina desgrasada mediante un proceso de extrusión termoplástico, en el cual además se inactivan los factores anti-nutricionales presentes en la soja. Los texturizados tienen igual composición que la harina pero con una textura masticable y semejante a la

estructura fibrilar de la carne, con buena capacidad de retención de agua y de grasa, lo que confiriere una textura agradable y típica de carne a los productos donde se emplea (De la Mella y Moya Cribeiro 2007).
El objetivo de este trabajo fue evaluar las características fisicoquímicas y la disponibilidad de minerales de texturizados de soja fortificados con hemoglobina bovina con el agregado o no de promotores de la absorción del Fe.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias Primas

Para la obtención de los texturizados de soja se utilizó harina de soja desgrasada proveniente de granos de soja variedad Don Mario 2005 sin inactivar y hemoglobina bovina provista por la empresa Yeruvá, Esperanza.
Los granos de soja fueron acondicionados a una humedad del 12%, antes de proceder a la laminación, la cual se realizo utilizando un molino de rolos. Los granos laminados fueron tratados con hexano para la extracción de aceite. Las etapas de extracción de aceite y desolventización (al aire), se realizaron en el extractor disponible en la planta piloto del ITA. Las escamas desgrasadas y desolventizadas fueron reducidas a tamaño de sémola (entre 0,2 y 1,2 mm).

Proceso de Extrusión

Para la obtención de los texturizados de soja se prepararon las mezclas con y sin agregado de hemoglobina.
La elección del nivel de agregado de hemoglobina se basó en ensayos previos que se realizaron para evaluar tanto la operatividad del extrusor, como las características sensoriales de los productos, dentro del rango de 0,25-5% de reemplazo.
Además, se agregó Na_2EDTA o citrato de sodio como promotores de la absorción de hierro. El EDTA se agregó en relación molar 1:1 Fe: EDTA y el citrato en relación molar Fe: citrato 1:50.

Las muestras obtenidas y sus códigos fueron las siguientes:

- Texturizado de soja: Soja
- Texturizado de soja con agregado de Na_2EDTA: Soja+EDTA
- Texturizado de soja con agregado de citrato: Soja+C
- Texturizado de soja: hemoglobina (95,5: 0,5): Soja+Hb
- Texturizado de soja: hemoglobina (95,5: 0,5) con agregado de Na_2EDTA: Soja+Hb+EDTA
- Texturizado de soja: hemoglobina (95,5: 0,5) con agregado de citrato: Soja+Hb+C

Para la obtención de los texturizados se utilizó un extrusor Brabender 20 DN (Alemania) con un tornillo de relación de compresión 4:1, boquilla de 5 mm de diámetro y 20 mm de longitud. La humedad de la harina fue de 25% y la temperatura del tratamiento se fijó entre 160-180 *ºC*.
Las muestras se acondicionaron 1 hora antes del ensayo, al nivel de humedad establecido, en la etapa de mezclado.

Cálculo del Consumo Específico de Energía Mecánica

Durante el proceso de extrusión se registró el torque (momento torsor cuyo valor se obtiene del registro durante la extrusión, en unidades Brabender) y el caudal másico de salida del extrusor. Con estos datos y la velocidad de rotación del tornillo (rpm) se calculó el Consumo Específico de Energía mecánica (CEEM), según la siguiente fórmula:

$$CEEM\ (Joule/g) = (K \times T \times N) / Q_{ss}$$

Donde K es $61{,}3.10^{-3}$, T es el momento torsor (Unidades Brabender), N es la velocidad de rotación del tornillo (rpm) y Q_{ss} es el caudal referido a base seca (g/min).

Evaluacion de la disponibilidad y de las características fisicoquímicas de los texturizados

Los productos texturizados se evaluaron de acuerdo a los requerimientos para su utilización como sucedáneo de carne picada.
Evaluación de la disponibilidad de minerales. La disponibilidad del hierro (DFe%), del zinc (DZn%) y del calcio (DCa%) fue evaluada en las muestras utilizando la técnica de dializabilidad de Miller *et al.* (1981) modificada por Wolfgor *et al.* (2002), que mide el porcentaje de mineral dializado luego de una digestión enzimática que simula los procesos gastrointestinales. La disponibilidad de minerales se calculó como:

$$\%\ \text{Mineral dializado} = (\text{mg Mineral} / \text{mg Mineral en la muestra}) \times 100$$

Determinación de minerales totales. Para determinar la concentración de minerales (Fe, Ca y Zn) la muestra se llevó a mufla a 550 *ºC* durante 4 horas. Las cenizas fueron levantadas con 10 ml de HCl 10% (v/v). Luego se midió el contenido de minerales por espectroscopia de absorción atómica. Para determinar Ca se utilizó cloruro de lantano a una concentración final de 0,2% a fin de minimizar el efecto de los fosfatos.

Determinación de la pérdida de sólidos durante la cocción (ST) y de la absorción de agua (AA). Las muestras se sometieron a una hidratación en agua hirviente, con una relación agua/muestra, 10/1, durante 30 minutos y posteriormente se evaluó su absorción de agua y la pérdida de sólidos.

Para la determinación de la absorción de agua (AA), una vez realizada la cocción se drenó el líquido en un tamiz de 40 mesh (0,42 mm) con el fin de retener los texturizados que se pesaron y luego se colocaron en estufa a 105 *ºC* hasta pesada constante, para obtener el valor de la cantidad de agua retenida por la muestra hidratada. Luego se procedió al cálculo según:

$$\text{Abs. Agua (g agua /g sólidos)} = (P_{mh} - P_{ms})/ P_{ms}$$

Donde:

P_{mh} el es peso de la muestra hidratada luego de la cocción.

P_{ms} es el peso de la muestra seca.

El líquido drenado se utilizó para cuantificar la pérdida de sólidos solubles e insolubles. Para ello el líquido se trasvasó a tubos que se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos. Luego, tanto el líquido sobrenadante que se transfirió a cápsulas, como los tubos conteniendo el pellet de los sólidos insolubles, se llevaron a estufa durante 24 h a 105 *ºC*. Para calcular las pérdidas de los sólidos se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Sólidos Solubles Totales (g sólidos /100 g)} = (S_{ss} / M_{bs}) \times 100$$

$$\text{Sólidos Insolubles Totales (g sólidos /100 g)} = (S_{is} / M_{bs}) \times 100$$

Donde:

S_{ss} es el peso de sólidos solubles luego del secado en estufa a 105 *ºC*.

S_{is} es el peso de sólidos insolubles luego del secado en estufa a 105 *ºC*.

M_{bs} el peso de muestra original en base seca.

Análisis estadísticos

Para establecer diferencias entre muestras se realizó test de ANOVA, seguido por el test LSD (*least significant difference*) para comparar medias al 95% de confianza. Se utilizó el programa Statgraphics plus 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM)

En la **Tabla 1** se muestran los resultados del momento torsor, el caudal másico y el CEEM correspondientes a las distintas muestras de texturizados de soja. El ANOVA mostró que existen diferencias significativas entre las muestras para un nivel de confianza del 95% ($p<0,0103$). Como se puede observar la muestra soja fue la que presentó mayor CEEM y la muestra Soja+Hb+C, el menor valor. De esto se desprende que la adición de citrato a las muestras tiende a disminuir el CEEM como consecuencia del aumento del caudal de sólidos a la salida del extrusor, es decir que dichas muestras tienen menor tiempo de residencia dentro del equipo.

Tabla 1: Resultados del proceso de extrusión de los texturizados de soja. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p< 0,05$) entre las muestras.

Muestras	Momento Torsor (UB)	Caudal másico de salida (gr/min)	CEEM (Joule/gr)
soja	1950 ± 70	46,5 ± 2	[a] 383,8 ± 3,6
soja+EDTA	1950 ± 70	49,5 ± 2	[ab] 360,5 ± 2,4
soja+C	1900 ± 140	54 ± 1	[bc] 322,4 ± 32,5
soja+Hb	1800 ± 141	48,5 ± 2	[b] 339,3 ± 11,8
soja+Hb+EDTA	1825 ± 35	49 ± 1	[b] 340,8 ± 3,2
soja+Hb+C	1775 ± 106	57,5 ± 1	[c] 282,6 ± 20,4

Estos resultados indican que el agregado tanto de Hb como de los aditivos EDTA y citrato, reducen el nivel de fricción, es decir, actúan como lubricantes.

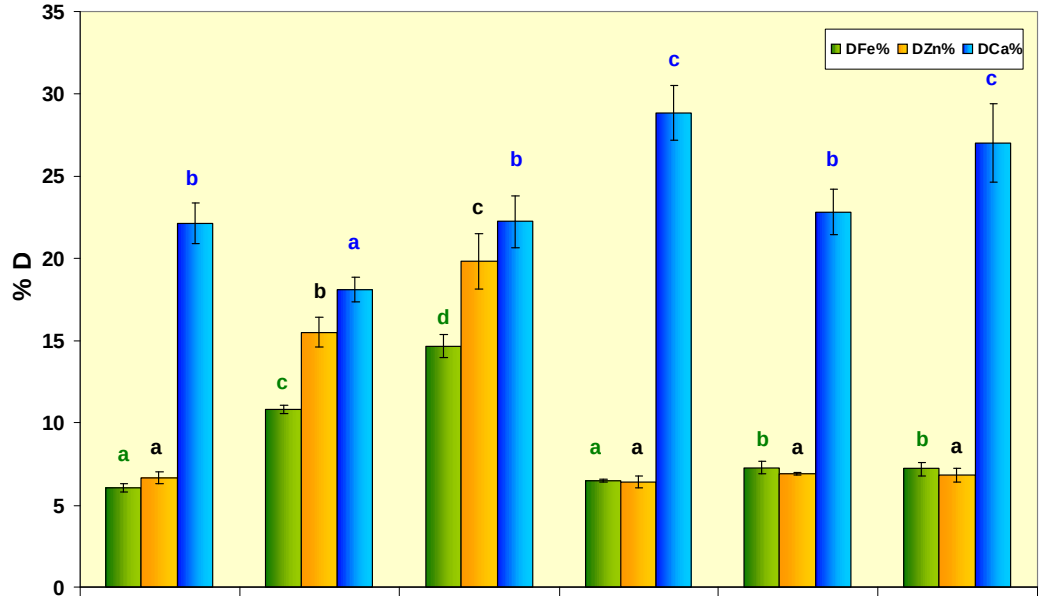
Dializabilidad de Fe, Zn y Ca de texturizado

En la **Figura 1** se muestra la dializabilidad del Fe, Zn y Ca (DFe%, DZn%, DCa%) de texturizados de soja, con el agregado de promotores EDTA o citrato de sodio (C) o/y hemoglobina bovina (Hb).

La DFe% de la soja texturizada fue baja (6%). La soja es una rica fuente de hierro, zinc y calcio (Liener 1972). Sin embargo, la biodisponibilidad del hierro se ve marcadamente reducida, no sólo debido al efecto de la misma proteína (Lynch *et al.* 1994), sino también por su alto contenido de fitatos (inositol hexa-fosfato) (Cook *et al.* 1981, Hallberg y Rossander 1982, Hurrell *et al.* 1992).

Se puede observar que tanto el agregado de Citrato o EDTA mejoraron la DFe% de los texturizados de soja. South y Miller (1998) también observaron que el efecto de los inhibidores puede ser minimizado por el agregado de promotores de la absorción adecuados tales como el Na_2EDTA y el ácido cítrico.

El agregado de hemoglobina al texturizado de soja no modificó la DFe% con respecto al control. Además, el agregado de promotores a la muestra con hemoglobina sólo produjo un ligero incremento en la disponibilidad del hierro.



	Soja	Soja + EDTA	Soja + C	Soja+Hb	Soja+Hb+EDTA	Soja+Hb+C
DFe%	6,05	10,84	14,69	6,48	7,26	7,19
DZn%	6,66	15,49	19,83	6,41	6,91	6,81
DCa%	22,11	18,09	22,24	28,83	22,79	27,00

Figura 1: Dializabilidad del Fe, Zn y Ca (DFe%, DZn%, DCa%) de texturizados de Soja, con el agregado de promotores: EDTA o citrato de sodio (C) o/y hemoglobina bovina (Hb)

Con respecto a la DZn%, al igual que en el caso del Fe, también resultó baja (6%). Los fitatos también ejercen un efecto inhibitorio en la absorción del zinc (Lönnerdal *et al.* 1988, Fairweather–Tait 1992) y de calcio (Greger 1989). Algunos autores han observado que los fitatos pueden ser degradados por el proceso de extrusión en distinta extensión según sean las condiciones del proceso (Ummadi *et al.* 1995, Abd El-Hady y Habiba 2003), liberando fosfatos y generando inositol pentafosfato y formas con menor contenido de fósforo. Los verdaderos responsables de la acción inhibitoria sobre la absorción de minerales son las formas de inositol con 6 y 5 grupos fosfatos (Sandberg y *et al.* 1989).

La DZn% se incremento al adicionar los promotores EDTA o citrato a la muestra, observándose para este último la mayor DZn%. La adición de Hemoglobina no afectó la DZn% respecto al control, pero en presencia de hemoglobina, el EDTA y el citrato no ejercieron su efecto promotor sobre el zinc.

Con respecto al calcio, se puede observar que el agregado de EDTA disminuyó ligeramente la DCa% y que el citrato no tuvo efectos en la muestra de soja texturizada. El agregado de hemoglobina mejoró la DCa% respecto al control. De los dos promotores evaluados en presencia de hemoglobina, el EDTA disminuyó la DCa%, mientras que el citrato no la afectó.

Determinación de la pérdida de sólidos durante la cocción (ST) y de la absorción (AA)

En la **Figura 2** se observan los valores obtenidos de la pérdida de sólidos solubles (SS). El ANOVA indicó que existen diferencias significativas para un nivel del 95% ($p<0,0042$). En la misma se observa que los texturizados con la adición de los promotores (soja+EDTA y soja+C) tendieron a presentar mayores pérdidas de SS durante la cocción respecto a la muestra control (soja), siendo el texturizado con citrato el que presentó mayor pérdida de SS. Para las muestras con agregado de hemoglobina, la muestra que tuvo menor pérdida de SS fue soja+Hb+EDTA y la muestra soja+Hb+C es la que mayor valor presentó de este grupo.

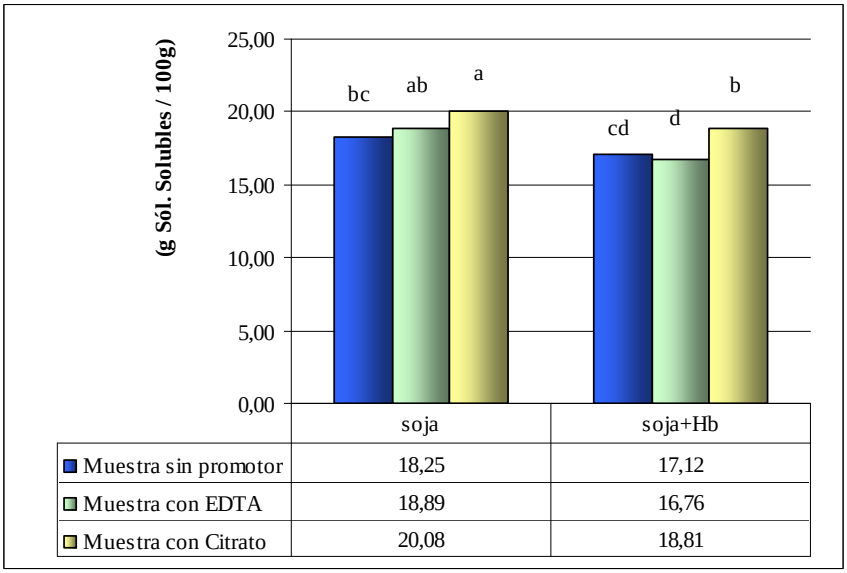


Figura 2: Pérdida de sólidos solubles (SS) durante la cocción de los texturizados. Soja: texturizado de soja desgrasada; soja+Hb: texturizado de soja desgrasada + 0,5% de hemoglobina. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras.

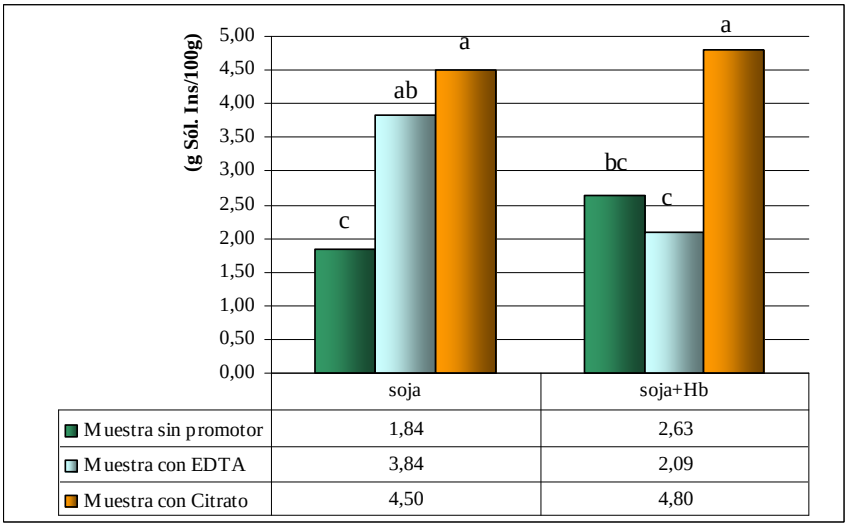
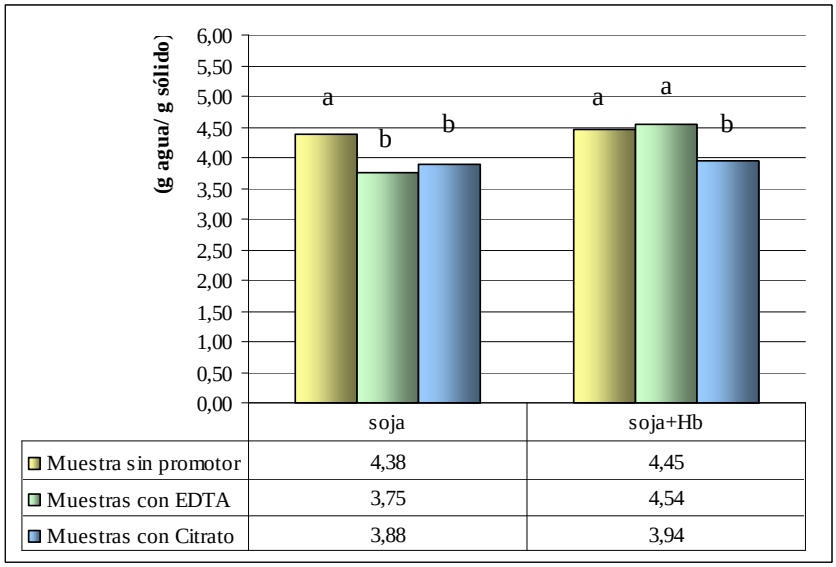


Figura 3: Pérdida de sólidos insolubles durante la cocción de los texturizados. Soja: texturizado de soja desgrasada; soja+Hb: texturizado de soja desgrasada + 0,5% de hemoglobina. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras.

En la **Figura 3** se puede observar la pérdida de sólidos insolubles (SI) durante la cocción. El análisis del ANOVA mostró que existen diferencias significativas ($p<0,0035$) para un nivel del 95%. El agregado de EDTA y citrato a los texturizados (soja+EDTA y soja+C) produjo un aumento en la pérdida de SI. Por otro lado, en las muestras con agregado de Hb, las muestras soja+Hb y soja+Hb+EDTA no presentaron diferencias significativas con respecto al control (soja). Pero en

cambio, la muestra soja+Hb+C fue la que presentó mayor cantidad de SI y se comportó de igual manera que las muestras con agregado de promotores solamente. Estos resultados indican que la adición de promotores tendió a debilitar el grado de texturización (mayor pérdida de sólidos durante la cocción), aunque es el citrato el que produce el mayor efecto.



	soja	soja+Hb
Muestra sin promotor	4,38	4,45
Muestras con EDTA	3,75	4,54
Muestras con Citrato	3,88	3,94

Figura 4: Absorción de agua (AA) de los texturizados. Soja: texturizado de soja desgrasada; soja+Hb: texturizado de soja desgrasada + 0,5% de hemoglobina. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras.

En la **Figura 4** se muestra el comportamiento de las muestras texturizadas con respecto a la absorción de agua (AA). El ANOVA mostró que existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% ($p<0,0125$). En ella se observa que el agregado de promotores (EDTA y citrato) a la sémola de soja desgrasada provocó un descenso en la AA respecto a la muestra control. En cambio, las muestras soja+Hb y soja+Hb+EDTA mantuvieron un comportamiento similar a la muestra soja, pero la adición conjunta de citrato y de hemoglobina (Soja+Hb+C) provocó un descenso en la absorción de agua.

CONCLUSIONES

Se podría concluir que las muestras que tuvieron adicionado citrato como promotor perdieron mayor cantidad de sólidos (solubles e insolubles), probablemente como consecuencia de una ineficiente texturización. El efecto de este promotor podría estar relacionado con interacciones generadas con algunos componentes de la soja, debido a su acción de complejante de minerales u otro tipo de interacción, cuya resultante es una disminución del grado de texturización. Por otra parte, el agregado de hemoglobina al texturizado de soja no presentó ninguna ventaja desde el punto de vista de la disponibilidad de minerales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Hady EA and Habiba RA. 2003. Effect of soaking and extrusion condictions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. Lebensm.-Wiss. U.-Technology, 36: 285-293.

Benito P and Miller D. 1998. Iron absorption and bioavailability: an updated review. Nutritional Research., 18(3): 581-603.

Blum M. 1997. Fortificación de alimentos. Una estrategia clave para terminar con la desnutrición por deficiencia de micronutrientes. Nutriview 97/ edición especial.

Cook JD, Morck TA, and Lynch SR. 1981. The inhibitory effect of soy products on nonheme iron absorption in man. American Journal of Clinical Nutrition, 34 (12): 2622-2629.

De la Mella MR y Moya Cribeiro Y. 2007. Utilización de concentrado de soya en productos cárnicos. La Industria Cárnica Latinoamericana, 145: 46-51.

Fairweather-Tait SJ. 1992. Bioavailability of trace elements. Food Chemistry, 43: 213-217.

García-Casal NM, Layrisse M, Peña-Rosas JP, Ramirez J, Leets I, Matus P. 2003. Iron absorption from elemental iron-fortified corn flakes in humans. Role of vitamins A and C. Nutritional Research, 23: 451-463.

Gibson RS, Yeudall F, Drost N, Mtitimuni B, and Cullinan T. 1998. Dietary interventions to prevent zinc deficiency. American Jorunal of Clinical Nutrition, 68: 484S–487S.

Greger JL. 1989. Calcium availability. Cereal Food World, 33 (9): 796-800.

Hallberg L and Rossander L. 1982. Effect of soy protein on nonheme iron absorption in man. American Journal of Clinical Nutrition, 36: 514-520.

Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SP, Dassenko AA, and Cook JD. 1992. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. American Journal of Clinical Nutrition, 56: 573-578.

King JC. 2000. Measuring iron and zinc bioavailability in humans. Food and Nutrition Bulletin, 21(4): 434-439.

Liener IE. 1972. Nutritional value of food proteins products. En: Soybeans: Chemistry and Technology. Ed: Smith AK and Circle SJ-The avi publishing company INC, Westport, Connecticut, USA. cap 7, pag 203-277.

Lönnerdal B, Bell JG, Hendrickx AG, Burns RA, and Keen CL. 1988. Effect of phytate removal on zinc absorption from soy formula. American Journal of Clinical Nutrition, 48: 1301-1306.

Lynch SR, Dasenko SA, Cook, Juillerat MA, and Hurrell RF. 1994. Inhibitory effect of a soybean-protein-related moiety on iron absorption in humans. American Journal of Clinical Nutrition, 60: 567-572.

Martínez C, Ros G, Periago MJ y López G. 1999. Biodisponibilidad de Fe en los alimentos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 49 (2): 106-113.

Mendoza C, Viteri FE, Lonnerdal B, Raboy V, Young KA, and Brown KH. 2001. Absorption of iron from unmodified maize and genetically altered low-phytate maize fotified with ferrous sulfate or sodium iron EDTA. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 80-85.

Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. 1981. An *in* V*itro* method for estimation of iron availability from meals. American Journal of Clinical Nutrition, 34: 2248-2256.

Nelson KJ and Potter NN. 1979. Iron binding by wheat gluten, soy isolate, zein, albumen and casein. Journal of Food Science, 44 (1): 104-111.

Sandberg AS, Carlsson NG and Svanberg U. 1989. Effects of inositol tri-tetra-, penta-, and hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. Journal of Food Science, 54: 159-161.

South PK and Miller DD. 1998. Iron binding by tannic acid: effects of selected ligands. Food Chemistry, 63 (2): 167-172.

Stevent AA. 2004. New approaches to iron fortification: role of bioavailability studies. American Journal of Clinical Nutrition, 80: 1104-1105.

Ummadi P, Chenoweth WL, Uebersax MA. 1995. The influence of extrusion processing on iron dialyzabizability, phytates and tannins in legumes. Journal Food Processing and Preservation, 19: 119-131.

Wolfgor R, Drago SR, Rodriguez V, Pellegrino N y Valencia M. 2002. In vitro measurement of available iron in fortified foods. Food Research International, 35: 85-90.

Gel de Chia (*Salvia hispanica*) Como Sustituto de Aceite o Huevos en Formulaciones de Bizcochuelos

Chia gel (*Salvia hispanica*) as eggs or oil replacer in cake formulations

Borneo R[a,b], Aguirre A[b], León AE[c]

[a]Subsecretaría CEPROCOR (Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba). Ministerio de Ciencia y Tecnología. Provincia de Córdoba,
[b]Universidad Nacional de Córdoba. Cátedra de Química Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Córdoba, Argentina
[c]CONICET. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Córdoba, Argentina
rborneo@efn.uncor.edu

RESUMEN

En este estudio se evaluó la aceptabilidad general, las características sensoriales, propiedades funcionales y contenido nutricional de bizcochuelos (tortas) elaboradas utilizando gel de Chia (*Salvia hispanica*) como reemplazante de huevos o aceite. El gel de Chia fue utilizado para sustituir, a niveles de 25, 50, y 75%, los huevos o aceite en una formulación control de bizcochuelo. Setenta y cinco panelistas no entrenados evaluaron bizcochuelos en base a una escala hedónica de siete categorías. El análisis de variancia realizado sobre los resultados de las características sensoriales mostró un efecto estadísticamente significativo cuando se reemplaza huevos o aceite por gel de Chia en lo que respecta a textura, color, sabor y aceptabilidad en general ($P<0,05$). La prueba de Fisher (LSD) evidenció que a niveles de sustitución superiores a 25% existen diferencias significativas entre las muestras en cuanto a las características sensoriales. El bizcochuelo elaborado sustituyendo 50% del aceite con gel de Chia tuvo 36 Kcal. menos que el control (porción de 100g) y 4g menos de grasas, además de un mejor perfil lipídico. Este estudio demuestra que se puede reemplazar hasta un 50% de aceite o huevos con gel de Chia y obtener un bizcochuelo de características sensoriales similares al control y de mejor contenido nutricional.

ABSTRACT

This study determined the overall acceptability, sensory characteristics, functional properties, and nutrient content of cakes made using Chia (Salvia hispanica) gel as a replacement for oil or eggs. Chia gel was used to replace 25, 50, and 75% of oil or eggs in a control cake formulation. Seventy-five untrained panelists participated in rating cakes on a seven-point hedonic scale. Analysis of variance conducted on the sensory characteristics and overall acceptability indicated a statistical significant effect when replacing oil or eggs for color, taste, texture, and overall acceptability ($P<.05$). Post hoc analysis (Fisher´s LSD) indicated that the 25% Chia gel cakes was not significantly different from the control for color, taste, texture, and overall acceptability. The 50% oil substituted (with Chia gel) cake, compared to control, had 36 fewer kcal and 4 g less fat per 100-g portion. The study demonstrated that Chia gel can replace as much as 50% of oil or eggs in cakes, while yielding a product with acceptable sensorial characteristics and a more nutritious product.

PALABRAS CLAVE: *chia, tortas, bizcochuelos, reemplazante de grasas.*

KEYWORDS*:* *fat replacers, cakes, chia.*

INTRODUCCIÓN

El riesgo de las enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer de colon esta incrementando en los países en desarrollo (Jemal *et al.*, 2005). La obesidad es un factor de riesgo preponderante en estas enfermedades (Mascie-Taylor y Karim, 2003). Los hábitos alimentarios y sedentarismo pueden ser modificados por el individuo para reducir los riesgos asociados con el exceso de peso. Estudios epidemiológicos han demostrado que a pesar de las diferencias que puedan existir entre culturas y regiones, una dieta rice en fibra, baja en grasas, baja en grasas saturadas y colesterol y rica en ácidos

grasos del tipo omega-3 son las más saludables (Hu, 2002). En este sentido, aquellas dietas ricas en frutas, vegetales, legumbres y pescado parecen ser las que más beneficios aportan a la salud del individuo (Menotti *et al.*, 1999; Zao y Chen, 2001; Bazzano *et al.*, 2002).
Una estrategia para reducir el consumo de grasas es el desarrollo de productos bajo en grasas. Sin embargo, las grasas contribuyen a diferentes propiedades del alimento como la textura, apariencia y "mouthfeel" (Fennema, 1996). Es por ello que el reemplazo de grasas por otros componentes debe tomar en cuenta las propiedades funcionales que las grasas ejercen en el alimento (Hahn, 1998). Estudios realizados en esta área revelan que los carbohidratos y mezclas de carbohidratos y grasa pueden ser usados como reemplazantes de grasas (Geise, 1996).
Las semillas de *Salvia hispanica* L (Chia) representaron un cultivo importante en la época pre-colombina. Las semillas de Chia tostadas y molidas (Chiapinolli) fueron un componente básico de la dieta pre-conquista (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008). El cultivo de Chia fue desplazado durante la conquista y recientemente ha adquirido notoriedad por su potencial nutricional. Sin embargo, en Méjico, existe una bebida popular hecha a base a Chia y las semillas de CHia molida son usadas en diferentes productos de panificación (Cahill, 2003). Los granos de Chia son ricos en fibra dietética y proteínas (Bushway *et al.*, 1981; Ayerza y Coates, 2000). Recientemente, Vazquez-Ovando *et al.* (2009) encontro que una fracción obtenida por molienda y tamizado de semillas desgrasada de Chia posee un 29,56% de fibra cruda total y un 56,46% de fibra dietética total, de la cual un un 53, 45% de la misma era fibra dietética insoluble.
Las semillas de S. hispanica son ricas en aceite (25-35%) con un alto contenido de ácidos graso del tipo omega-3 (Taga *et al.*, 1984). Recientemente, Peiretti y Gai (2009) han evaluado la calidad nutricional y del perfil lipídico de las semillas y la planta de *Salvia hispanica* en diversos estadios de crecimiento. Los resultados mostraron que la composición lipídica de la planta varia según el estadio de crecimiento en el que se encuentre la planta .Sin embargo, la constante observada es la alta concentración de ácidos grasos polinsaturados existentes que varió desde 752 a 623 g/Kg del total de ácidos grasos (FA). Los ácidos grasos principales en la semilla fueron el ALA (alfa-linolénico, 641 g/Kg del total de FA) y el LA (acido linoléico, C18:2n-6, 188/ g/Kg del total de FA).
La Chia ha sido considerado, en Argentina, como un cultivo industrial que podría contribuir a la diversificación y estabilización de las economías locales ya que potencial de producción en áreas áridas y semiáridas (Coates y Ayerza 1996, Heuer *et al.* 2002)
El objetivo de ese estudio fue el de evaluar el efecto que la sustitución de huevos o aceite (con gel de Chia) pudiera tener sobre las características nutricionales, sensoriales y funcionales de una formulación típica de biscochuelo..

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Harina de trigo (blanca, industrial, 10% proteína, enriquecida, Molino San José, Córdoba, Argentina), azúcar (granulada, Ingenio Fronterita, Tucumán, Argentina), aceite de girasol (linoléico, aprox. 65%, Molino Cañuelas, Córdoba, Argentina), leche entera (3,25% grasa, La Serenísima, Buenos Aires, Argentina), huevos (frescos, Great Value, Wal-Mart, Inc), semillas de Chia (*Salvia hispanica,* Grandiet, Córdoba, Argentina) secas, y un polvo para hornear de doble acción Yuspe, Córdoba, Argentina) fueron adquiridos localmente en establecimientos comerciales del ramo.

Preparación de los bizcochuelos

La formulación para bizcochuelo control se reporta en la **Tabla 1**. El aceite o huevos en dicha fórmula control fueron reemplazados con gel de Chia (1 parte de semillas de chia: 9 partes de agua) en niveles de 25, 50, y 75% de sustitución. El gel de Chia se preparó mezclando las semillas de Chia con agua (con espátula) y dejando en reposo por 20 minutos. Durante la fase de reposo un gel se forma. Este gel se incorporó en la formula con semillas de Chia incluidas. Todas las fórmulas usadas en este estudio están descritas en la **Tabla 1**.
Para la elaboración de los bizcochuelos se utilizó un procedimiento mezclado único a alta velocidad de batido. Todos los ingredientes se pesaron y se mezclaron por un minuto (a velocidad 2) en una Kitchen-Aid Professional Mixer. Posteriormente se realizó un batido a alta velocidad (velocidad 5) por 10 minutos. El batido fue pesado (200g) en cada una de 6 torteras metálicas (120 mm diámetro, 45

mm altura). El batido fue horneado por 25 minutos en un horno de gas a 200°C. Después del horneado los bizcochuelos se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos, los bizcochuelos fueron desmoldados y se dejaron enfriar por una hora más. Aquellos bizcochuelos a ser evaluados sensorialmente fueron colocados en bolsas de plástico (una vez enfriados) para evitar secado de la superficie. La evaluación sensorial se llevó a cabo a las 4-6 horas de finalizado el horneado.

Análisis Funcionales

El volumen de los bizcochuelos fue determinado por la técnica de desplazamiento de semillas (Chopin, S.A., France). Las tortas fueron pesadas una hora después de horneadas. La simetría se determino según el método 10-91 de la AACC (AACC, 2000). El método se basa en medir la altura de los bizcochuelos en puntos específicos de un bizcochuelo cortado por la mitad (al medio, y a los dos bordes) y de calcular un índice con dichas mediciones. Mientras más alto es el índice de simetría (calculado como 2 veces la altura central menos los dos alturas de los bordes) más simétrico es el bizcochuelo.

Evaluación nutricional

El análisis nutricional fue realizado utilizando los datos proporcionados por la USDA National Nutrient Database for Standard Reference -Release 21, 2008. (USDA 2009).

Evaluación sensorial

Porciones de bizcochuelo (1/8avo de bizcochuelos, aprox. 25 g) fueron evaluadas por cada uno de 75 panelistas no entrenados quienes opinaron sobre el grado de preferencia de los mismos en muestras ciegas codificadas con un número al azar de tres dígitos. Cada panelista fue informado del objetivo del estudio. Los panelistas manifestaron ser consumidores habituales de bizcochuelos. Las muestras fueron evaluadas en cuanto al color, sabor, textura y aceptabilidad general. Los participantes utilizaron planillas con una escala hedónica de 7 categorías: desde 1 (me disgusta extremadamente) hasta 7 (me gusta extremadamente). Cada panelista evaluó 4 muestras codificadas por vez (una control y tres con Chia).

Análisis estadístico

El peso, volumen y simetría fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la existencia de diferencias significativas entre muestras a un nivel alfa de 0,05. Comparaciones múltiples (Test de Fisher, LSD) fueron realizados cuando fueron descubiertas diferencias significativas (alfa = 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para que un producto sea exitoso como reemplazante de grasas debe mejorar o por lo menos mantener las características funcionales del producto alimenticio en el que será utilizado. En este caso, el reemplazante de grasas debe ser capaz de mantener las propiedades funcionales (peso/volumen, simetría) del bizcochuelo y las características sensoriales y aceptabilidad general del mismo. El análisis de varianza de los resultados obtenidos mediante el análisis sensorial mostró que el reemplazo de aceite o huevos en la fórmula control (con gel de Chia) rinde productos con diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) en cuanto a color, textura, sabor y aceptabilidad general. El test de Fisher indicó que las diferencias estadísticamente significativas aparecen cuando el nivel de sustitución es mayor a 25% (es decir en las muestras con 50% de sustitución de huevos o aceite) ($P<0,05$; **Tabla 2**). Entre las muestras control y aquella con sustitución del 25% (huevos o aceite) no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$; **Tabla 2**). Sin embargo, a pesar de las diferencias estadísticas observadas (**Tabla 2**), las muestras con niveles de sustitución de 50 y 75% no fueron rechazadas por los panelistas ya que las mismas obtuvieron valores de preferencia de entre 4,0 (ni me gusta ni me disgusta) y 5,0 (me gusta ligeramente). Ninguna muestra de biscochuelo elaborada en este estudio con gel de Chia obtuvo una calificación menor a 4 (“ ni me disgusta ni me gusta”).

La sustitución de huevos o aceite por gel de Chia en la fórmula para la elaboración de bizcochuelos no afectó sensiblemente las características funcionales del producto. Así, el peso de los bizcochuelos no

Tabla 1. Ingredientes, formulaciones y análisis nutricional de biscochuelos preparados con 25%, 50%, y 75% de sustitución de aceite o huevos con gel de Chia[1]

Ingredientes (g/100g)	Control	Sustitucion Huevos[1]			Sustitucion Aceite[1]		
		25%	50%	75%	25%	50%	75%
Harina de trigo	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5
Azucar	33	33	33	33	33	33	33
Leche	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5
Huevos	13,8	10,3	6,9	3,5	13,8	13,8	13,8
Gel de Chia	0	3,5	6,9	10,3	2,1	4,2	6,3
Aceite de girasol	8,4	8,4	8,4	8,4	6,3	4,2	2,1
Polvo de Hornear	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Contenido por 100g							
Calorias	335	331	328	325	317	299	282
%Calorias de grasas	28,4	28,0	27,6	27,2	24,3	19,7	14,5
Grasas(g)	10,7	10,5	10,3	9,9	8,7	6,7	4,6
Grasas Saturadas (g)	1,7	1,6	1,5	1,4	1,5	1,3	1,1
Total omega-3 (mg)	27,5	86,9	145	203	64,4	101	138
Total omega-6 (mg)	5931	5911	5891	5872	4563	3195	1826
Proporcion omega-6/omega-3	216	68	41	29	71	32	13
Colesterol (mg)	60,7	47,5	31,2	16,6	60,7	60,7	60,7
Carbohidratos (g)	55,4	55,5	55,6	55,8	55,5	55,6	55,7
Proteinas (g)	5	4,6	4,2	3,8	5	5	5,1
Fibra Dietaria (g)	0,7	0,8	0,9	1,1	0,7	0,8	0,9

[1]En la formula control el contenido de huevos o aceite fue substituido con gel de Chia en niveles de 25%, 50%, and 75%.

fue significativamente diferente a cualquier nivel de sustitución de huevos o aceite (P<0.05, **Tabla 2**). Esto pudiera ser particularmente importante para la industria procesadora de este tipo de producto ya que implica que la sustitución de huevos o aceite no afecta el rendimiento final (en peso) del producto y además permite sustituir huevos o aceite por un gel que mayoritariamente posee agua en su composición.

En el caso del volumen de los bizcochuelos si se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (**Tabla 2**, P<0,05). A medida que el nivel de sustitución de huevos o aceite incrementó en la fórmula, los bizcochuelos obtenidos fueron de menor volumen (**Tabla 2**). La simetría del producto permaneció inalterada cuando los niveles de sustitución se incrementaron (**Tabla 2**, P<0,05).

Tabla 2. Propiedades funcionales y sensoriales de bizcochuelos elabordaoscon gel de Chia a distintos niveles de sustitución de huevos o aceite[a.]

Propiedad	Substitucion de Huevos				Substitucion de Aceite		
	Control	25%	50%	75%	25%	50%	75%
Caracteristicas Funcionales							
Peso (g)	181a	183a	180a	180a	181a	181a	180a
Volumen (cm3)	625a	625a	466b	383c	600a	500b	400c
Altura Central (mm)	63a	62a	54b	49b	59a	49b	47b
Simmetria (mm)	38a	40a	38a	31b	38a	36a	35a
Caracteristicas sensoriales[b]							
Color	6,2a	6,5a	5,1b	5,0b	6,0a	5,1b	5,0b
Sabor	5,9a	6,0a	5,3b	5,0b	5,9a	4,8b	4,5b
Textura	6,0a	6,2a	5,3b	4,5b	5,8a	4,8b	4,2b
Acceptabilidad	6,1a	6,2a	5,2b	4,0b	6,0a	4,8b	4,1b

[a] Valores seguidos de una letra diferente dentro de cada fila indica una diferencia estadisticamente significativa (P<0,05). Los valores de la desviacion estandar fueron omitidos pero en nigun caso fueron mayores al 1% de la media excepto para el volumen

[b] Escala hedonica utlizada para todas las caracteristicas sensoriales 1=disgusta extremadamente, 2=disgusta moderadamente, 3=disgusta ligeramente, 4=ni me gusta ni me disgusta, 5= gusta ligeramente, 6=gusta moderadamnete, y 7=gusta extremadamente.

El análisis nutricional (**Tabla 1**) indicó que el bizcochuelo control poseía 335 calorías, 10.7 g grasa, 1,7 g grasa saturada y 28.4% calorías derivadas de las grasas por porción de 100-g de producto (**Tabla 1**). El bizcochuelo elaborado con 50% de sustitución de aceite posee 36 calorías menos por porción y una reducción de la calorías derivadas de grasa de un 62% (19,7% calorías derivadas de la grasas, **Tabla 1**). Además de la reducción de calorías y calorías derivadas de grasas en los productos con gel de Chia, también se observó un mejoramiento del perfil lipídico del producto. Esto es por que a medida que se incrementa el nivel de sustitución de huevos o aceite en la fórmula del bizcochuelo se observa una disminución del contenido de grasa saturada [de 1,7g (control) a 1,4g (50% sustitución huevos) y a 1,1g (50% sustitución aceite); ver **Tabla 1**]. La proporción ácidos grasos ω-6/ω-3 mejora (se hace menor) a medida que el aceite o huevos son sustituidos en la fórmula control (**Tabla 1**). La sustitución de huevos por gel de Chia ocasiona que la proporción ácidos grasos ω-6/ω-3 baje desde un valor de 215.7 (control) hasta un valor de 28,9 (75% substitución). Cuando el aceite es substituido por gel de Chia entonces la disminución observada es desde un valor de 215,7 (control) hasta 13,2 (75% oil substitución). Una disminución de la proporción ω-6/ω-3 resulta con ventajas nutritivas ya que las dietas con bajo contenido de ácidos graso del tipo ω-6 y con alto contenido del tipo de ácidos graso del tipo ω-3 están siendo recomendadas como mas saludables debido a su efecto anti-inflamatorio (Menotti, 1999; Zhao y Chen, 2001). El contenido de colesterol disminuye significativamente a medida que el contenido de huevos es substituido en la formula control por gel de Chia (**Tabla 1**).

CONCLUSIÓN

La substitución de aceite o huevos en la formulación de bizcochuelos no afectó significativamente la percepción de las características sensoriales del producto cuando el nivel de sustitución fue del 25%. A niveles de substitución más altos se apreció una reducción del valor del índice de preferencia (color, sabor, textura, aceptabilidad) pero el producto nunca fue rechazado por los panelistas. Las propiedades funcionales del producto (volumen, simetría) fueron afectadas negativamente solamente a altos niveles de sustitución de huevos o aceite. El contenido nutricional de los bizcochuelos elaborados con sustitución de huevos o aceite con gel de chia mejoró notablemente al poseer menos calorías, menos calorías derivadas de las grasas, menos grassa saturada, menos colesterol (sobretodo cuando se sustituyen los huevos), mejor perfil de ácidos grasos (menor proporción ω–6/ω–3) y mayor fibra dietaria.

El consumo en exceso de grasas y energía produce inevitablemente un exceso de peso y grasa en el individuo. Dicho consumo podría ser reducido si se desarrollan productos bajos en grasa con buenas propiedades organolépticas. Para ello es necesario contar con sustitutos de grasas apropiados. El gel de Chia podría ser usado exitosamente como sustituto de grasas tal como quedó demostrado en éste estudio con bizcochuelos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. 2000. Official Methods of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul. Minn. USA.

Ayerza R, Coates W. 2000. Dietary levels of chia: Influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry Science*. 79: 724–739.

Bazzano LA, He J, Ogden LG. 2009. Fruits and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the First National Health and Nutritional Examination Survey Epidemiological Follow-up Study. *Am J Clin Nutr*. 76:93-99

Bushway AA, Belya PR, Bushway R J. 1981. Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *Journal of Food Science*. 46:1349–1356.

Coates W, Ayerza R 1996. Production Potencial of Chia in Northwestern Argentina. Ind.Crops Prod. 5:229-233.

Cahill JP. 2003. Ethnobotany of Chia, Salvia hispanica L. (Lamiaceae). *Economic Botany*. 57:604–618.

Fennema OR. 1996. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. New York

Geise, J. 1996. Fats, oils, and fat replacers. *Food Technol.* 50:77-84.

Hahn NI. 1998. Replacing fat with food technology. *J Am Diet Assoc*.. 98:463-468.

Heuer B, Yaniv Z, Ravina I. 2002. Effect of late salinization of Chia (Salvia hispanica), stock (Matthiola tricuspidata) and evening primrose (Oenothera biennis) on their oil content and quality Ind. Crops Prod. 15:163-167

Hu FB. 2002. Dietary patterns analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin. Lipidol.* 13:3-9.

Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. 2005. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *J Am Med Assoc*. 294:1255-1259.

Mascie-Taylor CG, Karim E. 2003. The burden of chronic disease. *Science*. 302:1921-1922.

Menotti A, Kromhout D. Blackburn H, Fidanza F, Buzina R, Nissinen A. 1999. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. The Seven Countries Study Research Group. *Eur J Epidemiol.* 15:507-515.

Peiretti PG, Gai F. 2009. Fatty acid and nutritive quality of chia (Salvia hispanica L.) seeds and plants during growth. *Animal Science and Technology.* 148:267-275.

Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-López MA. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (Salvia hispanica L.) seeds. *Food Chem.* 107:656-663.

Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chemist's Soc*. 61:928-932.

USDA. 2009. United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference (release 21,2008) available at www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search (retrieved January-February 2009)

Vázquez-Ovando A, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. 2009. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (Salvia hispanica L.) *LWT-Food Science and Technology.*42:168-173.

Zhao W, Chen J. Implications from and for food cultures for cardiovascular diseases: diet, nutrition and cardiovascular diseases in China. Asia Pacific *J Clin Nutr.* 2001;10:146-152.

Reología y microestructura de emulsiones de contenido lipídico reducido, preparadas con dispersiones de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Rheology and microstructure of low-in-fat o/w emulsions prepared with yeast aqueous dispersions from *Saccharomyces cerevisiae*

Bosisio NA, Fernandez VE, Martínez LM, Palazolo GG, Wagner JR

Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina
gpalazolo@unq.edu.ar

RESUMEN

El objetivo general del presente trabajo fue la obtención de un emulsión o/w tipo aderezo incorporando levadura como sustituto del huevo. Las emulsiones se prepararon por mezclado inicial de todos los componentes: dispersión acuosa de levadura (60% obtenida por ruptura celular a alta presión en medio alcalino), aceite de girasol (12 y 25% p/p), almidón modificado (0-4% p/p), goma xántica (0,25% p/p), goma guar (0,25% p/p), sal, azúcar, vinagre, ácido cítrico, EDTA y conservantes. La pre-emulsión se procesó finalmente con un homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax T-25 durante 7 minutos a 17.000 rpm. Los aderezos se caracterizaron en forma comparativa con tres muestras de mayonesas comerciales: el diámetro promedio de Sauter ($D_{3,2}$) se determinó empleando un analizador Malvern Mastersizer 2000E y el comportamiento de flujo se analizó en un viscosímetro Brookfield DV-III+. Además, se determinó la composición, el pH y la actividad acuosa. Las emulsiones preparadas con dispersiones de levadura exhibieron poblaciones de partículas en el mismo rango de diámetros que el de las mayonesas comerciales. En presencia de almidón, los aderezos dieron distribuciones de tamaño de partículas de carácter bimodal; independientemente del contenido de aceite, $D_{3,2}$ exhibió una tendencia creciente en función de la concentración de almidón. La actividad acuosa (a_w) y el pH dieron valores de 0,97 ± 0,01 y 3,97 ± 0,37, respectivamente y el contenido proteico fue significativamente mayor (~2% p/p) al de las mayonesas comerciales. Por otra parte, al igual que éstas últimas, los aderezos exhibieron un comportamiento pseudoplástico, no newtoniano (n ~ 0,2); el índice de consistencia (K) y el esfuerzo umbral (τ_0) fueron más elevados en los de mayor contenido de almidón (4% p/p) y de aceite (25% p/p). Después de 30 días de almacenamiento refrigerado (7,5 ± 0,5 *ºC*), las emulsiones fueron totalmente estables a la separación gravitacional y a la coalescencia y el índice de consistencia (K) mostró sólo una leve disminución, especialmente en aquellos aderezos que contienen almidón (2 y 4% p/p). En conclusión, la variación en el contenido de almidón y de aceite permite la preparación de aderezos de levadura con una viscosidad similar y un contenido proteico significativamente mayor al de las mayonesas comerciales tradicionales *full fat* y de contenido lipídico reducido. Las dispersiones acuosas de levadura, obtenidas a partir de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* por ruptura celular en medio alcalino a altas presiones, representan una interesante alternativa para la formulación de emulsiones símil-mayonesas como sustituto de huevo.

ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the application of yeast aqueous dispersions in low-in-fat o/w emulsions as an egg-yolk substitute. Aqueous dispersions were obtained by cell rupture in alkaline conditions, using a high-pressure homogenizer. The dressing recipe contained the following ingredients: yeast aqueous dispersion (60% w/w), sunflower oil (12 and 25% w/w), modified starch (0-4% w/w), xhantan gum (0.25% w/w), guar gum (0.25% w/w), salt, sugar, vinegar, citric acid, EDTA and antimicrobial agents. Emulsions were prepared by mixing all components, and then the pre-emulsion was finally homogenized by employing an Ultraturrax T-25 high-speed blender (7 min, 17000 rpm). The characterization assays were performed comparatively with three commercial mayonnaises: Sauter mean diameter ($D_{3,2}$) was determined by laser diffraction (Malvern Mastersizer 2000E) and flow behavior was evaluated by using a Brookfield DV-III+ viscosimeter. Chemical composition, pH and water activity were also determined. Yeast dressings and commercial mayonnaises exhibited particle size distributions (PSD) with particle populations in the same diameter

range. Yeast dressings prepared with modified starch, showed bimodal PSD and an increase of $D_{3,2}$ at high starch concentration (2 and 4% p/p). The values of water activity (a_w) and pH were 0.97 ± 0.01 y 3.97 ± 0.37; the protein content of yeast dressing was significantly higher (~ 2% w/w) than those of commercial mayonnaises. On the other hand, yeast dressing and commercial mayonnaise exhibited a pseudoplastic, non Newtonian behavior. For all dressings, flow behavior index (n) was ~ 0.2; those prepared with 4% w/w exhibited the highest values of consistency index (K) and yield stress (τ_0). After 30 days of quiescent storage (7.5 ± 0.5 *ºC*) yeast dressings showed a high stability against creaming and coalescence. The consistency index exhibited a slight decrease during storage, especially in dressings that contains modified starch (2 and 4% w/w). In conclusion, the variation in starch and oil content allows the preparation of yeast dressings of similar viscosity and protein content significantly higher than the low-in-fat and full fat mayonnaises. Yeast aqueous dispersions, obtained by cell rupture at high pressure in alkaline medium, have a potential application as egg-yolk replacer in food emulsions.

PALABRAS CLAVE: *emulsiones o/w, hidrocoloides, levadura*.

KEYWORDS: *hydrocolloids, o/w emulsions, yeast*.

INTRODUCCIÓN

La mayonesa, es una emulsión semisólida o/w preparada tradicionalmente por mezclado de aceite vegetal, huevo, vinagre, sal, y otros ingredientes, con un contenido de lípidos del 70-80% p/p (Depree y Savage 2001). La tendencia actual de consumo demanda la reducción de la materia grasa, colesterol, azúcar, sal y algunos aditivos por medio de la incorporación de otros ingredientes con el objetivo de lograr atributos (sabor, textura, apariencia y consistencia) similares a los de los productos tradicionales (Ma y Barbosa-Cánovas 1995, Moro *et al.* 2002). En este contexto, se ha propuesto no sólo la reducción del contenido lipídico en las mayonesas sino también el reemplazo parcial o total de la yema de huevo por otras proteínas de origen vegetal como las de soja o trigo (Ghoush *et al.* 2008). Por otro lado, existen pocos antecedentes de aplicación de proteínas de levadura en emulsiones aceite en agua (o/w) con textura y consistencia similares a mayonesas y aderezos. Worrasinchai *et al.* (2006) utilizaron β-glucanos purificados a partir de levadura residual de cervecería como sustituto de grasas en mayonesas, pero no propusieron el reemplazo de las lipoproteínas del huevo por proteínas de levadura. Las mananoproteínas son proteínas ligadas a manano-oligosacáridos que están presentes en la parte más externa de la pared celular y constituyen la fracción álcali-soluble, ya que pueden ser extraídas a partir de la biomasa celular en medio alcalino. Trabajos recientes han mostrado que estas proteínas tienen no sólo una elevada actividad interfacial, sino también muy buenas propiedades emulsificantes en emulsiones modelo o/w (Torabizadeh *et al.* 1996, Barriga *et al.* 1999, Vasallo *et al.* 2006, Sceni *et al.* 2009). Los procesos de ruptura celular por medios mecánicos o no mecánicos son fundamentales para la utilización de proteínas y polisacáridos de levadura como ingredientes con propiedades tecnofuncionales para la formulación de alimentos, entre ellos las emulsiones alimentaras, ya que la biomasa de levadura exhibe una pobre funcionalidad (Otero *et al.* 1996).

El objetivo general del presente trabajo fue la obtención de emulsiones tipo aderezo estables y de contenido lipídico reducido, incorporando dispersiones acuosas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como sustituto del huevo. Dado que las emulsiones tienen una fracción másica de fase dispersa significativamente inferior a la de una mayonesa tradicional *full fat*, para evitar la separación gravitacional durante el almacenamiento, se agregaron hidrocoloides como almidón modificado, goma xántica y goma guar comúnmente utilizados en este tipo de emulsiones (Ma y Barbosa-Cánovas 1995, Ford *et al.* 1997, Depree y Savage 2001, Lorenzo *et al.* 2008). Los aderezos se caracterizaron a través de su comportamiento de flujo, su composición y tamaño de partícula. A fines comparativos, se incluyeron en el análisis tres mayonesas comerciales de diferente contenido lipídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La levadura prensada panadera (Calsa S.A.) se adquirió en un comercio local. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Preparación de las dispersiones acuosas de levadura

La dispersión acuosa de levadura se preparó por ruptura celular de una suspensión de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* con tratamientos previos de reducción de ácidos nucleicos (ARN) en medio alcalino (NaOH 0,1 N, 50°C, 30 minutos) e inactivación enzimática por choque térmico (80°C, 5 minutos), para evitar procesos hidrolíticos durante el almacenamiento posterior de los aderezos. La suspensión obtenida (pH 11,0 ± 0,5) se pasó a través de un homogeneizador a válvula de alta presión (Panda 2K, GEA Niro Soavi, Parma Italia) (1500 y 150 bar, primera y segunda válvula respectivamente) realizando 3 circulaciones por el dispositivo. La dispersibilidad proteica se calculó a partir de la relación porcentual del contenido de proteína en el sobrenadante después de centrifugar la dispersión a 15.300 × *g*, respecto al de la dispersión original. Después de la ruptura celular, las dispersiones acuosas presentaron una dispersibilidad proteica de 57,7 ± 9,1% y un contenido de ácidos nucleicos ARN de 2,4 ± 0,9%, que representa una reducción del 62% respecto al de la dispersión sin tratamiento alcalino.

Preparación de las emulsiones

Se realizó una pre-mezcla de todos los componentes (dispersión acuosa de levadura, almidón modificado para aderezos, goma xántica, goma guar, azúcar, sal, vinagre, ácido cítrico, ácido sórbico, β-caroteno, saborizantes y EDTA) y parte del aceite de girasol empleado en la formulación. La pre-mezcla se homogeneizó durante 7 minutos a 17.000 rpm empleándose un homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax T-25 (rotor S25NK19G, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania), mientras el resto del aceite se incorporó lentamente durante el proceso de preparación del aderezo. La denominación de los aderezos, conjuntamente con la proporción másica de los principales componentes de la formulación se muestra en la **Tabla 1**. De acuerdo al porcentaje en peso del aceite, la fracción másica de fase dispersa de los aderezos (ϕ_m) fue de 0,12 y 0,25, respectivamente. Las emulsiones se guardaron en frascos plásticos con tapa y se almacenaron en un refrigerador (7,5 ± 0,5 °C) durante 30 días.

Tabla 1: Formulación de los principales componentes de los aderezos preparados con dispersiones acuosas de levadura. Los valores se expresan en g/100 g de aderezo. Los componentes de la formulación se pesaron con una precisión de 0,01 g. Las gomas xántica y guar se agregaron en igual proporción másica.

Aderezo	Aceite de girasol	Dispersión de levadura	Almidón modificado	Goma xántica + goma guar
LA012	12,00	60,00	0	0,50
LA212	12,00	60,00	2,00	0,50
LA412	12,00	60,00	4,00	0,50
LA025	25,00	60,00	0	0,50
LA225	25,00	60,00	2,00	0,50
LA425	25,00	60,00	4,00	0,50

Distribución de tamaño de partícula

Se llevó a cabo por difracción láser (Malvern Mastersizer 2000E, Worcestershire, Reino Unido), utilizando índices de refracción de 1,47 y 1,33 para el aceite y el agua, respectivamente y un coeficiente de absorción de 0,001. Las mediciones se realizaron en la unidad de dispersión (Hydro 2000 MU, Worcestershire, Reino Unido), a una velocidad de agitación de 2000 rpm. Debido a la consistencia de las muestras, el tiempo de agitación en la unidad fue de 5 minutos, suficiente para asegurar la homogeneidad de todas las muestras antes de realizar las mediciones. El diámetro promedio de Sauter ($D_{3,2}$) se obtuvo a partir de las correspondientes distribuciones. Las determinaciones se llevaron a cabo al menos por duplicado.

Comportamiento de flujo

Las curvas de fluidez se obtuvieron empleando el viscosímetro Brookfield RVDV-III+ (Brookfield Engineering laboratorios Inc., Estados Unidos) con una geometría de cilindros concéntricos y una aguja SC4-29, en un rango de velocidad de deformación por corte de 0,01 a 62,5 s^{-1}. La temperatura se controló a 24 ± 1°C (baño termostático Vicking modelo Masson II, Buenos Aires, Argentina). El ajuste de los datos se realizó empleando el modelo de Herschel-Buckley que asocia a la Ley de la Potencia un valor de esfuerzo umbral ("yield stress", τ_0):

$$\tau = \tau_0 + K \times D^n$$

τ es el esfuerzo de corte, D es la velocidad de deformación por corte, K es el índice de consistencia y n es el índice de comportamiento de flujo. Los parámetros n y K se obtuvieron por análisis de regresión lineal a partir de los gráficos del logaritmo del esfuerzo de corte (log τ) en función del logaritmo de la velocidad de deformación por corte (log D).

Análisis de la composición, pH y actividad acuosa

El pH se determinó a 25° C empleando un electrodo de vidrio por inmersión directa en la muestra (Denver Instrument Ultra Basic, Estados Unidos). Para la medición de la actividad acuosa (a_w) se utilizó un equipo Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Pullman, Estados Unidos) con un baño termostático adaptado a 25° C (Julabo Labortechnik, Seelbach, Alemania). Se emplearon soluciones saturadas patrón de K_2SO_4, $BaCl_2$, KNO_3 y KCl.

La humedad se determinó por el método indirecto de secado (105°C, 3 horas); para facilitar la rápida y uniforme eliminación de los componentes volátiles de la muestra semi-sólida, se emplearon placas de Petri, utilizándose arena calcinada. La proteína bruta se determinó por el método de Kjeldahl (N×6,25).

La determinación de lípidos se realizó empleando el procedimiento gravimétrico descripto en la AOAC (método 950.54) para aderezos, con leves modificaciones (Cunniff, 1997). La muestra se hirvió durante 30 minutos con HCl concentrado para inducir la coalescencia y la separación total del aceite de la emulsión. La extracción de los lípidos se realizó con una mezcla de iguales volúmenes de éter etílico y éter de petróleo, realizándose una centrifugación (700 rpm, 5 minutos) para acelerar la separación de las fases (centrífuga Rolco CM4080 Milennium, Buenos Aires, Argentina). La extracción se repitió dos veces más empleando nuevas porciones de éter etílico y éter de petróleo. La fase etérea se colocó en un balón previamente pesado y los solventes se evaporaron empleando un evaporador rotatorio (Heidolph 4000, Heidolph Laborota, Alemania). El porcentaje de lípidos se calculó a partir de la relación porcentual de masas de los lípidos extraídos y de la muestra.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por duplicado y el efecto del contenido de almidón sobre los parámetros $D_{3,2}$, K y τ_0 de los aderezos de 12 y 25% de aceite se analizaron por ANOVA de una sola variable. Las diferencias significativas entre medias se evaluaron, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$), mediante el Test de Fisher utilizando el programa Statgraphics Plus v. 5.1 para Windows (Statistical Graphics Corporation, 2000, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aderezos de dispersiones de levadura exhibieron distribuciones de tamaño de partícula (DTP) monomodales en ausencia de almidón y bimodales en presencia del hidrocoloide, tanto a 12% como a 25% de aceite (**Figura 1 a-b**). En las distribuciones bimodales (LA212, LA412, LA225 y LA425) se observaron dos picos solapados en un amplio rango de tamaño de partícula (1-200 μm). Independientemente del contenido de almidón y de aceite, los aderezos exhibieron poblaciones de partículas en el mismo rango de diámetro que las mayonesas comerciales MC23, MC30 y MC77 (23, 30 y 77% p/p de lípidos, respectivamente) (**Figura 1c**). En concordancia con lo observado en la **Figura 1 a-b**, los valores iniciales de $D_{3,2}$ de los aderezos se incrementaron significativamente con el aumento del contenido de almidón en la formulación, debido a que una mayor proporción del volumen de fase dispersa está distribuida en la población de partículas de mayor tamaño (> 10 μm, $p < 0,05$, **Tabla 2**). Durante la preparación de las emulsiones, las gotas que se forman están en continuo movimiento y colisionan unas con otras. Durante el tiempo de residencia de la emulsión dentro del dispositivo de homogeneización (0,1 a 1 s para dispositivos rotor/estator como el homogeneizador Ultraturrax) hay una competición entre los procesos de formación y coalescencia de gotas, que va a tener una influencia decisiva en la DTP de la emulsión (McClements 1999). En el presente trabajo, los

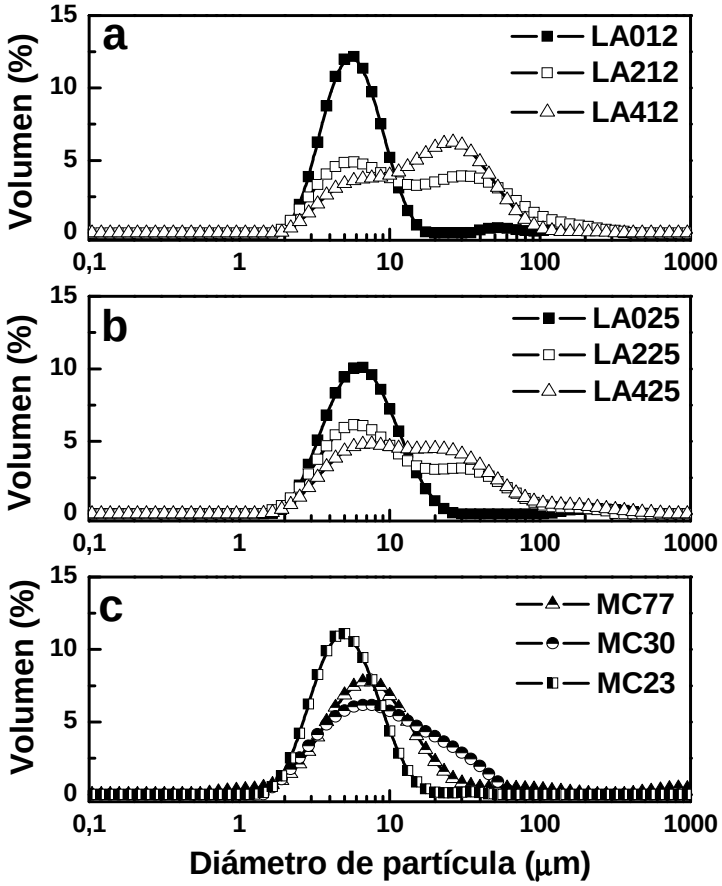


Figura 1. Distribución de tamaño de partícula de aderezos preparados con dispersiones acuosas de levadura *S. cerevisiae* con (a) 12% p/p de aceite (ϕ_m = 0,12), (b) 25% p/p de aceite (ϕ_m = 0,25) y (c) mayonesas comerciales.

Tabla 2. Diámetro promedio de partícula y propiedades de flujo de aderezos preparados con dispersiones acuosas de levadura con 12% (ϕ_m = 0,12) y 25% p/p (ϕ_m = 0,25) de aceite. Los parámetros K, n y τ_0 se obtuvieron por aplicación del modelo de Herschel-Buckley a los datos experimentales (ver sección Materiales y Métodos).

Aderezo	$D_{3,2}$ (μm)	K (Pa.s^n)	n (sin unidades)	τ_0 (Pa)
LA012	5,9 ± 0,2^a	18,9 ± 0,5^a	0,184 ± 0,01	0,39 ± 0,02^a
LA212	8,4 ± 0,1^b	48,0 ± 5,2^b	0,204 ± 0,03	1,42 ± 0,08^b
LA412	10,4 ± 0,1^c	94,3 ± 2,8^c	0,211 ± 0,01	3,03 ± 0,06^c
LA025	5,3 ± 0,2^d	40,1 ± 4,2^d	0,163 ± 0,01	0,99 ± 0,02^d
LA225	7,1 ± 0,1^e	82,0 ± 2,8^e	0,211 ± 0,01	2,86 ± 0,02^e
LA425	9,2 ± 0,5^f	142,9 ± 8,3^f	0,196 ± 0,01	6,47 ± 0,05^f

En cada columna, los valores de $D_{3,2}$, K y τ_0, seguidos del mismo superíndice no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

aderezos se prepararon a partir de los componentes de la fase dispersa y continua por separado. Por consiguiente, a igual velocidad de rotor y tiempo de homogeneización, cuando el almidón está presente en la formulación habría una menor eficiencia de mezclado de los componentes. Además, Ford *et al.* (1997) encontraron que la presencia de partículas de almidón en la fase acuosa de la emulsión puede contribuir significativamente a la DTP. Estos factores explicarían el incremento observado de $D_{3,2}$ en los aderezos que contienen almidón.

Por otro lado, los valores de diámetro promedio de las muestras MC23, MC30 y MC77 fueron 6,2, 4,3 y 5,4 μm, respectivamente. Si se realiza un análisis comparativo de los diámetros promedio de partícula con los de aderezos de levadura, se observa que sólo aquellos que no contienen almidón

modificado en la formulación dieron valores de $D_{3,2}$ similares a las mayonesas comerciales, en tanto que las muestras LA212, LA225, LA412 y LA425 exhibieron un tamaño promedio de partícula levemente superior (7,1-10,5 μm, **Tabla 2**). Las mayonesas se elaboran industrialmente utilizando molinos coloidales, que son dispositivos rotor/estator de mayor densidad de energía que los homogeneizadores de alta velocidad, por lo que tienden a dar emulsiones de menor diámetro promedio. Además, las diferencias observadas en las DTP no dependen solamente de las condiciones de procesado, sino también de formulación (McClements 1999). Dado que no se conoce exactamente la formulación exacta (cualitativa y cuantitativa) de los productos comerciales, no se puede establecer una correlación basándose sólo en las diferencias en las condiciones de procesado. No obstante, es importante destacar que a pesar de las diferencias observadas en $D_{3,2}$, los aderezos de levadura exhibieron partículas en el mismo rango de diámetros que las mayonesas comerciales.

El pH, medido directamente en las muestras, fue de 3,97 ± 0,37, en tanto que la actividad acuosa (a_w) fue de 0,97 ± 0,01. Este valor elevado de a_w fue similar al informado en trabajos previos para mayonesas de contenido lipídico reducido preparadas en el laboratorio (Peressini *et al.* 1998) y en las muestras comerciales MC23, MC30 y MC77 (a_w = 0,96 ± 0,01). La composición para uno de los aderezos (LA412) mostró porcentajes de agua, proteína bruta y lípidos totales de 75,5 ± 0,2% p/p, 2,2 ± 0,1% p/p y 12,1 ± 0,1% p/p, respectivamente. En base a estos resultados, es conveniente destacar que el contenido de proteína de este aderezo fue significativamente superior al de las mayonesas comerciales (máximo 1% p/p, obtenido de los correspondientes rótulos nutricionales).

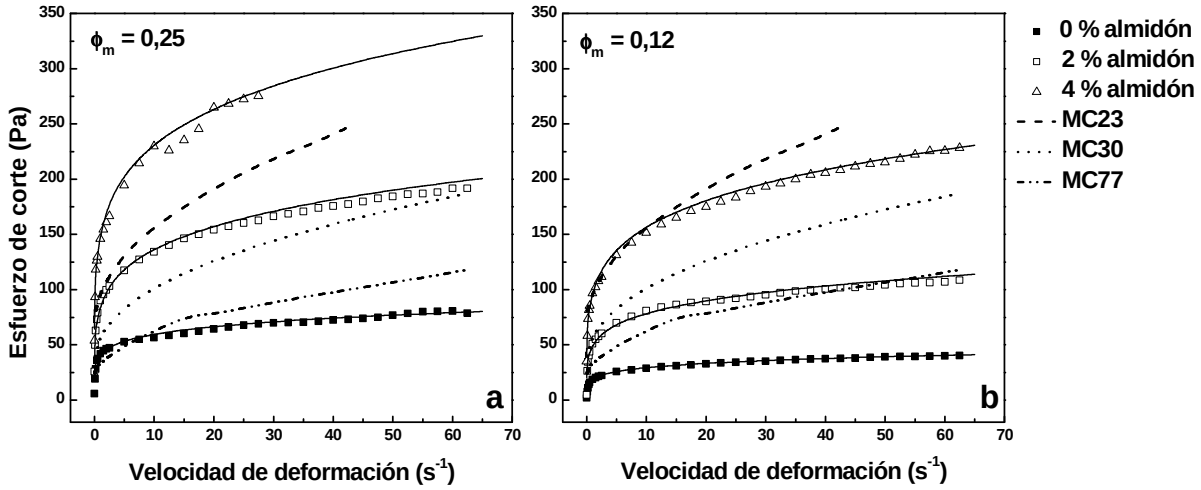


Figura 2. Curvas de flujo de aderezos: (a) 12% p/p de aceite en la formulación (ϕ_m = 0,12), (b) 25% p/p de aceite (ϕ_m = 0,25). A fines comparativos se incluyen las curvas de flujo de las mayonesas comerciales MC23, MC30 y MC 77 (ϕ_m = 0,23, 030 y 0,77, respectivamente).

En el presente trabajo, también se estudiaron las propiedades de flujo de los aderezos de levadura. Las curvas de flujo de estos aderezos y de las mayonesas comerciales se observa en la Figura 2. Los aderezos, al igual que las mayonesas comerciales exhibieron un comportamiento no newtoniano, pseudoplástico ($0<n<1$). Los modelos de Herschel-Buckley, Casson y la ley de la Potencia han sido ampliamente utilizados en el estudio de las propiedades de flujo de salsas, mayonesas tradicionales *full fat* y de contenido lipídico reducido (Ma y Barbosa-Cánovas 1995, Moro *et al.* 2002, Maruyama *et al.* 2007). De acuerdo a lo observado en la **Figura 2**, se puede decir que el modelo de Herschel-Buckley fue adecuado para describir el comportamiento de flujo de las emulsiones preparadas con dispersiones de levadura. En todos los casos, se observó que el índice de consistencia (K) y el esfuerzo umbral (τ_0) se incrementaron significativamente con el aumento en el contenido de almidón modificado y de aceite, mientras que el índice de comportamiento de flujo (n) fue similar para todas las emulsiones, con valores aproximados a 0,2 (**Tabla 2**). Sólo los aderezos LA225 (2% p/p almidón y 25% p/p de aceite) y LA412 (4% p/p almidón y 12% p/p de aceite) exhibieron curvas de flujo con características similares a las de las mayonesas de contenido lipídico reducido (MC23 y MC30), en tanto que los aderezos preparados sin almidón en la formulación exhibieron una viscosidad inferior a la de la

muestra MC77. El comportamiento pseudoplástico observado por las emulsiones LA012 y LA025 se atribuye a dos factores: en primer lugar, la presencia de las gomas xántica y guar, cuyas soluciones tienen un comportamiento pseudoplástico y le transfieren esta característica reológica a la emulsión; en segundo lugar, la presencia de polisacáridos y agregados proteicos de proteínas de levadura, ya que una fracción de proteínas citoplasmáticas son muy poco solubles a pH 4,0 (Ford *et al.* 1997, Sceni *et al.* 2009). Por consiguiente, tanto las proteínas como los polisacáridos, conjuntamente con los hidrocoloides, pueden contribuir al incremento de la viscosidad de la fase continua.

La estabilidad de una emulsión se refiere a la capacidad de la misma de resistir modificaciones de sus propiedades en función del tiempo, tanto el tamaño de las partículas como su distribución espacial en el recipiente que las contiene. Dado que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, la formulación de la emulsión tiene un rol preponderante para definir la vida útil de un producto (Ford *et al.* 1997, McClements, 1999). En este contexto, los aderezos almacenados durante 30 días a 7,5 ± 0,5° C no evidenciaron separación gravitacional ni un incremento significativo de $D_{3,2}$, por lo también fueron estables a la coalescencia (**Figura 3 a-b**). Este comportamiento también se observó en las emulsiones LA012 y LA025, que no contienen almidón en su formulación. Este resultado indicaría que las proteínas provenientes de las dispersiones acuosas de levadura exhiben buenas propiedades emulsificantes y estabilizantes en emulsiones alimentarias acidificadas. Además, la presencia de un esfuerzo umbral, τ_0 (**Tabla 2**), aún en ausencia de almidón, es necesaria para suprimir completamente la separación gravitacional. Desde el punto de vista reológico, a diferencia de la muestra LA012, todos los aderezos mostraron una leve disminución del índice de consistencia durante el tiempo del almacenamiento (**Figura 3 c-d**).

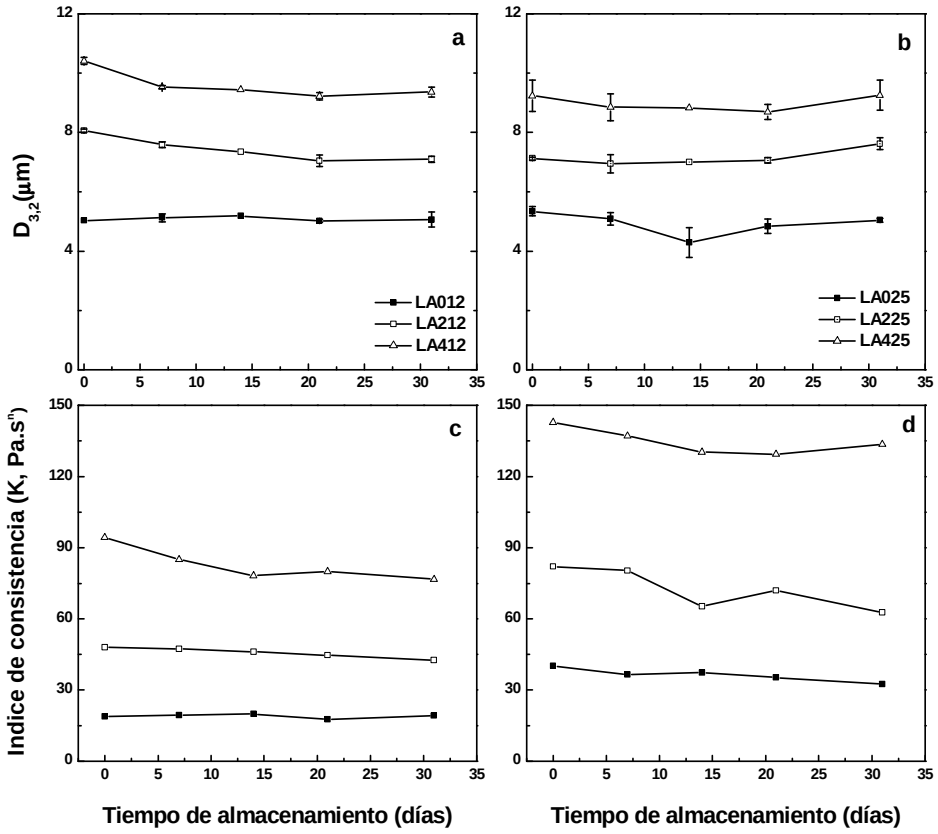


Figura 3. Efecto del almacenamiento refrigerado (7,5 ± 0,5°C) sobre el diámetro promedio de partícula ($D_{3,2}$) y el índice de consistencia (K) de las emulsiones elaboradas con dispersiones acuosas de levadura *S. cerevisiae*: a y c) 12% p/p de aceite en la formulación (ϕ_m = 0,12); b y d) 25% p/p de aceite (ϕ_m = 0,25). Los valores son el promedio de al menos dos determinaciones.

En trabajos previos se ha informado que la evaluación de las características reológicas teniendo en cuenta sólo el comportamiento de flujo no es suficiente para realizar una diferenciación entre muestras desde el punto de vista sensorial. Un panelista puede percibir diferencias, aun cuando dos aderezos tienen viscosidades similares, por lo que se requiere ensayos de caracterización reológicas más completos (Peressini *et al.* 1998). En este contexto, Maruyama *et al.* (2007), trabajando con mayonesas de igual formulación y distintas condiciones de procesado, lograron establecer una correlación entre los parámetros reológicos (propiedades de flujo, comportamiento viscoelástico), el tamaño de partícula y la textura percibida a través de un análisis sensorial. En futuras investigaciones se emprenderá un estudio reológico más detallado de los aderezos a base de levadura para complementar la información suministrada por los ensayos de viscosidad.

CONCLUSIONES

Las dispersiones acuosas de levadura, obtenidas a partir de una suspensión de células por proceso de ruptura a alta presión en medio alcalino (previa inactivación enzimática y reducción en el contenido de ARN) tienen excelentes propiedades emulsificantes - atribuibles principalmente a mananoproteínas provenientes de la pared celular- lo que permite su utilización en la preparación de emulsiones símil-aderezos de alta estabilidad frente a la separación gravitacional y la coalescencia durante el almacenamiento refrigerado. Por variación en el contenido de almidón y de aceite pueden lograrse aderezos con una viscosidad similar y un contenido proteico significativamente mayor al de las mayonesas comerciales tradicionales *full fat* y de contenido lipídico reducido. Las proteínas de levadura, obtenidas a partir de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* como subproducto industrial, representan una interesante alternativa, al igual que algunas proteínas vegetales como las de soja, para la formulación de emulsiones símil-mayonesas como sustituto de huevo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, PICTO-UNQ 2006 34673: Ingredientes con propiedades funcionales de fuentes no convencionales para la industria alimentaria) y a la Universidad Nacional de Quilmes (Programa I+D: Investigaciones aplicadas al desarrollo del sector alimentario) por el apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barriga JAT, Cooper DG, Idziak, ES, Cameron DR. 1999. Components of bioemulsifier from *S. cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 96-102.

Cunniff P. 1997. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. Sixteenth edition, third revision. Gaithersburg: AOAC International.

Depree JA, Savage GP. 2001. Physical and flavour stability of mayonnaise. Trends in Food Science and Technology, 12:157-163.

Ford LD, Borwankar R, Martin Jr. RW, Holcomb DN. Dressing and sauces. En: Friberg SE, Larsson K, editores. Food Emulsions. Third edition, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc. pag 361-412.

Ghoush MA, Samhouri M, Al-Holy M, Herald T. 2008. Formulation and fuzzy modeling of emulsion stability and viscosity of a gum-protein emulsifier in a model mayonnaise system. Journal of Food Engineering, 84: 348-357.

Lorenzo G, Zaritzky N, Califano A. 2008. Modeling rheological properties of low-in-fat o/w emulsions stabilized with xhantan/guar mixtures. Food Research International, 41: 487-494.

Ma L, Barbosa-Cánovas, GV. 1995. Rheological characterization of mayonnaise. Part 2: flow and viscoelastic properties at different oil and xhantan gum concentration. Journal of Food Engineering, 25: 409-425.

Maruyama K, Sakashita T, Hagura Y, Suzuki K. 2007. Relationship between rheology, particle size and texture of mayonnaise. Food Science and Technology Research, 13: 1-6.

McClements DJ. 1999. Food emulsions: principles, practice and techniques. Boca Ratton: CRC Press.

Moro, JE, Franco JM, Gallegos C. 2002. Rheological properties of cholesterol-reduced yolk-stabilized mayonnaise. Journal of the American Oil Chemists' Society, 79: 837-843.

Otero MA, Vasallo MC, Verdecia O, Fernández M, Betancourt D. 1996. A process for the complete fractionation of baker's yeast. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 67:67-71.

Sceni P, Palazolo GG, Vasallo MC, Puppo MC, Otero MA, Wagner JR. 2009. Thermal and surface behavior of yeast protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*. Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie, 42:1098-1106.

Torabizadeh H, Shojaosadati SA, Tehrani, HA. 1996. Preparation and characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie, 29:734-737.

Vasallo MC, Puppo MC, Palazolo GG, Otero MA, Beress L, Wagner JR. 2006. Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*: surface and emulsifying properties. Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie, 39:729-739.

Worrasinchai S, Suphantharika M, Pinjai S, Jammong P. 2006. β-glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. Food Hydrocolloids, 20: 68-78.

Insoluble fiber enriched pasta

Obtención de pastas con alto contenido de fibra

Bustos MC (1), Pérez GT (1), León AE (1)

(1) CONICET - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
mcbustos@fcq.unc.edu.ar

ABSTRACT

The development of dietary fiber enriched foods permit to obtain products with functional properties related with prevention of many chronic diseases related with diet. These modifications in pasta formulation can cause several problems in pasta quality, so that, is important that more research focus in how fiber incorporation affect quality, structure and properties of final product. The aim of this work was to study the quality of pasta prepared by replacement of bread wheat flour with oat fiber (OF), resistant starch type II (RSII) and resistant starch type IV (RSIV) with the purpose of improve their nutritional quality. OF, RSII and RSIV were substituted for a portion of bread wheat flour at levels of 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0%, resulting OF2.5, OF5.0, OF7.5, OF10.0, RSII2.5, RSII5.0, RSII7.5, RS10.0, RSIV2.5, RSIV5.0, RSIV7.5 and RSIV10.0 respectively. A bread wheat flour pasta was analyzed as control sample. Pasta was prepared from 50g of flour, 500mg of NaCl and water until appearance, sheeting and handling properties of pasta dough was reach through trial and error. After lamination of pasta dough, it was cut through cutting rolls into strips approximately 2mm wide and 15cm long, and dried in to steps: 30 °C for 30min and 45 °C at 75% RH for 17.5h. Optimum cooking time (OCT), water absorption, swelling index, cooking loss and volume coefficient of pasta were measured. Finally, protein losses during cooking and total dietary fiber were analyzed to evaluate nutritional properties of enriched pasta. RSII enriched pasta showed a decrease in OCT. Water absorption decreased compared to control while the concentration of RSII and RSIV increased, showing a positive effect in pasta quality. Pasta with OF showed an increase in cooking losses, while RSII had the lowest values. The addition of OF in pasta resulted in an increased swelling index but significantly low compared to control, RSII and RSIV show the opposite tendency. Volume coefficient for pastas with OF and RSII presented a decrease compared to control, ARIV had increased volume but significantly low than control. The highest losses in proteins during cooking was observed for OF10.0, while at inferior levels of substitution the values were lower than control, in ARIV enriched pasta had the lowest protein losses. Addition of the three types of insoluble dietary fiber cause a significant increase in total dietary fiber content compared to control, reaching 14% for OF10.0. The results obtain in the present work prove that is possible elaborate pasta with acceptable cooking quality with 10% of fiber addition, so that, covering the 50% of DRI.

RESUMEN

El desarrollo de alimentos con agregado de fibra dietaria, permite obtener productos con propiedades funcionales relacionadas con la prevención de distintas enfermedades crónicas no transmisibles. Estas modificaciones en la formulación pueden acarrear problemas en la calidad tecnológica de las pastas, por lo que es imprescindible profundizar los estudios sobre cómo afectan su calidad, estructura y propiedades. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la calidad de pastas obtenidas por reemplazo de harina de trigo con fibra de avena (OF), almidón resistente tipo II (RSII), y almidón resistente tipo IV (RSIV), con la intención de mejorar las propiedades saludables del producto. La harina de trigo fue sustituida en los siguientes porcentajes: 2,5, 5,0, 7,5 y 10,0%, obteniéndose OF2,5, OF5,0, OF7,5, OF10,0, RSII2,5, RSII5,0, RSII7,5, RSII10,0, RSIV2,5, RSIV5,0, RSIV7,5 y RSIV10,0 respectivamente. Como control (Ctl), se analizó una muestra sin sustitución. La pasta fue preparada a partir de 50 g de harina, con cantidad de agua óptima, determinada experimentalmente, y 500 mg de NaCl. La masa fue laminada y cortada en piezas de aproximadamente 2 mm de ancho y 15 cm de largo, que se secaron a 45 *ºC* con 75% de humedad relativa por 18 h. La pasta se cocinó en agua hirviendo en una relación 1/10. Sobre la pasta cocida se determinó tiempo óptimo de cocción (TOC), absorción de agua, residuo de cocción, índice de hinchamiento y coeficiente de volumen. Las

modificaciones en la calidad nutricional se evaluaron mediante la determinación del contenido de fibra dietaria y la pérdida de proteínas en la cocción. Las pastas con incorporación de RSII presentaron una disminución en el TOC. Los valores de absorción de agua disminuyen respecto del Ctl a medida que se adiciona RSII y RSIV, resultando en un efecto positivo sobre la calidad de la pasta. Las pastas con OF aumentaron significativamente el residuo de cocción, mientras que RSII muestra valores menores a Ctl. Cuando se agregó OF se obtuvo un índice de hinchamiento mayor a medida que aumenta la incorporación, pero resultan significativamente menores al Ctl, mientras que para RSII y RSIV se muestra la tendencia contraria. El coeficiente de volumen para pastas con OF y RSII presenta una disminución respecto del Ctl, para RSIV se observa un aumento del volumen pero significativamente menores al Ctl. Las mayores pérdidas de proteínas se observaron en OF10,0, mientras que a menores porcentajes de sustitución los valores encontrados son menores al Ctl; en las pastas con RSIV se encontraron las menores pérdidas de proteínas. Respecto de los valores de fibra dietaria, la adición de los tres tipos de fibras, muestra un incremento significativo respecto del Ctl, llegando hasta 14%. Los presentes resultados demuestran que es posible obtener pasta de una calidad aceptable, con hasta un 10% de incorporación de fibra, cubriendo de esta manera el 50% de la dosis diaria recomendada.

KEYWORDS: *pasta, dietary fiber, resistant starch, oat fiber.*

PALABRAS CLAVE: *pasta, fibra dietaria, almidón resistente, fibra de avena.*

INTRODUCTION

Pasta has very special characteristics and compositional qualities that allow it to be in an important place in modern societies daily diets (Sozer *et al.* 2007). Easy for cooking (Brenan *et al.* 2004) and storage, low glycemic food product (Tudorica *et al.* 2002), low in sodium, fat with no cholesterol and a rich source of complex carbohydrates (Chillo *et al.* 2008) are some of the most important of those characteristics.

Dietary fiber has been identified as an important component of a healthy diet. Dietary fiber is defined as the components of plants cells that resist digestion by human digestion enzymes, such components include cellulose, hemicellusose, lignin, inulin, resistant starch and other constituents distributed in the bran and starchy endosperm parts of the grain (Lunn and Buttriss 2007). Consumption of these components has been associated with reduced risk of chronic diseases (Liu *et al.* 1999, Charalampopoulos *et al.* 2002, Topping 2007, Shahidi 2008). But particularly the insoluble fraction of dietary fiber has been associated with reduced risk in diabetes (Meyer *et al.* 2000) and coronary heart disease (Jenkins *et al.* 2000).

RS is defined as that fraction of dietary starch, which escapes digestion in the small intestine. It is divided into 4 fractions: RS1, RS2, RS3, and RS4. These are also called as type I, II, III, and IV starches (Sajilata *et al.* 2006). Resistant starch type I is resistant because it is in a physically inaccessible form. Resistant starch type II is in a certain granular form that is resistant to enzyme digestion. The types I and II represent residues of starch forms, which are digested very slowly and incompletely in the small intestine. Type III resistant starch is the most resistant and is mainly retrograded amylose formed during cooling of gelatinizated starch. Resistant starch type IV is the one where novel chemical bonds other than α-(1-4) or α-(1-6) are formed (Sajilata 2006).

Hull-Oat fiber contains β- glucans (~25%), arabinoxylans and klason lignin (~50%) (Manthey *et al.* 1999). β-glucan is a group of linear polymers of glucose molecules linked by 70% of β-(1–4) and 30% of β-(1–3)–linkages (Liu 2007). Lignin is a phenolic compound with a very complex structure, relatively hydrophobic and it is consider insoluble dietary fiber (Liu 2007).

In pasta particularly, it is possible to vary the choice of the ingredients involved in the manufacture to obtain a wide range of pasta products (Fardet *et al.* 1998). So that, it is important to evaluate how any change in formulation affect cooking properties, which are an important factor that influence consumer acceptance and product quality (Lee *et al.* 2002).

Formulating pasta with dietary fiber produces modifications in the food that may cause many problems in the quality of the final product, in consequence more research have to be done to better understand how different fiber additions affect pasta quality, cooking properties and texture.

The main objective of this work was to study the quality of the pasta formulated with three different type of dietary fiber: resistant starch type II, resistant starch type IV and oat fiber, in order to obtain a final product with improve in healthy properties.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Wheat flour (Tiranti SA, Argentina) from 2005 season was supplied commercially.

Resistant starch type II (Hi maize 260) and resistant starch type IV (Novelose 480) were supplied by National Starch. RSII is high amylose maize starch and RSIV is defined as phosphated distarch phosphate, a cross-linked starch. Oat fiber (Canadian Harvest® Oat Fibers 200/58 series, Sunopta USA) was supplied by Saporiti SA, Argentina.

Flour composition. Moisture content of wheat flour was determined by oven drying for 2 h at 130 °C (AACC 44.15 A 1995). Protein content was determined by the Kjeldahl method and the nitrogen conversion factor used was 5.7 (AACC 46-30 1995). Ash content was determined at 600 °C (AACC 08-01 1995). Total dietary fiber content (AOAC 985.29 1998), and lipids content (AACC 32-26 1995) was also determined. All analyses were performed in duplicate.

Pasta Making. Pasta was made using commercial wheat flour, water, and three types of insoluble dietary fiber. Resistant starch type II (RSII) and type IV (RSIV), and oat fiber (OF) were incorporated into recipes by replacing wheat flour in four proportions (w/w): 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0%, resulting OF2.5, OF5.0, OF7.5, OF10.0, RSII2.5, RSII5.0, RSII7.5, RSII10.0, RSIV2.5, RSIV5.0, RSIV7.5 and RSIV10.0 samples, respectively. An additional sample with no fiber included was also prepared as a control (Ctl). Pasta was prepared from 50 g of flour, 500 mg of NaCl and distilled water until appearance, sheeting and handling properties of pasta was reach through trial and error to produce a visually optimum dough prior lamination. The crumbly dough was rested in a closed bag for 10 min before lamination. The dough was sheeted using a laboratory shetting machine: after the first pass (rollgap 3mm) the dough was folded once, passed through the same gap, after doing this seven times, five more reductions were made and the final passing was through a roll obtaining a sheet with stickiness equal to 0.90 mm, then it was cut through cutting rolls into strips approximately 2 mm wide and 15 cm long. Pasta was then dried at low temperature, in two steps, the first one was 30min at 30 °C without controlling humidity in a air convection drier, the second step was perform at 45° C in a humidity-controlled (75%) drier for 17.5 h. The samples were wrapped in cling film, stored in airtight containers, at room temperature until needed.

Pasta quality parameters

Cooking procedure. All cooking tests were performed in duplicate. Pasta (4 g) was broken into pieces of 5 cm and cooked in boiling distilled water (200 ml). Boiling was kept at this level for the entire cooking period. The Optimum cooking time was determined as the time until the inner white core of the pasta disappeared after cross-cutting it with a razor blade according to AACC 16-50 (1995) and/or by compressing the pasta between two glass slides in 30 seconds intervals. After cooking and draining, the samples were analyzed for swelling index, volume coefficient, water absorption, total dietary fiber and proteins losses. Cooking water was used for determination of cooking losses.

Swelling index of cooked pasta (grams of water per gram of dry pasta) was evaluated by drying pasta samples to constant weight at 105 °C, expressed as [weight of cooked product (*W*1) – weight after drying (*W*2)]/weight after drying (*W*2) (Tudorică *et al.* 2002).

Volume coefficient of cooked pasta was determined as [volume of cooked product (V1)/Volume raw product (V2)]*weight raw product (*W*3).

Water absorption of drained pasta was determined as [[weight of cooked pasta (*W*1) - weight of raw pasta (*W*3)]/weight of raw pasta (*W*3)] x 100 (Tudorică *et al.* 2002).

Cooking loss in the cooking water collected from each sample was determined by evaporation to constant weight in an air oven at 105 °C. The residue was weighed and reported as percentage of the original pasta sample (Tudorică *et al.* 2002).

Nutritional parameters

Total dietary fiber. Duplicate test portions of dried pasta samples were gelatinized with heat-stable alpha-amylase and then enzymatically digested with protease and amyloglucosidase to remove protein and starch. Total dietary fiber (TDF) was precipitated by adding 95% ethanol, then the precipitated is

filtered and washed with 78% ethanol, 95% ethanol and acetone; dried and weighed. One duplicate was analyzed for protein and the other was incinerated at 525° C to determine ash. The TDF was determined as the weight of the filtered and dried residue less the weight of the protein and ash according to AOAC 985.29 (1998). Two replicates from two different sets of lamination were analyzed.

Protein Losses of was determined as follows: protein content of uncooked pasta (PU) was calculated from wheat flour protein content, this value was used to estimate the protein content of cooked pasta if no protein was leached to cooking water, while protein content of cooked pasta (PC) was determined by Kjeldahl method and the nitrogen conversion factor used was 5.7; the protein losses was expressed as [((100* PU)/(100- Cooking loss in sample))-PC)] in dry basis.

Statistical Analysis

Results were expressed as the mean of replications ± SD. Analysis of variance (one way ANOVA) followed by Fisher´s test using the InfoStat Statistical Software (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina) were performed for statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Flour composition

The results obtained for all the analyses performed are shown in **Table 1**.

Table 1 – Flour composition (%, in dry basis).

Moisture content	Protein	Ash	Total dietary fiber
12.38 ± 0.07	10.6 ± 0.2	0.54 ± 0.01	5.7 ± 0.4

Pasta quality parameters

Cooking properties of the wheat flour pasta control and the fiber enriched pasta are shown in **Table 2**.

Table 2 – Cooking properties of fiber enriched pasta.

Sample/ Fiber addition (g/100gr)		Water absorption	Swelling index	Cooking Losses	Volume coefficient
Control	0	164 ± 3^{f}	2.15 ± 0.00^{h}	6.1 ± 0.1^{ef}	6.00 ± 0.04^{f}
RSII	2.5	150 ± 5^{cd}	2.03 ± 0.01^{e}	6.2 ± 0.2^{fg}	5.94 ± 0.01^{de}
	5.0	148 ± 2^{bc}	1.98 ± 0.02^{d}	5.5 ± 0.2^{ab}	5.87 ± 0.01^{bcd}
	7.5	145 ± 3^{b}	1.96 ± 0.00^{d}	5.5 ± 0.2^{b}	5.84 ± 0.03^{de}
	10.0	136 ± 3^{a}	1.85 ± 0.00^{a}	5.3 ± 0.2^{a}	5.82 ± 0.03^{a}
RSIV	2.5	152 ± 3^{de}	1.96 ± 0.00^{d}	5.8 ± 0.1^{cd}	5.80 ± 0.01^{a}
	5.0	144 ± 2^{b}	1.91 ± 0.00^{c}	6.0 ± 0.1^{def}	5.81 ± 0.01^{a}
	7.5	139 ± 3^{a}	1.86 ± 0.02^{ab}	5.9 ± 0.1^{cde}	5.94 ± 0.02^{de}
	10.0	138 ± 3^{a}	1.86 ± 0.00^{ab}	5.7 ± 0.1^{bc}	5.92 ± 0.02^{cde}
OF	2.5	155 ± 4^{e}	1.87 ± 0.01^{b}	6.0 ± 0.0^{def}	6.02 ± 0.01^{f}
	5.0	150 ± 2^{cd}	1.98 ± 0.01^{d}	5.7 ± 0.1^{b}	5.94 ± 0.01^{e}
	7.5	151 ± 3^{de}	2.05 ± 0.01^{f}	6.3 ± 0.2^{g}	5.87 ± 0.01^{b}
	10.0	155 ± 3^{e}	2.09 ± 0.01^{g}	6.8 ± 0.1^{h}	5.87 ± 0.02^{bc}

[a] Means ± SD. Within columns means with the same subscript are not significantly different ($P < 0.05$).

All insoluble fiber enriched pasta showed decreased in water absorption and swelling index compared to control. The inclusion of both types of resistant starches (RSII and RSIV) showed a significantly decreased in water absorption and swelling index while the concentration of fiber increased, this agrees with the fact that resistant starches have a lower water holding capacity than other fibers (Nugent 2005). Results for oat fiber showed the highest water absorption and swelling index values (in both cases less than control). In this case, at low concentrations (2,5 and 5,0%) the water absorption of oat fiber enriched pasta decreased and at highest concentrations (7,5 and 10,0%) a generally tendency to increased was observed. The swelling index showed a significant increased as fiber addition increased, probably due to the high water holding capacity, characteristic of this fiber (Manthey *et al.* 1999).

Cooking loss is one of the most important parameter that affect consumer acceptance in this type of products, so that it is use as a predictor of overall cooking performance of pasta. Resistant starch type II containing pasta showed the lowest values in cooking losses, and for volume coefficient. A progressive and significant reduction in cooking losses and a general trend to decrease pasta volume coefficient with increasing fiber concentration was observed. This observations could indicates a strong interaction among the hydrated polysaccharide network and the protein- starch matrix, encapsulating it; so that the structure became more compact, and the diffusion of amylose to the cooking water is restricted.

Cooking losses for pasta with resistant starch type IV were similar to control (only 2.5% and 10% were significant different). However, the volume coefficient showed a significant increased (Anova, P= 0,0009). In these case the results could be explained that the interactions between fiber added and the protein-starch matrix are not strong like in the case of RSII, but are still enough to encapsulate the native starch, inhibiting the diffusion of solids to cooking water.

The differences found between the two types of resistant starches could be explain by the fact that RSII (high amylose maize starch) has a similar structure to native starch, so it integrates very well to the structure of pasta, even that it contributes to strength it. In the other hand, RSIV is a crosslinked starch so, it could not interact so well, and many empty spaces were generated in the protein- starch matrix when the fiber was added into pasta formulation.

Oat fiber enriched pasta had a different behavior in cooking losses compared with RSII and RSIV; at 2.5% and 5.0% the values are significantly lower than control, and at 7.5% and 10.0%, the cooking loss increase (Anova, P□0.001). In regard, a significant decrease in pasta volume coefficient was observed at low concentrations (Anova, P=0.02). One hypothesis that could explain how oat fiber affects cooking properties of pasta is that at low concentrations the fiber incorporates into the protein-starch matrix, so the polysaccharides integrate in the structure of pasta, forming a network around starch granules, encapsulating them during cooking; in consequence swelling of starch and the diffuse of amylose to the cooking water are restricted. In regard, a decreased in water absorption was observed until 5% of substitution. At greater degree of substitution, the quantity of oat fiber became important and the water absorption increase, probably due to it forms a semisolid network that became discrete considering the protein-starch fraction, so that the inclusion of the fiber into the structure generates a disruption of protein- starch matrix (structure more porous). So that the starch granules uncovered and more exposed can absorbed more water and the cooking losses increased.

Considering the three types of fiber, all of them apparently affect the structure of pasta, so that the cooking properties and quality of final product. The RSII showed the lowest cooking losses, which is one of the most important quality parameter for consumers; RSIV addition did not affect the cooking properties compared with the control and oat fiber enriched pasta showed good cooking properties until 5% of addition (low water absorption and cooking losses).

Nutritional parameters

Nutritional quality of fiber enriched pasta was evaluated by two different assays, total dietary fiber content and proteins losses during cooking (**Fig. 1 and 2**).

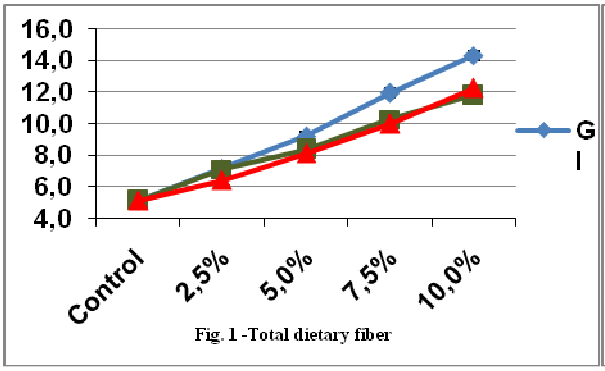


Figure 1. Total dietary fiber.

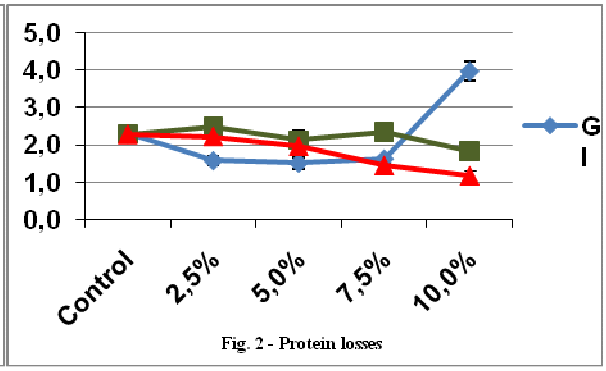


Figure 2. Protein losses.

Total dietary fiber contents of the three different types of fiber added, were 51.1% for RSII, 67.8% for RSIV and 86.2% for oat fiber. Addition of three different types of insoluble dietary fiber results in a significantly increased in total dietary fiber contents compared to control.
RSII enriched pasta showed protein losses not significantly different from control (except 10%). This agrees with the idea that resistant starch increased cooking quality of pasta, inhibiting the leaching of proteins to cooking water.
Pasta with resistant starch chemically modified showed a decreased in protein losses with increased level of substitution. This may be because the RSIV integrate in the structure encapsulating the native starch, which agrees with the results obtained for cooking properties.
Oat fiber enriched pasta showed, at low degree of substitution (2.5, 5.0 and 7.5%), low protein losses during cooking compared to control (Anova, P□0.001), may be due to this type of fiber integrate so well to the protein- starch matrix. At 10% of substitution the protein losses increased dramatically probably because the fiber added generate a disruption in the protein network. All these observations agree with the results obtain in the evaluation of cooking properties.

CONCLUSION

This study appears to confirm that inclusion of oat fiber into pasta leads to a disruption of protein-starch matrix, affecting the quality of final product. Conversely, despite resistant starches are considering insoluble dietary fiber, inclusion into pasta, results in the encapsulation of native starch granules within a protein-fiber-starch network, so that is possible to improve the quality of final product. Even that, total dietary fiber content of pasta with 10% of any of this insoluble fibers cover around the 50% of the dietary reference intakes for fiber.
Considering the physiological effects of insoluble fiber, incorporation into pasta has the potential to regulate glycemic response without compromising the quality of final product. Further work is required to identify clearly the interactions between insoluble fiber and protein-starch matrix, and how this affects starch degradation and reduction in glucose release.

REFERENCES

American Association of Cereal Chemistry. 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th Ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.

Association of Official Analytical Chemists. (AOAC). 1998. 16th ed. Official methods of analysis.
Brennan CS, Kuri V and Tudorica CM. 2004. Inulin-enriched pasta: effects on textural properties and starch degradation. Food Chemistry, 86:189–193.

Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS and Webb C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. International Journal of Food Microbiology, 79:131– 141.

Chillo S, Laverse J, Falcone PM, Protopapa A and Del Nobile MA. 2008. Influence of the addition of buckwheat flour and durum wheat bran on spaghetti quality. Journal of Cereal Science, 47:144–152.

Fardet A, Hoebler C, Baldwin PM, Bouchet B, Gallant DJ and Barry JL. 1998. Involvement of the Protein Network in the in vitro Degradation of Starch from Spaghetti and Lasagne: a Microscopic and Enzymic Study. Journal of Cereal Science, 27: 133–145.

Jenkins DJA, Axelsen M, Kendall CW, Augustin LSA, Vuksan V and Smith U. 2000. Dietary fibre, lente carbohydrates and the insulin-resistant diseases. British Journal of Nutrition, 83(1):157–163.

Lee SJ, Rha M, Koh W, Park W, Lee C, Kwon YA and Hwang J. 2002. Measurement of Cooked Noodle Stickiness Using a Modified Instrumental Method. Cereal Chemistry, 79(6):838–842.

Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Hennekens CH and Willett WC. 1999. Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. The American Journal of Clinical Nutrition, 70:412–9.

Liu R. H. 2007. Whole grain phytochemicals and health. Journal of Cereal Science, 46:207–219.

Lunn J and Buttriss JL. 2007. Carbohydrates and dietary fibre. British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 32:21–64.

Manthey FA, Hareland GA and Huseby DJ. 1999. Soluble and Insoluble Dietary Fiber Content and Composition in Oat. Cereal Chemistry, 76(3):417–420.

Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR Jr, Slavin J, Sellers TA and Folsom AR. 2000. Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. American Journal of Clinical Nutrition, 71:921–30.

Nugent AP. 2005. Health properties of resistant starch. British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 30:27–54.

Sajilata MG, Singhal RS, and Kulkarni PR. 2006. Resistant starch- a review. Comprehensive reviews in food science and food safety, 5:1-17.

Shahidi F. 2008. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. Trends in Food Science & Technology, xx:1-12

Sozer N, Dalgıç AC and Kaya A. 2007. Thermal, textural and cooking properties of spaghetti enriched with resistant starch. Journal of Food Engineering, 81:476–484.

Topping D. 2007. Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. Journal of Cereal Science, 46: 220–229.

Tudorica CM, Kuri V and Brennan CS. 2002. Nutritional and Physicochemical Characteristics of Dietary Fiber Enriched Pasta. Journal of Agricultural Food Chemistry, 50:347-356.

Lecitinas hidrolizadas de girasol. Obtención y aplicación en emulsiones aceite en agua (O/W)

Obtaining and use of sunflower hydrolyzed lecithins in oil/water (O/W) emulsions

Cabezas DM (1), Madoery R (2), Tomás MC (1)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) – CCT La Plata (CONICET) – FCE – UNLP
(2) Cátedra de Química Orgánica – FCA – UNC
77.dario@gmail.com

RESUMEN

Las lecitinas son una mezcla compleja de fosfolípidos -principalmente fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI)-, glicolípidos, carbohidratos y aceite. Si bien las lecitinas de soja lideran el mercado, el empleo de las lecitinas de girasol podría representar una alternativa interesante dado que son un producto no GMO y poseen rangos similares en la distribución de sus fosfolípidos mayoritarios. La introducción de cambios en la concentración relativa de estos componentes, mediante procesos de hidrólisis enzimática, puede originar lecitinas modificadas de mayor funcionalidad para la manufactura de diversos productos (margarinas, productos de panadería y emulsiones alimentarias). El objetivo de este trabajo fue investigar la aplicación de lecitinas hidrolizadas de girasol como agente emulsificante en sistemas O/W. Para ello, la lecitina nativa de girasol fue sometida a una hidrólisis enzimática utilizando una fosfolipasa A_2 (Lecitase 10 L, Novo Nordisk). El proceso de hidrólisis se llevó a cabo -a escala laboratorio- en un reactor termostatizado con agitación continua (50 rev/min) a 60 *ºC*, 5 h. Se colocaron 27 g de lecitina, 18 ml de $CaCl_2$ 0.4 M y 0,54 ml de la enzima ajustando el pH inicial a 7 y 9, respectivamente, con eliminación posterior del aceite residual (deoiling). Las lecitinas hidrolizadas fueron utilizadas en la formulación de emulsiones O/W (30:70 p/p) en un rango de concentraciones de 0,1 - 2.0% con respecto a la fase acuosa, mediante la homogeneización en Ultraturrax T25 (10.000 rpm, 1 min). Por otra parte, lecitina hidrolizada de soja (Solec K-EML, Solae Company) y lecitina nativa de girasol sin aceite, fueron utilizadas en las mismas condiciones con fines comparativos, estudiando la estabilidad de las distintas emulsiones mediante su caracterización óptica en función del tiempo con un analizador vertical de barrido (Quick Scan). Las emulsiones obtenidas con lecitinas hidrolizadas a pH 7 y 9 (LH7 y LH9) presentaron un aumento de su estabilidad hasta niveles de concentración de 0,5%, disminuyendo levemente esta capacidad –en ambos casos- entre 1 - 2%. Estas emulsiones exhibieron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en este parámetro con respecto a las obtenidas con lecitina nativa de girasol en todas las concentraciones estudiadas. Con respecto a la lecitina hidrolizada de soja, no presentaron diferencias a niveles de concentraciones 0,1 – 0,5%, aunque ciertas diferencias se evidenciaron a mayores concentraciones. La conversión de fosfolípidos a lisofosfolípidos por hidrólisis enzimática así como el aumento del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) serían los responsables del aumento del poder emulsificante asociado a las lecitinas hidrolizadas obtenidas frente a la lecitina nativa de girasol, lo cual les confiere una alta potencialidad como emulsificante a nivel industrial.

ABSTRACT

Lecithins are a complex mixture of phospholipids – mainly phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI)-, glycolipids, carbohydrates and oil. Although soybean lecithins are leader of the market, the use of sunflower lecithins could be an interesting alternative because they are non-GMO products and the distribution of their main phospholipids is similar to soybean lecithins. The introduction of changes in the relative concentration of these compounds by enzymatic hydrolysis, can originate modified lecithins with a high functionality, which could be used for the manufacturing of several products (margarines, bakery products, food emulsions). The aim of this work was to investigate the application of sunflower hydrolysed lecithins as emulsifying agent in O/W systems. Native Sunflower lecithin was used asa a

substrate of enzymatic hydrolysis using an A_2 phopholipase (Lecitase 10 L, Novo Nordisk). The hydrolysis process was carried out –at a laboratory scale- in a thermostatized reactor with continuous agitation (50 rpm) at 60 *ºC*, 5 h Lecithin (27 g), $CaCl_2$ 0.4 M (18 ml) and the enzyme (0.54 ml) were placed in the reactor, adjusting the initial pH to 7 (LH7) and 9 (LH9), with a subsequent elimination of residual oil (deoiling). The hydrolysed lecithins were used in the formulation of O/W emulsions (30:70 w/w) in a range of concentrations (0.1 - 2.0% with respect to the aqueous phase) with the homogenization in an Ultraturrax T25 homogenizer (10,000 rpm, 1 min). On the other hand, soybean hydrolysed lecithin (Solec K-EML, Solae Company) and native sunflower lecithin deoiled, were used in the same operative conditions, studying the stability of the different emulsions through their optical characterization time-dependent with a vertical scan analyzer (Quick Scan). The emulsions obtained with LH7 and LH9 showed an increase of their stability at 0.5%, with a slight decrease of this capacity –in both cases – between 1 – 2%. These emulsions showed highly significant differences ($p < 0.01$) in this parameter with respect to those obtained with native sunflower lecithin in all concentrations studied. Regarding soybean hydrolysed lecithin, significant differences ($p < 0.01$) were found at concentrations greater than 0.5% but not in the range of 0.1 – 0.5% ($p > 0.05$).The conversion of phospholipids to lisophospholipids by enzymatic hydrolysis and the increase of the hydrophilic – lipophilic balance (HLB) would be the responsible of the high emulsifying properties of the hydrolysed lecithins with respect to the native sunflower lecithins, which gives a high potential as an emulsifier to industrial scale.

PALABRAS CLAVE: *hidrólisis enzimática, lecitinas de girasol, lisofosfolípidos, emulsiones O/W.*

KEYWORDS: *enzymatic hydrolisis, sunflower lecithin, lysophospholipid, O/W emulsions.*

INTRODUCCIÓN

Las lecitinas son una mezcla de fosfolípidos insolubles en acetona. Están constituidas principalmente por fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y en menor proporción fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA) y otras sustancias (triglicéridos. carbohidratos, etc.). El consumo industrial de las lecitinas se orienta mayoritariamente hacia la industria de los alimentos (margarinas, mayonesas, panificados, caramelos, alimentos deshidratados, productos instantáneos, helados, pastas, etc.) (van Nieuwenhuyzen 1981, Krawczyk 1996). Este subproducto de la industria aceitera es considerado por la FDA como compuesto GRAS (Generally Recognized As Safe) por ser atóxicas, biodegradables y compatibles con el metabolismo humano (Wabel 1998).

Los procesos más utilizados para modificar la composición fosfolipídica de las lecitinas son el fraccionamiento con etanol (Sosada 1993, Wu y Wang 2004, Cabezas *et al.* 2009) y la hidrólisis enzimática (Sas y Peys 2000, Hirai *et al.* 2003, Schitt y Heirman 2005). Estos procesos son de gran interés a nivel industrial debido a que las lecitinas modificadas presentan diferente actividad funcional con respecto a las lecitinas nativas (Joshi *et al.* 2006, van Nieuwenhuyzen y Tomás 2008). La hidrólisis enzimática se lleva a cabo principalmente mediante el uso de dos grupos de lipasas: fosfolipasas y lipasas (Kim *et al.* 2001, D' Arrigo y Servi 1997, Mustranta *et al.* 1995). Las fosfolipasas A_2 son un grupo de enzimas que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos produciendo un ácido graso libre y el correspondiente lisofosfolípido. Los lisofosfolípidos presentan una mayor eficiencia como agentes emulsificantes en sistemas O/W debido a su mayor carácter hidrofílico, siendo además utilizados en la industria panaria al prevenir la retrogradación del almidón (Forssell *et al.* 1994, Joshi 2006).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables desde el punto de vista fisicoquímico. La velocidad a la cual se separan sus fases inmiscibles depende de la composición, la microestructura y las condiciones ambientales. Estas emulsiones constituyen sistemas ampliamente utilizados en la formulación de alimentos (cremas, mantecas, margarinas, algunas sopas, aderezos) por lo cual es fundamental caracterizar y conocer el comportamiento de las mismas frente a distintos procesos de desestabilización (floculación, coalescencia, cremado, etc.) (McClements 1999, Wu y Wang 2004).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un proceso de obtención de lecitinas hidrolizadas de girasol y estudiar sus propiedades funcionales como agente emulsificante en sistemas O/W.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Lecitina nativa de girasol provista por la industria local (Vicentin S.A.I.C.) y fosfolipasa A_2 (Lecitase 10L, Novo Nordisk) de origen porcino pancreático fueron empleados en este estudio. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Proceso de hidrólisis

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en un reactor termostatizado a escala laboratorio. Se colocaron 27 g de lecitina y 18 ml de solución 0,4 M de $CaCl_2$. Se ajustó el pH inicial a pH 7 o pH 9 con el agregado de solución 4 N de NaOH. A continuación la mezcla se termostatizó a 60 *ºC* y se adicionó el inóculo de 0,54 ml de fosfolipasa A_2. El sistema se mantuvo bajo agitación constante durante las 5 horas del proceso (50 rev/min). Luego de la reacción enzimática se sometió al producto de hidrólisis a la eliminación del aceite residual y de la fase acuosa con acetona (deoling) y a un posterior secado bajo vacío. Se obtuvieron dos tipos de lecitinas hidrolizadas de acuerdo al pH inicial: LH7 (pH 7) y LH9 (pH 9), respectivamente.

Composición de fosfolípidos

El análisis composicional de las lecitinas hidrolizadas de girasol (LH7, LH9) fue realizado mediante ^{31}PNMR en los laboratorios de Spectral Service, Köln, Alemania. Esta metodología es considerada actualmente como la herramienta más sofisticada para el análisis cuantitativo de fosfolípidos (Diehl y Ockels 1995, Diehl 1997, 2001). Se analizó además, con fines comparativos, lecitina nativa de girasol y lecitina de soja hidrolizada comercial (Solec K-EML, Solae Company), sometidas -en ambos casos- a un proceso de deoiling.

Preparación de las emulsiones

Se prepararon emulsiones O/W (30:70 p/p) homogeneizadas mediante un equipo Ultraturrax T25 a 10.000 rpm durante 1 minuto. Se adicionaron las diferentes muestras de lecitinas (LH7, LH9, lecitina deoiled, Solec K-EML) en un rango 0,1- 2,0% p/p con respecto a la fase acuosa.

Caracterización óptica de las emulsiones

Las emulsiones fueron caracterizadas ópticamente mediante la utilización de un analizador vertical de barrido (Quick Scan). Este equipo posee una cabeza lectora móvil compuesta por una fuente pulsátil de luz (infrarrojo cercano λ=850 nm) y dos detectores sincrónicos a 0º y a 135º. El detector de transmisión (T) recibe la luz que atraviesa la muestra (0º), mientras que el de *back scattering* (BS), la luz dispersada por la muestra (135º). La cabeza lectora realiza un barrido obteniendo los valores de T y BS en función de la longitud del tubo de muestra, lo que permite determinar los mecanismos y las cinéticas de desestabilización de las emulsiones (Pan *et al.* 2002).

Se realizó un estudio de cada emulsión durante un periodo de 90 minutos con mediciones efectuadas a intervalos de un minuto. Se obtuvieron los perfiles diferenciales de BS en función de la altura de la muestra. A partir de ellos se analizó la variación de los valores medios de BS en la zona inferior del tubo en función del tiempo. Este análisis permitió la comparación de las cinéticas de desestabilización correspondientes a las diferentes emulsiones.

Mediciones del número y distribución de tamaño de partículas

Se realizaron mediciones del número y distribución del tamaño de partícula de las emulsiones a tiempo inicial mediante el empleo de un analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., UK) con un Sistema de dispersión Hydro 2000MU. Se determinaron los diámetros medios de gota en superficie D[3,2] y en volumen D[4,3].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de fosfolípidos

La Tabla 1 muestra la composición porcentual de fosfolípidos de lecitina de girasol sin aceite, lecitinas de girasol hidrolizadas (LH7, LH9) y de lecitina hidrolizada comercial de soja (Solec K-EML) sin aceite. Los resultados obtenidos permiten observar niveles de 21,8% de PC en la lecitina de girasol de partida La presencia del lisofosfolípido correspondiente (2-LPC) y los porcentajes inferiores al 0,1% de PC en las lecitinas de girasol sometidas al proceso de hidrólisis (LH7 y LH9) estarían indicando un grado de hidrólisis cercano al 100% sobre fosfatidilcolina. Además, puede observarse que el proceso de hidrólisis afecto de forma similar a los otros fosfolípidos mayoritarios (PI, PE). La modificación de PE a LPE es considerada una de las ventajas de este proceso ya que, a diferencia del

lisofosfolípido correspondiente, PE es considerado inactivo por su arreglo en la interfase para la formulación de emulsiones O/W (van Nieuwenhuyzen y Tomás 2008). A fin de evaluar la eficiencia del proceso de hidrólisis la relación lisofosfolípidos/fosfolípidos (LPL/PL%) fue determinada. Así, las lecitinas hidrolizadas de girasol LH7 y LH9 presentaron valores elevados de LPL/PL, en un rango del 79-89%, con respecto al correspondiente para la lecitina de girasol (1,7%), lo cual indica un elevado grado de hidrólisis de los PL mayoritarios durante el proceso de modificación estudiado. La lecitina hidrolizada comercial de soja (Solec K-EML) presenta una relación LPL/PL de 38,1% lo cual podría atribuirse a un nivel de hidrólisis inferior en su proceso de producción.

Tabla 1. Composición porcentual de fosfolípidos de diversas lecitinas mediante ^{31}P NMR.

	Lecitina Nativa de Girasol (Deoiled)	**LH7**	**LH9**	**Lecitina comercial de soja (Deoiled) -Solec K-EML-**
PC	21,8	< 0,1	< 0,1	10,8
1-LPC	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,9
2-LPC	0,8	15,1	11,6	8,9
PI	25,5	< 0,1	0,4	11,7
LPI	< 0,1	10,4	6,1	2,2
PE	8,3	0,3	0,5	5,2
LPE	0,3	3,8	2,9	8,3
PA	2,3	< 0,1	1,1	3,1
LPA	< 0,1	1,2	0,7	2,2
LPL totales[a]	1,1	30,5	21,3	22,5
PL Totales[b]	62,8	34,4	26,8	59,1
LPL/PL (%)[c]	1,7	88,5	79,3	38,1

[a] Lisofosfolípidos Totales
[b] Fosfolípidos Totales
[c] Relación porcentual lisofosfolípidos/fosfolípidos

Desestabilización de las emulsiones (O/W)

Las emulsiones formuladas con la adición de las diferentes lecitinas ensayadas mostraron un retardo en el proceso de desestabilización. Los mecanismos de desestabilización fueron estudiados a partir de la evolución del back-scattering (BS) en función del tiempo. El sistema control evidenció un rápido descenso de los valores de BS a lo largo de toda la emulsión. En la zona inferior de la misma (Zona A, Figura 1.a) este descenso se encuentra asociado a un proceso de cremado seguido por una desestabilización de la fase crema por coalescencia (fusión de gotas y disminución del número de gotas) que da origen al descenso de BS en la parte superior de la emulsión (Zona B, Figura 1.a). Las emulsiones formuladas con las lecitinas ensayadas en sus diversas concentraciones exhibieron diferentes cinéticas de desestabilización entre ellas, y a su vez frente a la correspondiente al sistema control. El agregado de lecitinas originó la presencia de una fase crema, la cual fue estable durante el periodo ensayado. Esta característica de la fase crema se encuentra asociada a los valores casi constantes de BS en la Zona B de las emulsiones formuladas con estos emulsificantes. En la **Figura 1**.b se muestra a modo de ejemplo el perfil de BS de una emulsión formulada con LH7 al 0,5%.

El análisis del BS en la zona inferior del tubo (10-20 mm) puede observarse en la **Figura 2**. Las emulsiones formuladas con ambas lecitinas de girasol hidrolizadas (LH7 y LH9) presentaron diferencias significativas en todo el rango de concentraciones con respecto a la lecitina de girasol sin aceite. Las lecitinas de girasol hidrolizadas resultaron ser mejores agentes emulsificantes que la lecitina de girasol nativa utilizada como sustrato. LH7 y LH9 presentaron una creciente actividad emulsificante hasta concentraciones de 0,5% manteniéndose la misma a concentraciones mayores (1-2%), sin registrar diferencias con relación a la lecitina de soja comercial a niveles de 0,1-0,5%.

La **Tabla 2** muestra el análisis de los diámetros de partículas en superficie (D[3,2]) y en volumen (D[4,3]) correspondiente a las diferentes emulsiones formuladas con adición de lecitinas. Ambas

lecitinas hidrolizadas de girasol presentaron gotas de aceite de tamaños similares en todo el rango de concentraciones con respecto a la lecitina hidrolizada de soja comercial. La lecitina de girasol sin aceite presentó valores comparables a LH7 y LH9 solo a concentraciones del 2%.

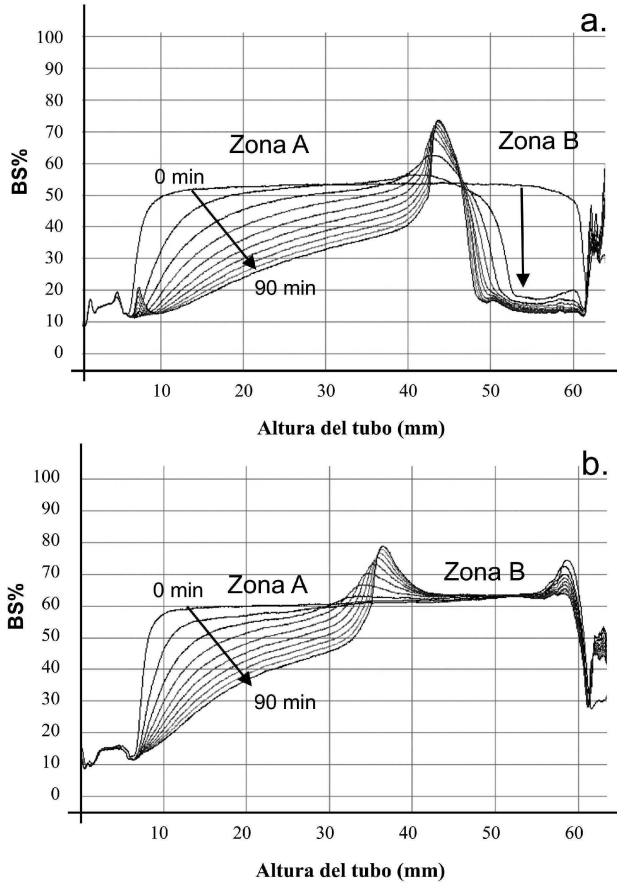


Figura 1. Evolución del back-scattering en función del tiempo para emulsiones O/W. (a) Sistema control aceite:agua (b) Lecitina hidrolizada de girasol LH7, 0.5% (p/p)

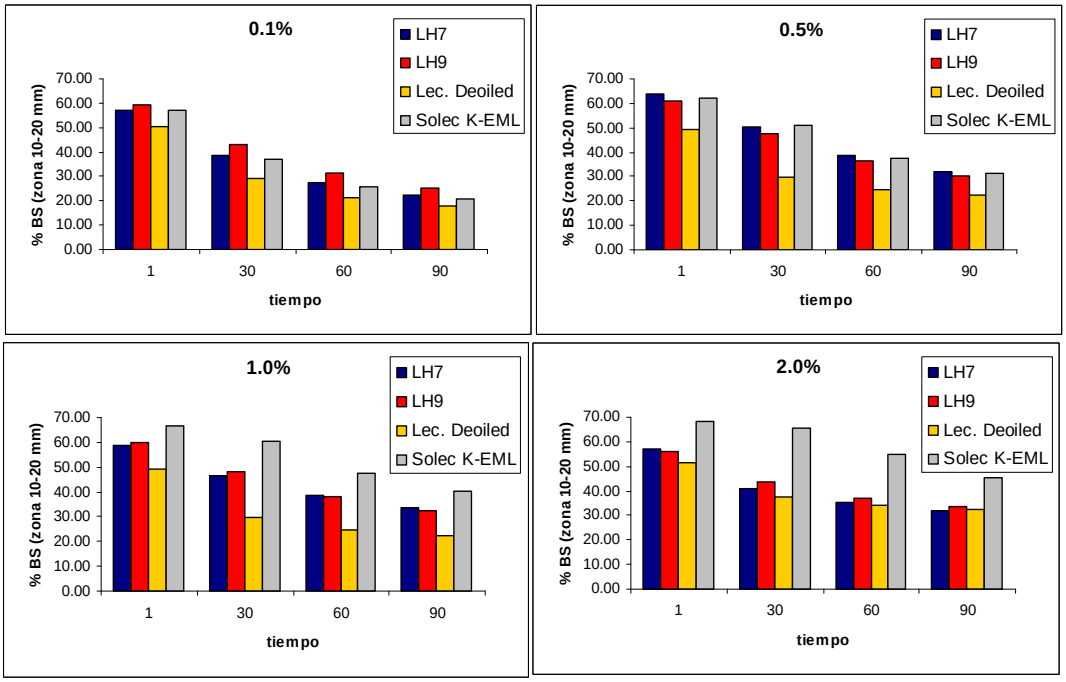


Figura 2. Variación del BS% promedio (zona 10-20mm) en función del tiempo, para emulsiones O/W formuladas con adición de diferentes lecitinas.

Tabla 2. Diámetros de partículas en superficie (D[3,2]) y en volumen (D[4,3]) de emulsiones formuladas con diferentes lecitinas.

Lecitina	Concentración (% p/p)	D[4,3]	D[3,2]
Lecitina Nativa de Girasol (Deoiled)	0,1	70,67	42,60
	0,5	69,42	47,89
	1,0	59,84	40,99
	2,0	45,19	32,75
LH7	0,1	51,40	26,93
	0,5	41,98	23,53
	1,0	44,00	21,00
	2,0	42,21	30,26
LH9	0,1	44,42	28,81
	0,5	38,88	19,86
	1,0	39,17	22,92
	2,0	38,41	22,34
Lecitina hidrolizada comercial de soja (Deoiled)	0,1	48,46	29,63
	0,5	40,53	20,35
	1,0	42,62	21,59
	2,0	33,51	16,32

CONCLUSIÓN

La conversión de fosfolípidos en lisofosfolípidos produce un incremento en el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de las lecitinas modificadas por hidrólisis enzimática debido a su mayor carácter hidrofílico. Este hecho sería el factor responsable del aumento en el poder emulsificante en sistemas O/W. Las mejores propiedades emulsificantes presentadas por las lecitinas de girasol hidrolizadas, LH7 y LH9, con respecto a la lecitina nativa de girasol, indican que el proceso de hidrólisis enzimática constituye una alternativa valida para la producción de nuevos agentes bioemulsificantes. Asimismo, su implementación por parte de la industria aceitera local permitiría aún más la revalorización de este subproducto de la refinación de aceites crudos de girasol.

AGRADECIMIENTOS

- Proyectos de investigación PICT 2002-0910768, PICT 2007-01085 (ANPCyT), PICTO 09-13156 (ANPCyT-ASAGIR) y X502 (Universidad Nacional de La Plata)
- D. Cabezas es becario del CONICET. M. C. Tomás es Investigador Independiente del CONICET
- Willem van Nieuwenhuyzen (ILPS), Bernd Diehl (Spectral Service), Jorge Wagner y Gonzalo Palazolo (UNQ), Néstor Buseguin (Vicentin S.A.I.C.), Sandro Goñi, Vanesa Ixtaina, Eduardo Denisienia y Rodolfo Mascheroni (CIDCA) por la ayuda prestada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cabezas DM, Diehl B, Tomás MC. 2009. Sunflower Lecithin: Application of a Fractionation Process with Absolute Ethanol. Journal of the American Oil Chemists' Society, 86:189-196.

D'Arrigo P, Servi S. 1997. Using phospholipases for phospholipid modification. Trends in Biotechnology, 15:90–96.

Diehl BWK, Ockels W. 1995. Quantitative Analysis of Phospholipids. Characterization, Metabolism and Novel Biological Applications. En Cevc G, Paltauf F, editores. Proceeding of the 6th International Colloquium Phospholipids. Champaign: AOCS Press. Pag 29-32.

Diehl BWK. 1997. Multinuclear high-resolution magnetic resonance spectroscopy. En Hamilton RJ, editor. Lipid Analysis in Oils and Fats. London: Blackie Academic & Professional. Pag 87-135.

Diehl BWK. 2001. High resolution NMR spectroscopy. European Journal of Lipid Science and Technology, 103:830-834.

Forssell P, Shamekh, S, Harkonen H, Poutanen K. 1994. Effects of native and enzymatically hydrolysed soya and oat lecithins in starch phase transitions and bread baking. Journal of the science of food and agriculture, 76:31-38

Hirai H, Sono R, Koh H, inventores; Tsuji Oil Mill Co., Ltd. 2003. Process for manufacturing vegetable lysolecithin. European patent EP 0 870 840 B1

Joshi A, Paratkarb SG, Thorata BN. 2006. Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods. European Journal of Lipid Science and Technology, 108:363-373

Kim J, Lee CS, Oh J, Kim BG. 2001. Production of egg yolk lysolecithin with immobilised phospholipase A2. Enzyme and microbial technology, 29:587–592.

Krawczyk T. 1996. Lecithin: consider the possibilities. Inform, Vol. 7, 11:1158-1167 .

McClements MJ. 1999. Emulsion ingredients. Food emulsions principles, practice and techniques. New York: CRC Press. pp. 83–124.

Mustranta A, Forssell P, Poutanen K. 1995. Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids. Process Biochemistry, 30:393–401.

Pan LG, Tomás MC, Añón MC. 2002. Effect of Sunflower Lecithins on the stability of Water in Oil and Oil in Water emulsions. Journal of Surfactants and Detergents, 5:135 – 143.

Sas B, Peis E, inventores; Kemin Industries, Inc. 2000. Method for the conversion of lecithin into lysolecithin. U.S. patent 6,068,997.

Schitt H, Heirman M, inventores; Cargill Inc. 2005. Enzymatic modification of lecithin. U.S. patent US 2005/0227945 A1.

Sosada M. 1993. Optimal Conditions for Fractionation of Rapeseed Lecithin with Alcohols. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70:405-410.

van Nieuwenhuyzen W. 1981. The Industrial Uses of Special Lecithins. Journal of the American Oil Chemists' Society, 58:886–888.

van Nieuwenhuyzen W, Tomás MC. 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. European Journal of Lipid Science and Technology, 110:472–486.

Wabel C. 1998. Influence of Lecithin on Structure and Stability of Parenteral Fat Emulsions, Chap.1 http://www2.chemie.unierlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html/index.html. Último acceso el día: 29/04/2009.

Wu Y, Wang T. 2003. Soybean lecithin fractionation and functionality. Journal of the American Oil Chemists' Society, 80:319–326.

Wu Y, Wang T. 2004. Fractionation of crude soybean lecithin with aqueous ethanol. Journal of the American Oil Chemists' Society, 81:697-704.

Efecto de la mezcla caseinato de sodio – polisacárido (tragacanto, gelana) en la estabilidad de emulsiones aceite en agua

The effect of sodium caseinate - polysaccharide (tragacanth, gellan) mixture on the stability of oil in water emulsions

Casasola-Lozada SE (1), González-Sánchez J (1), Martínez-Padilla LP (1), Vernon-Carter EJ (2).

(1) Universidad Nacional Autónoma de México, FES-C, México.
(2) Universidad Autónoma Metropolitana, U. Iztapalapa, México.
lpmp@unam.mx

RESUMEN

La composición de muchas emulsiones alimenticias incluye proteínas y polisacáridos, estos biopolímeros mezclados en una formulación pueden interaccionar de diferentes formas, dependiendo de su estructura, temperatura, pH, entre otros; proporcionándole estabilidad a las emulsiones ante fenómenos como cremado y coalescencia, la cual separa irreversiblemente la emulsión.

El objetivo de la investigación fue determinar la influencia de una mezcla de biopolímeros en la estabilidad de emulsiones aceite-agua al 30% v/v almacenadas a 4, 20 y 40 *ºC*. Dicha mezcla conformada por caseinato de sodio al 2%-polisacárido (gelana 0,05%, 5 mM $CaCl_2$ y tragacanto 0,5%) en agua purificada. Las emulsiones se almacenaron a diferente temperatura para modificar su estabilidad, escaneándose diariamente durante 30 días en el Turbiscan MA2000 (Formulaction). Con base en los porcentajes de luz transmitida y retro-dispersa de las zonas de interés, se obtuvo la cinética de espesor absoluto, a partir de ésta se estableció el tiempo de estabilidad de las emulsiones, cuya pendiente representa la velocidad de desplazamiento de las gotas. La distribución del tamaño de glóbulo se midió cada 4 días durante 30 días en el Masterziser 2000 (Malvern), obteniendo el diámetro Sauter ($d_{3,2}$).

Las emulsiones con tragacanto presentaron velocidades de desplazamiento superiores a las preparadas con gelana, a las mismas temperaturas, siendo mayor la de tragacanto a 40 *ºC* (9,3 x 10^{-4} mm/min). Esta emulsión mostró cremado y una separación de fases evidente después de 1,1 días de almacenamiento. La emulsión más estable fue la que contenía gelana, a 4 *ºC* (18,2 días).

El tamaño del glóbulo de las emulsiones con gelana presentó una distribución bimodal, observándose predominio de las partículas de mayor tamaño en función del tiempo de almacenamiento. El $d_{3,2}$ de estas emulsiones varió de 4 μm (primer día) a 5,5 μm (30 días) a 20 °C.

Las emulsiones que contienen tragacanto presentaron distribución de tamaño más homogénea (unimodal), manteniéndose con un $d_{3,2}$ de 1,9 μm los 30 días a 20 °C, a pesar del cremado observado.

El tamaño menor de glóbulo, producido bajo las mismas condiciones de preparación, pudo haberse debido a las propiedades superficiales de la goma tragacanto. Tomando en consideración la velocidad de migración de las partículas, se concluye que las emulsiones con caseinato-gelana son más estables a cambios de temperatura que las de caseinato-tragacanto, lo que se puede atribuir a que la gelana en presencia de iones calcio, probablemente forme una red tridimensional entorno de los glóbulos. Los resultados de distribución de tamaño de partícula, ponen de manifiesto que para cada polisacárido el mecanismo de inestabilidad es diferente, donde las características de la interfase formada y la fase continua juegan un papel determinante.

ABSTRACT

The composition of many food emulsions includes proteins and polysaccharides, and other compounds in formulation that may interact in different ways, depending on its structure, temperature, pH, ionic force, among others, providing stability to the emulsions to coalescence phenomena and creaming, which separates irreversibly emulsions.

The aim of this research was to determine the influence of a mixture of biopolymers in the stability of oil-water emulsions at 30% v/v stored at 4, 20 and 40 *ºC*. Aqueous mixture is composed of sodium

caseinate 2%, polysaccharide (gellan 0,05%- 5 mM $CaCl_2$ and 0,5% tragacanth) in purified water. Emulsions were stored at different temperatures to modify their stability, scanned daily for 30 days in Turbiscan MA2000 (Formulaction). Based on the percentages of transmitted light and back-scattered in areas of interest, the absolute thickness kinetic was obtained, also the time of stability of the emulsions was established using the speed of migration of the droplets (slope). The droplet size distribution was measured every 4 days during 30 days in Masterziser 2000 (Malvern), obtaining the Sauter diameter ($d_{3,2}$).

The emulsions with tragacanth gum showed higher speeds of migration than gellan prepared at the same temperatures, being greater the tragacanth at 40 °C ($9,3 \times 10^{-4}$ mm/min). This emulsion showed creaming and a clear phase separation after 1,1 days of storage. The most stable emulsion contained gellan, at 4 °C (18,2 days).

The droplet size of emulsions with gellan presented a bimodal distribution, with predominance of larger particles as a function of storage time. The $d_{3,2}$ of these emulsions ranged from 4 μm (first day) to 5,5 μm (30 days) at 20 °C.

Emulsions that containing tragacanth showed more homogeneous size distribution (unimodal) maintained with a $d_{3,2}$ 1,9 μm at 20 °C for 30 days, despite the observed creaming. The small size of droplet produced under the same conditions of preparation, may have been due to surface properties of gum tragacanth. Taking into account the migration rate of particles, it is concluded that the emulsions with sodium caseinate-gellan are more stable to temperature changes than those of caseinate-tragacanth, which can be attributed to the gellan in the presence of calcium ions, probably forming a three dimensional network around the droplets. The results of particle size distribution, shows that for each polysaccharide mechanism of instability is different, where the characteristics of the interphase formed and the continuous phase play a determinant role.

PALABRAS CLAVE: *Emulsiones, inestabilidad, luz transmitida, luz retro-dispersa, tamaño de glóbulo.*

KEYWORDS: *Emulsions, instability, transmitted light, back-scattered light, droplet's size.*

INTRODUCCIÓN

Las proteínas y polisacáridos son biopolímeros comúnmente empleados en la industria alimenticia para la mejora, entre otras cosas, de la textura y la vida de anaquel de muchos productos alimenticios. En relación a esto, se han realizado estudios referentes a proteínas, polisacáridos y la interacción entre ellos; estos biopolímeros poseen influencia sobre las propiedades fisicoquímicas, y éstos a su vez determinan la estabilidad de muchos alimentos procesados; ya que la capacidad de interacción entre sus diferentes grupos reactivos les permite actuar como: espesantes, espumantes y emulsificantes de sistemas coloidales como son las espumas, suspensiones, geles y emulsiones.

La emulsion aceite-agua es un sistema coloidal formado por una fase dispersa (aceite) y una fase continua (agua), la presencia de un polisacárido en una emulsión estabilizada por una proteína puede tener una gran influencia sobre las propiedades de dicha emulsión (Dickinson 2003). Varios estudios han reportado el uso de polisacáridos aniónicos para aumentar la estabilidad de emulsiones aceite-agua que contienen proteínas de leche (Surh *et al.* 2006, Moreau *et al.* 2003, Dalgleish y Hollocou 1997).

El tipo de polisacáridos, así como su carga determinará la naturaleza de las interacciones entre las dos clases de biopolímeros y el mecanismo de estabilización y desestabilización de la emulsión (Syrbe *et al.* 1998). La goma gelana es un heteropolisacárido aniónico extracelular secretado por el microorganismo *Sphingomonas elodea* anteriormente denominado *Pseudomonas elodea*. Fue descubierta en 1977 por CP Kelco Inc., y es actualmente aprobada para uso alimentario en muchos países, incluyendo Australia, Canadá, Estados Unidos, México, Chile, Japón, Corea del Sur y Filipinas. La goma gelana forma geles a bajas concentraciones cuando las soluciones calientes se enfrían en la presencia de cationes promotores de gelificación. Está disponible en una forma sustituida o no sustituida es decir, las propiedades del gel dependen del grado de sustitución, por lo tanto la forma sustituida produce geles suaves y elásticos, mientras que la forma no sustituida produce geles duros, quebradizos (Sworn 2000).

La goma tragacanto es la exudación gomosa seca obtenida del *Astragalus gummifer* Labillardiere y otras especies asiáticas de *Astragalus* (Fam. *Leguminosae*); es considerada un emulsionante bifuncional, debido a que es uno del los emulsificantes naturales más eficientes en emulsiones ácidas aceite en agua, ya que además de ser un espesante de la fase acuosa es también un reductor de la tensión interfacial entre el aceite y el agua. (Weiping y Branwell 2000).

El caseinato de sodio es ampliamente utilizado como ingrediente en la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales como, ligante de agua, ligante de grasa, espesante y gelificante (Dickinson 1997), además es de particular importancia como emulsificante por su capacidad de conferir una baja tensión superficial durante la emulsificación y de poseer fuertes características anfifílicas (Dickinson y Golding 1997).

Alimentos como, helado, leche saborizada, crema entre otros son ejemplos clásicos de emulsiones, que necesitan ser estables, evitando fenómenos tales como el cremado y en especial la coalescencia, la cual lleva a la separación irreversible de fases (Dalgleish 2001).

Las emulsiones aceite-agua han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, determinar la estabilidad es complicado debido a la falta de métodos confiables y a la dificultad para cuantificar las pequeñas fracciones separadas, limitándose en gran medida a métodos visuales; cabe mencionar que la prueba de estabilidad es de gran importancia y debe de ser llevada a cabo antes de lanzar al mercado cualquier producto. En esta prueba, la formulación es sometida bajo diferentes condiciones de estrés simultáneamente para asegurar que no hay una degradación en el producto así como decoloración (Klein 1994), siendo el objetivo de esta investigación determinar la estabilidad de emulsiones aceite-agua incorporando la mezcla caseinato de sodio–polisacárido (gelana, tragacanto) en su fase continua empleando la distribución del tamaño de partícula y la difracción múltiple de luz que posee 20 veces la capacidad de ojo humano, permitiendo determinar la distribución de las fases en función del tiempo; dando continuidad a las investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales de los Alimentos por Sosa-Herrera *et al.* (2007) y, González-Sánchez y Martínez-Padilla, (1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se emplearon polvos de caseinato de sodio al 2% (Lactonat EN, Lactoprot, Alemania) en mezcla con goma tragacanto (Tipo B-1 NF, Industrias RAGAR, S.A. de C.V., México) 0,5% o con gelana (Kelcogel F, lote No. 2A0021A, Kelco, San Diego, USA) 0,05% con 5mM $CaCl_2$ (Merck), y azida de sodio al 0,03% como conservador para la preparación de mezclas acuosas.

Preparación de las fases continuas y de las emulsiones

Se dispersaron poco a poco a 25 °C, se prepararon combinando partes iguales de las disoluciones de caseinato y polisacárido (gelana, tragacanto) conteniendo el doble de la concentración requerida, empleando agitación magnética. Las emulsiones aceite-agua al 30% v/v se prepararon con aceite de Canola (Marca Capullo, México), se elaboraron usando un agitador de alta velocidad (Ultra Turrax T25 Basic, IKA–WERKE) controlando la temperatura (25 °C) en un baño maría (Limited Cambrige, CB2 5Q2, Grant Instruments) con agua a 2 ± 1 °C, monitoreada con un termómetro con sensor láser (Paytek Minitemp, Oaklon, Instruments, USA). Las emulsiones se almacenaron a 40°, 20° y 4 °C para conocer su estabilidad.

Distribución de tamaño de partícula

Se determinó la distribución del tamaño de glóbulo mediante la difracción de luz láser empleando el Masterziser 2000 (Malvern), obteniendo el diámetro Sauter $D_{[3,2]}$ y el De Broukere $D_{[4,3]}$, cada 4 días durante 30 días de almacenamiento.

Estabilidad

El tiempo de estabilidad se obtuvo a través de la cinética de espesor absoluto y la velocidad de desplazamiento de las gotas llevando un seguimiento en el analizador óptico vertical Turbiscan MA2000 de Formulaction durante 30 días de almacenamiento a temperatura de 4, 20 y 40 °C.

Análisis Estadístico

En el caso de la distribución de tamaño partícula se realizaron determinaciones por triplicado en tanto para la estabilidad se realizaron determinaciones por duplicado para todas las emulsiones. Se reportan los valores promedio y desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Emulsiones caseinato de sodio – gelana

Las emulsiones caseinato-gelana presentaron una distribución de tamaño de glóbulo bimodal en las que se observa una influencia de la temperatura de almacenamiento. En la **Figura 1**, se tienen las emulsiones caseinato-gelana a 4 *ºC* y se observa una diferencia del 1% en el% volumen menor a los 30 días de almacenamiento en las partículas de menor tamaño, mientras que las de mayor tamaño se incrementan, lo cual se ve reflejado en la **Tabla 1**. En la **Figura 2**, las mismas emulsiones a una temperatura de almacenamiento de 20 *ºC*, presentan el mismo comportamiento, pero con una diferencia del 2% en el% en volumen para los dos tamaños de partícula a 30 días de almacenamiento. Al incrementarse la temperatura de almacenamiento (**Figura 3**) a 40 *ºC* el comportamiento en 30 días, la distribución del tamaño de partícula más pequeño se desplaza aumentando el% en volumen de un tamaño de partícula.

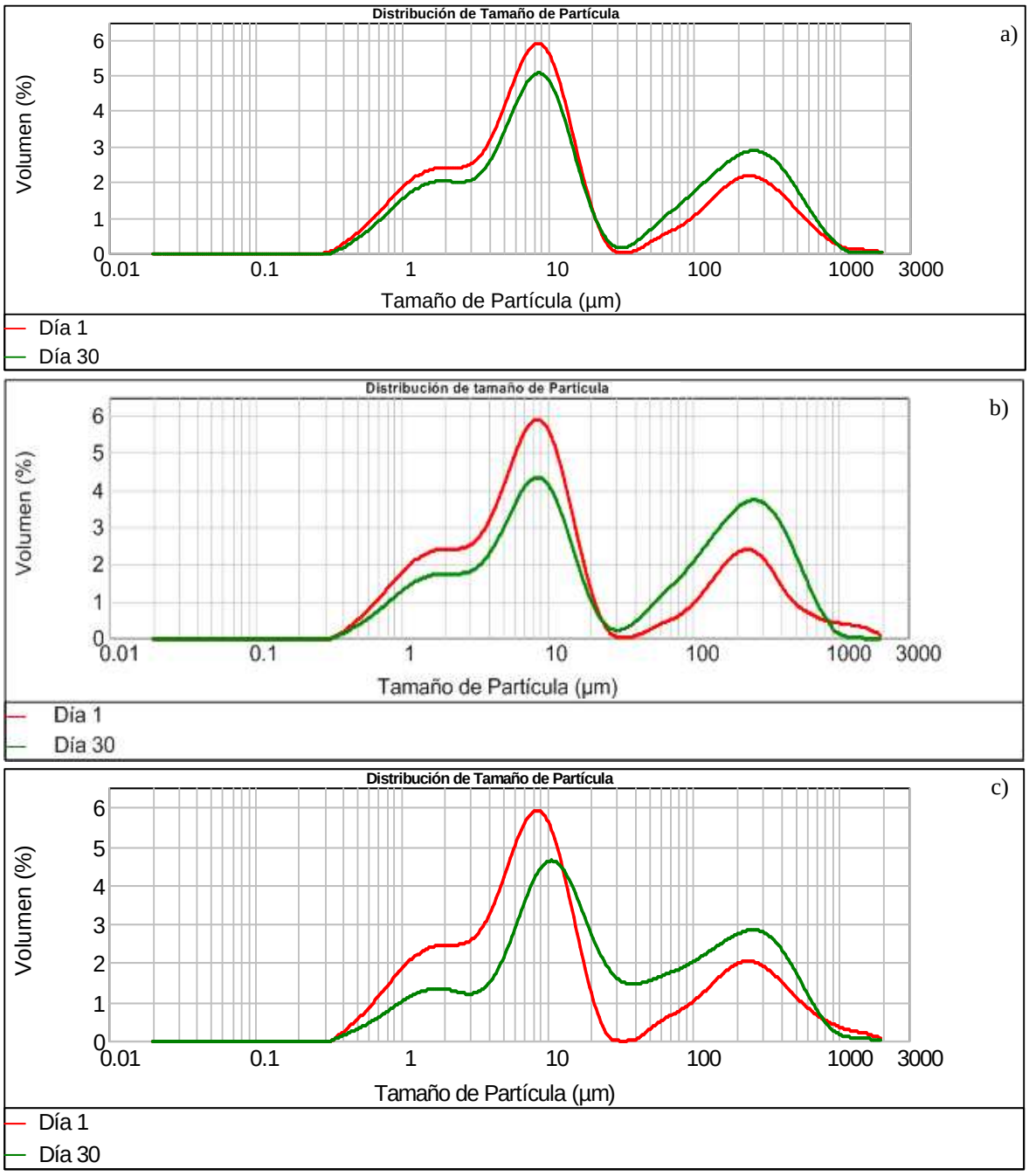


Figura 1. Comportamiento bimodal en emulsiones caseinato-gelana a) 4 °C b) 20 °C y c) 40 °C.

Tabla 1. Diámetros de partícula Sauter y De Broukere de las emulsiones al 30% v/v.

DIÁMETRO (µm)								
	Caseinato – Gelana				Caseinato - Tragacanto			
	D[3,2]		D[4,3]		D[3,2]		D[4,3]	
	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30	Día 1	Día 30
4 °C	3,8	4,7	78,80	102,70	1,91	1,90	2,30	2,30
D.S.	*0,83*	*1,51*	*52,94*	*69,40*	*0,03*	*0,05*	*0,05*	*0,09*
20 °C	4,0	5,50	89,90	123,8	1,90	1,90	2,30	2,40
D.S.	*0,82*	*1,48*	*40,42*	*63,15*	*0,05*	*0,04*	*0,05*	*0,12*
40 °C	3,9	6,50	84,60	107,10	1,91	2,70	2,40	11,7
D.S.	*1,50*	*1,64*	*70,03*	*70,66*	*0,03*	*3,58*	*0,04*	*0,29*

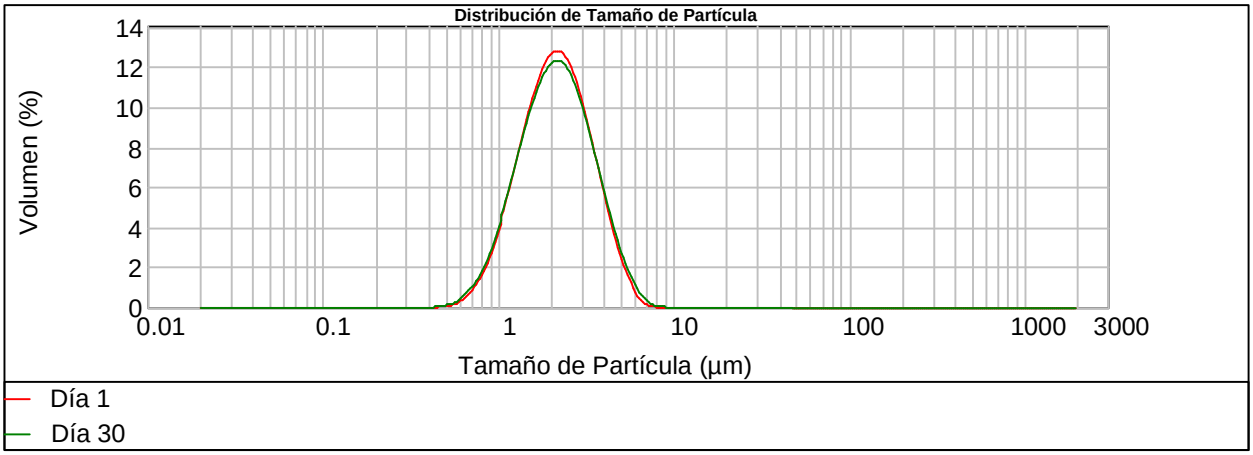


Figura 2. Comportamiento unimodal en emulsiones caseinato-tragacanto (20 °C).

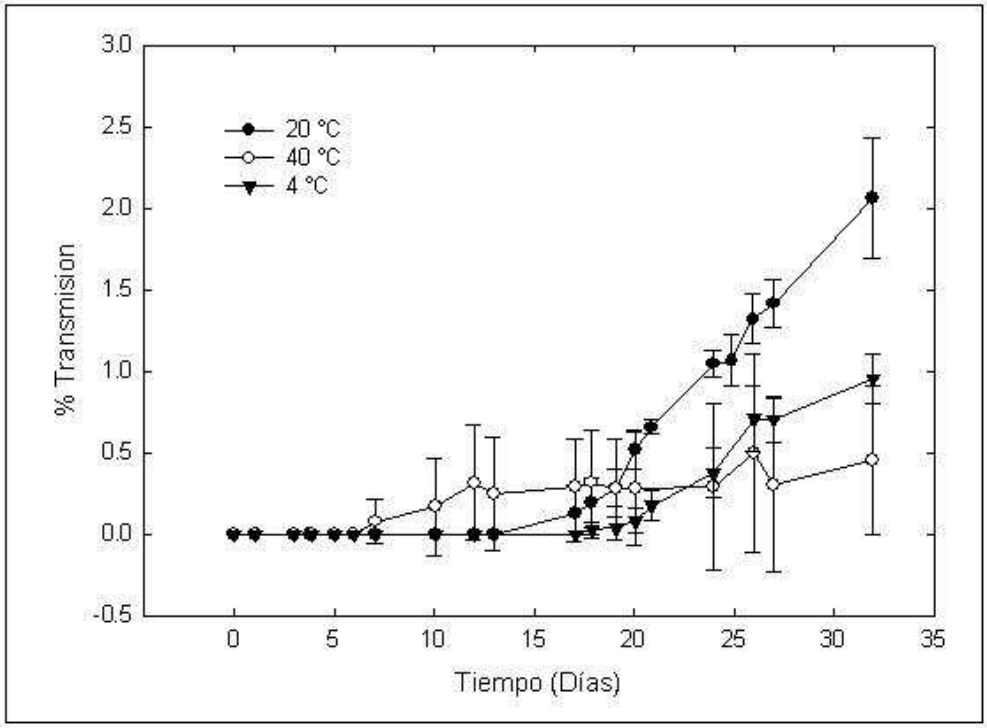


Figura 3. Cinética de espesor absoluto en las emulsiones caseinato de sodio – gelana.

En la **Tabla 1** se muestra el incremento de los diámetros Sauter ($d_{3,2}$) y De Broukere ($d_{4,3}$) conforme aumenta la temperatura de almacenamiento.
La cinética de espesor absoluto (**Figura 4**) muestra una clara influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la velocidad de separación de las emulsiones y el tiempo que permanecieron estables (**Tabla 2**), siendo las emulsiones almacenadas a 4 °C las más estables y comenzando una separación visible al ojo humano después de 18,2 días de almacenamiento a razón de 2,4 x 10^{-4} mm/min.

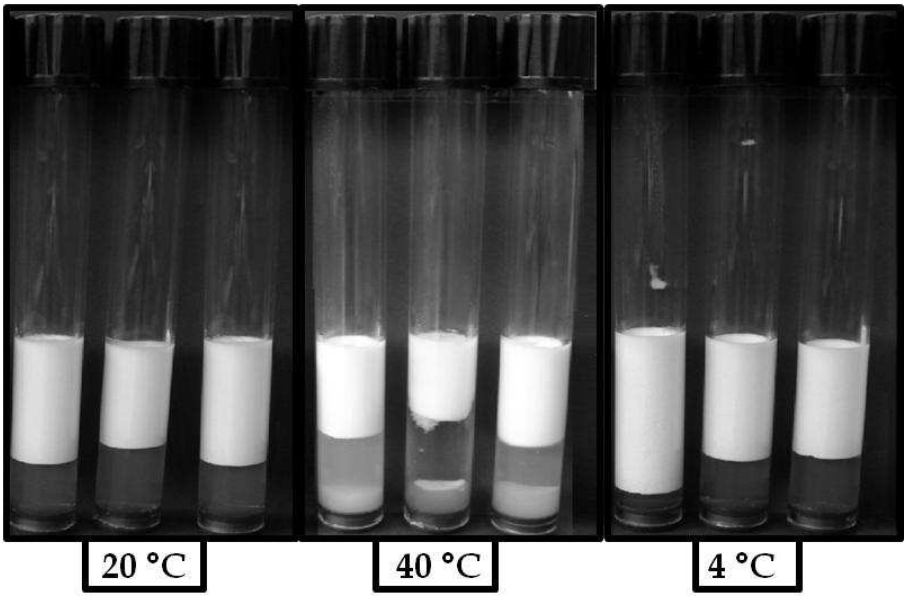


Figura 4. Emulsiones caseinato de sodio–tragacanto (30 días de almacenamiento).

Tabla 2. Velocidad de desplazamiento y tiempo de estabilidad de las emulsiones al 30% v/v.

	Velocidad de Desplazamiento (mm/min)		Tiempo (Días)	
	Caseinato - Gelana	Caseinato - Tragacanto	Caseinato - Gelana	Caseinato - Tragacanto
4 °C	2,4 x 10-4	2,9 x 10-4	18,2	7,1
D.S.	*0,0001*	*0,0002*	*2,97*	*3,26*
20 °C	2,7 x 10-4	4,9 x 10-4	13.00	3,2
D.S.	*0,0001*	*0,0001*	*2,88*	*0,57*
40 °C	3,5 x 10-4	9,3 x 10-4	3,7	1,1
D.S.	*0,0002*	*0,2649*	*3,56*	*0,06*

Los perfiles de transmisión y retrodispersión de luz, así como de la distribución de tamaño por medio del diámetro De Broukere ($d_{4,3}$), siendo éste más sensible a la presencia de grandes volúmenes de partículas en una emulsion (McClements 2005), es posible que las interacciones caseinato de sodio–gelana promueven la formación de agregados, los cuáles parecen formar una red tridimensional que evita la coalescencia y favorece la floculación (depletion flocculation) (Sosa-Herrera *et al.* 2007).

Emulsiones caseinato – tragacanto

Estás emulsiones presentaron una distribución de tamaño monodispersa (**Figura 5**), el tamaño menor del glóbulo de las emulsiones con tragacanto con respecto a las de gelana (**Tabla 1**), puede deberse a las propiedades superficiales de la goma tragacanto que reduce la tensión interfacial (González-Sánchez y Martínez-Padilla 1998).
Sin embargo los resultados obtenidos de los perfiles de transmisión de luz indican un aumento en la velocidad de separación de las emulsiones cuando se incrementó la temperatura de almacenamiento como se muestra en la Tabla 2, este comportamiento se observa en la cinética de espesor absoluto.

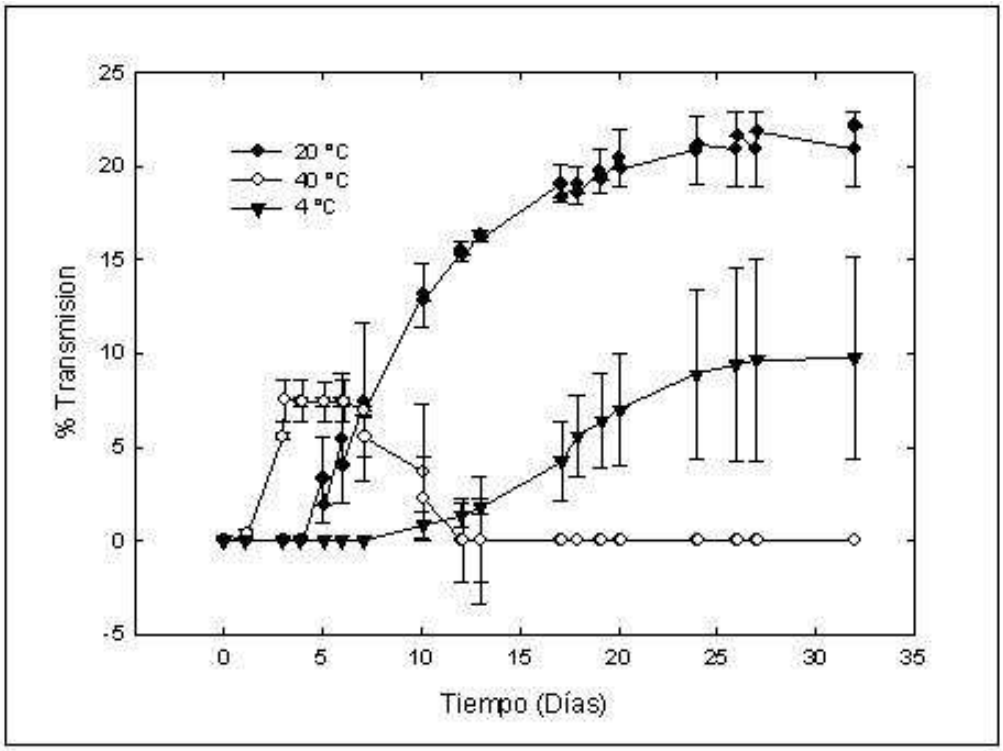


Figura 5. Cinética de espesor absoluto en las emulsiones caseinato de sodio–tragacanto.

En las emulsiones almacenadas a 40 °C la separación comienza apenas transcurridos 1,1 días, esta separación permanece constante hasta los 5 días donde comienza la formación de un sedimento.

CONCLUSIONES

Tomando en consideración la velocidad de migración de las partículas, la velocidad de separación se vio afectada por el incremento de la temperatura y el tiempo de almacenamiento, siendo mayor para las emulsiones con tragacanto. Las interacciones caseinato–polisacárido (gelana, tragacanto) generan diferentes mecanismos de desestabilización y por lo tanto diferente estabilidad cinética. Las emulsiones caseinato–tragacanto formaron emulsiones monodispersas debido posiblemente a las propiedades de superficie de la goma tragacanto. A pesar de ello presentaron una menor estabilidad a la temperatura y tiempo de almacenamiento. Por otro lado, presumiblemente debido a las interacciones presentes en la fase continua entre el caseinato de sodio y la gelana, que promueven la formación de agregados y por lo tanto emulsiones polidispersas. Esto se refleja en que los resultados no fueron reproducibles, por tener una desviación estándar grande.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación de la FESC-UNAM. Agradecemos también al M. en C. Rubén Jiménez Alvarado de la UAM-Iztapalapa, por su apoyo en la determinación de la distribución del tamaño de partícula.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dalgleish DG, Hollocou AL. 1997. Stabilization of protein-based emulsions by means of interacting polysaccharides. En: Dickinson E, Bergenstahl B, editores. Food colloids: Proteins, lipids and polysaccharides. Cambridge, The Royal Society of Chemistry. pag 236-244.

Dalgleish DG. 2001. Food Emulsions. En: Johan Sjöblom, editor. Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology. New York: M. Dekker. pag 207-232.

Dickinson E. 1997. Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. Journal of Dairy Science, 80:2607-2619.

Dickinson E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influences of the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids, 17: 25-39.

Dickinson E, Golding M. 1997. Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. Journal of colloid and interface science, 191: 166 -176.

González-Sánchez J, Martínez-Padilla LP. 1998. Modificación de las propiedades viscoelásticas de emulsiones concentradas con diferentes mezclas de polisacárido-proteína. Memorias del XIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Ixtapa, México.

Klein K. 1994. Formulating skin care emulsions. Cosmetics &Toiletries, 109 (7): 63-66.

McClements DJ. 2005. Food emulsions: principles, practice, and techniques. 2ª ed. USA: CRC Press. pag 14.

Moreau L, Kim HJ, Decker EA, McClements DJ. 2003. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β-lactoglobulin-pectin membranes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 6612-6617.

Sosa-Herrera MG, Berli CLA, Martínez-Padilla LP. 2007. Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures. Food Hydrocolloids, 22: 934-942.

Surh J, Decker EA, McClements DJ. 2006. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids, 20: 607-618.

Sworn GM. 2000. Gellan Gum. En: Phillips GO and Williams PA, editors. Handbook of Hydrocolloids. USA, New York: M. Dekker. Pag 117-135.

Syreb A, Bauer WJ, Klostermeyer H. 1998. Polymer Science concepts in diary systems and over view of milk protein and food hydrocolloid interaction. International Diary Journal, 8: 179-193.

Weiping W, Branwell A. 2000.Tragacanth and Karaya. En: Phillips GO and Williams PA, editors. Handbook of Hydrocolloids. USA, New York: M. Dekker. Pag 231-238.

Disponibilidad de hierro y zinc de productos expandidos fortificados con hidrolizados de hemoglobina bovina

Availability of iron and zinc in expanded products fortified with bovine hemoglobin hydrolysates

Cian R, Drago SR, De Greef D, Torres R, González R

Instituto de Tecnología de Alimentos (Universidad Nacional del Litoral) 1º de Mayo 3250.
Santa Fe (CP: 3000)
rec_704@yahoo.com.ar

RESUMEN

Se estima que alrededor de la mitad de la población mundial consume una cantidad insuficiente de Fe y Zn. La fortificación de alimentos es una estrategia económica y conveniente para combatir la deficiencia de dichos minerales. En países en vías de desarrollo, las harinas de cereales, especialmente trigo y maíz son frecuentemente usadas como vehículo de fortificación porque son alimentos básicos de la población. El objetivo de este trabajo fue evaluar la disponibilidad de hierro y zinc de productos expandidos de maíz fortificados con hidrolizados de hemoglobina bovina. Se prepararon 4 hidrolizados de hemoglobina usando diferentes proteasas que fueron liofilizados. Los productos expandidos fueron elaborados con sémola de maíz, con un reemplazo de 0,5% (P/P) con hemoglobina o sus hidrolizados, utilizando un extrusor Brabender 20 DN. La disponibilidad de hierro (DFe%) y zinc (DZn%) se estimó mediante la técnica de dializabilidad, que mide el mineral dializado luego de una doble digestión que simula los procesos fisiológicos. Esta medición fue realizada a la hemoglobina bovina, sus hidrolizados y a los productos expandidos adicionados de los mismos. Se observó que la hidrólisis enzimática en general incrementó la disponibilidad de hierro de los hidrolizados respecto de la hemoglobina sin hidrolizar, observándose una correlación lineal entre el grado de hidrólisis (GH%) y la disponibilidad de hierro. Para los productos extrudidos se obtuvieron los mayores valores de DFe% con las muestras más hidrolizadas (aprox. 10%). Para el caso del Zn, los hidrolizados presentaron mayor disponibilidad del zinc endógeno que la hemoglobina sin hidrolizar. Por otro lado, cuando los hidrolizados fueron incorporados a los productos expandidos la DZn% disminuyó significativamente, correspondiéndose los menores valores con las muestras más hidrolizadas. Si bien los productos expandidos fortificados con hidrolizados de hemoglobina presentan mayor DFe% que los fortificados con hemoglobina, tanto la disponibilidad del Fe como su efecto en la disponibilidad del Zn dependió del tipo de hidrolizado adicionado.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate Fe and Zn availability from maize extruded products fortified with hydrolyzates from bovine hemoglobin concentrates. Four hydrolyzates were obtained using bovine hemoglobin (BH) as substrate and different enzymes. The degree of hydrolysis (DH) was determined by OPA method. Extrudates were obtained using maize grits and its mixtures with BH or its hydrolyzates. Extrusion was carried out with a 20 DN Brabender extruder. The Fe and Zn availability were estimated by the dialyzability method which measures the mineral dialyzated after a double digestion simulating physiological processes. The BH, its hydrolyzates and extruded products were evaluated. In general, the enzymatic hydrolysis increased the Fe availability (DFe%) from hydrolyzates respect to substrate. Also a direct correlation was obtained between DH and DFe%. For extruded products, the highest values of DFe% (10%) corresponded to sample with higher DH. In the case of DZn%, the highest values corresponded to the hydrolyzates and DZn% decrease significantly after extrusion. Also DH affects negatively DZn%, since the highest values corresponded to the lower DH. Although the extruded products fortified with BH hydrolyzates showed higher DFe% than the extruded products fortified with BH, it is necessary to pointed out that the availability of Fe and Zn depend on the type of hydrolyzate added.

PALABRAS CLAVE: *Hidrólisis, Disponibilidad, Hemoglobina, Fortificación, Extrusión.*

KEYWORDS: *Hydrolysis, Availability, Hemoglobin, Fortification, Extrusion.*

INTRODUCCIÓN

Se estima que alrededor de la mitad de la población mundial consume una cantidad insuficiente de Fe y Zn, lo que conduce a la deficiencia de Fe y anemia ferropénica y al aumento de incidencia de diversas patologías asociadas con las deficiencias de ambos minerales.

La absorción del Fe de las comidas varía considerablemente. Existen dos tipos de Fe en los alimentos, el Fe no hemínico presente tanto en alimentos vegetales como en los tejidos cárnicos y el Fe hemínico proveniente de la hemoglobina y de la mioglobina de productos de origen cárnico. El Fe no hemínico representa el 85-90% del Fe de la dieta de países industrializados (Lynch 1997), posee baja biodisponibilidad y está influenciado notablemente por compuestos de la dieta que pueden actuar como promotores o inhibidores de su absorción (Sadettin *et al.* 2004). Por el contrario, el Fe hemínico representa entre el 30 y el 70% del Fe total en carnes magras y siempre es bien absorbido (King 2000). La mayor parte del hierro de la dieta se encuentra como no hemínico y su baja biodisponibilidad es una de las causas de la **anemia** por deficiencia de hierro. La deficiencia de hierro es una de las enfermedades nutricionales más comunes y afecta a millones de personas. La mayor prevalencia se da en los países en desarrollo, siendo las causas más frecuentes las dietas ricas en cereales (donde la biodisponibilidad del Fe es baja), las pérdidas de sangre (enfermedades parasitarias) y las demandas fisiológicas aumentadas, tales como en niños o en mujeres (menstruación y embarazo) (Carpenter y Mahoney 1992).

Por otro lado, el Zn es un mineral traza que juega un rol central en el desarrollo celular, especialmente en la producción de enzimas necesarias para la síntesis de ARN y de ADN (Black 1998). Es importante durante el embarazo y la lactancia y es un nutriente necesario para el desarrollo fetal (Gibson 2006). Aunque la homeostasis del Zn en el cuerpo es mantenida en un amplio rango de valores de ingesta de Zn, por el aumento o disminución de su absorción o excreción intestinal, la poca ingesta de Zn combinada con una pobre disponibilidad y una gran demanda durante el crecimiento o reproducción, termina resultando en una deficiencia de dicho mineral (King 2000). Esta deficiencia conduce a un pobre crecimiento, depresión de la función inmune, incremento de la susceptibilidad a las infecciones y su severidad, resultados adversos en el embarazo y anormalidades del comportamiento (López de Romaña *et al.* 2003).

Las estrategias para combatir la deficiencia de Fe y Zn incluyen el control de infecciones parasitarias, el mejoramiento sanitario, la suplementación de Fe y Zn, y la fortificación. De estas estrategias, la fortificación de alimentos básicos es la más económica y conveniente y tiene la ventaja de no requerir modificaciones en los hábitos alimenticios (Mendoza *et al.* 2001). Consiste en la adición de micronutrientes esenciales a los alimentos en un nivel superior al que habitualmente contienen. En países subdesarrollados, las harinas de cereales, especialmente trigo y maíz son frecuentemente usadas como vehículo de fortificación porque son los alimentos básicos de la población (García-Casal *et al.* 2003). Otro factor importante en la fortificación es la selección de la fuente del mineral, que debe estar basada en su biodisponibilidad, en sus efectos físico-químicos sobre el alimento y el costo (Mendoza *et al.* 2001).

La fortificación de los alimentos con hemoglobina bovina se encuentra actualmente en investigación. En Chile, se han desarrollado galletitas con agregado de hemoglobina (Walter *et al.* 1993) y otros investigadores (Hallberg y Rossander 1982) han sugerido su uso para aumentar el Fe biodisponible en hamburguesas y otros alimentos cárnicos en los cuales se ha usado proteína de soja para sustituir parte de las proteínas de la carne. Al respecto, se han desarrollado distintos procesos para producir hierro hemínico a partir de la hidrólisis de hemoglobina bovina y así obtener un producto peptídico enriquecido con dicho grupo prostético (Ericsson 1983). Estos péptidos enriquecidos poseen un mayor contenido de hierro que la hemoproteína de partida (Liu *et al.* 1996) y contribuyen a mantener el grupo hemo en una forma soluble, favoreciendo su disponibilidad para la absorción (Uzel y Conrad 1998). Además, algunos estudios han indicado como suplemento de hierro a toda la sangre o solamente a los glóbulos rojos, principalmente por el elevado contenido de hemoglobina (Walter *et al.* 1993, Viteri *et al.* 1995). También se ha reportado el empleo de las proteínas de la sangre como ingredientes alimenticios, tanto por sus propiedades funcionales (Lee *et al.* 1993), como por su valor nutritivo (Del Río de Reyes *et al.* 1980).

Cabe aclarar que si bien en principio la biodisponibilidad del Fe hemínico es alta, es necesario estudiar la disponibilidad de hierro en productos no cárnicos fortificados con hidrolizados de hemoglobina (productos expandidos). Ya que la matriz alimenticia puede interaccionar con las fracciones peptídicas contribuyendo o no con la disponibilidad del Fe (y eventualmente del Zn).
En base a lo mencionado anteriormente y evaluando las ventajas que tiene la fortificación de cereales y el uso de Fe altamente biodisponible, se propuso como objetivo evaluar la disponibilidad de hierro y zinc de productos expandidos de maíz fortificados con hemoglobina bovina o sus hidrolizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

Sustrato: Se utilizó un concentrado proteico de hemoglobina bovina (CHB) suministrada por la empresa Yeruvá S.A.
Enzimas: P, FC y F.
Productos Extrudidos: para la elaboración de los productos expandidos se utilizó harina de maíz comercial.

Elaboración de los hidrolizados

Los hidrolizados fueron obtenidos empleando un reactor termostatizado de tipo batch de 800 ml de capacidad. El pH de reacción fue medido de manera continua utilizando un pHmetro IQ Scientific Instruments. El ajuste de pH se realizó mediante el agregado de base (NaOH) o ácido (HCl). Se trabajo bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura de cada enzima y una concentración de sustrato de 8% (P/P). Una vez finalizada la hidrólisis, las enzimas fueron inactivadas por tratamiento térmico de acuerdo a las condiciones descriptas por el fabricante. Se prepararon cuatro hidrolizados de CHB según el siguiente esquema:
- Hidrólisis P: Enzima P (2 horas).
- Hidrólisis FC: Enzima FC (2 horas).
- Hidrólisis P+F: Enzima P (2 horas) + Enzima F (4 horas). Tiempo total 6 horas.
- Hidrólisis FC+F: Enzima FC durante (2 horas) + Enzima F (4 horas). Tiempo total 6 horas.

Seguimiento de la reacción de hidrólisis

Para el seguimiento de la reacción de hidrólisis y la determinación el grado de hidrólisis (GH) se emplearon las técnicas de determinación de aminos libres según Nielsen *et al.* (2001). El GH se calculó como:

$$GH = (h - h_0)/h_t) \times 100\%$$

$\mathbf{h_t}$ = número total de uniones peptídicas hidrolizables en la proteína (8,23 mEq/g proteína).
h = número de uniones peptídicas hidrolizadas.
$\mathbf{h_0}$ = contenido de aminos libres en la proteína de partida.

Elaboración de los productos extrudidos

Los expandidos se elaboraron a base de sémola de maíz a la que se le agregó el concentrado de hemoglobina bovina o sus hidrolizados en un nivel de 0,5%. La obtención de los productos se hizo con un extrusor Brabender 20 DN con tornillo relación de compresión 4:1, 160 rpm, 9,3% de humedad, 175 *ºC* en el cañón y 160 *ºC* en la boquilla.

Estudio de la disponibilidad de minerales

Disponibilidad de minerales. La disponibilidad potencial de hierro y zinc, tanto de los hidrolizados como de los productos extrudidos, se evaluó utilizando la técnica de dializabilidad de Miller *et al.* (1981), modificada por Wolfgor *et al.* (2002). La disponibilidad potencial de hierro se calculó como la cantidad de hierro dializado expresada como porcentaje del contenido de hierro total en la muestra:

$$DFe(\%) = \left(mgFe_D / mgFe_M\right) \times 100$$

$\boldsymbol{DFe(\%)}$ = Porcentaje de hierro dializado.
$\boldsymbol{mg\ Fe_D}$ = mg de hierro dializado.
$\boldsymbol{mg\ Fe_M}$ = mg de hierro en la muestra.

De igual forma se calculó la disponibilidad potencial de zinc (DZn(%)).

Determinación de minerales totales. Para determinar la concentración de minerales (Fe y Zn), la muestra se llevó a mufla a 550 *ºC* durante 4 horas. Las cenizas fueron levantadas con 10 ml de HCl 20% (v/v). El contenido de ambos minerales se determinó por espectroscopia de absorción atómica.

Análisis estadísticos

Todas las muestras se evaluaron por triplicado y se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus 3.0, para realizar análisis de ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seguimiento de la reacción de hidrólisis

En la **Tabla 1** se muestran los GH obtenidos para cada sistema enzimático. Como se puede observar, los GH alcanzados para las hidrólisis secuenciales fueron significativamente superiores a los obtenidos con las dos hidrólisis simples.

Tabla 1. Valores de Grado de hidrólisis (GH%) alcanzados para cada sistema enzimático.

Muestra	GH (%)
P	8,33 ± 1,02 [a]
FC	8,43 ± 0,69 [a]
P+F	19,84 ± 0,21 [b]
FC+F	16,67 ± 0,11 [c]

X ± SD. Valores con distintas letras indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Evaluación de la disponibilidad del Fe y del Zn del CHB y sus hidrolizados

Dializabilidad de Fe (DFe(%)). En la **Figura 1** se observa la DFe(%) del CHB y sus hidrolizados. La mayor DFe(%) se obtuvo con los sistemas de hidrólisis secuenciales, correspondiendo el mayor valor al hidrolizado P+F. Es posible que los péptidos generados en la hidrólisis gastrointestinal formen complejos que solubilicen el Fe y promuevan su diálisis y esto es más efectivo en muestras previamente hidrolizadas, lo que permitiría una liberación más eficaz del Fe. Este resultado concuerda con lo reportado por Vaghefi *et al.* (2002) para hidrolizados de hemoglobina bovina obtenidos con Pepsina y Subtilisin. En dicho trabajo el GH alcanzado con ambas enzimas fue de 15% (medido por TNBS), y la absorción potencial se midió en sistemas *in vitro* que utilizaron tejido duodenal y lumen de duodenos de ratas, determinándose el contenido de Fe por absorción atómica.

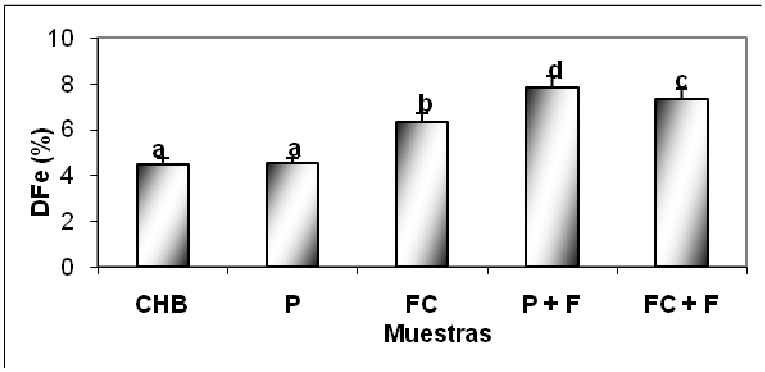


Figura 1 – Dializabilidad de hierro (DFe (%)) del Concentrado de Hemoglobina bovina (CHB) y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de las enzimas P, FC, (P+F) y (FC+F). Las barras con diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0,05$).

Si bien la muestra hidrolizada con P no presentó una DFe(%) diferente del CHB, el hidrolizado FC presentó un valor mayor de DFe(%). Esto podría estar asociado con las diferentes fracciones peptídicas generadas durante el proceso de hidrólisis, las cuales pueden resultar promotoras o no de la DFe(%). Cabe agregar que fue posible establecer una correlación entre el GH de los hidrolizados y el valor de DFe(%) (r^2: 0,8693).

Con respecto al CHB se puede ver que el valor de DFe% es bajo (4%) y significativamente menor al de los hidrolizados (exceptuando P). Estos bajos valores de DFe% no se corresponden con aquellos altos valores de biodisponibilidad del hierro hemínico de comidas cárnicas. Al respecto, ha sido establecido que la adición de carne a una comida, incrementa la absorción de hierro (Hallberg 1981a). Sin embargo, la absorción del hierro hemínico de una comida compuesta preparada con sangre, pero sin carne es menor de la mitad que si la carne está presente. Como ejemplo, la biodisponibilidad del hierro hemínico en comidas con carne es de aproximadamente 25%, mientras que en ausencia de carne es como máximo 10%, disminuyendo si se incrementa la dosis de prueba (Hallberg 1981b). En presencia de proteínas de origen cárnico, los péptidos liberados durante la digestión de la carne podrían prevenir la polimerización del hemo y potenciar la absorción del hierro hemínico. Entre éstos se destacan los péptidos que poseen cisteína (Bouglé y Bouhallab 2005).
Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que la disponibilidad del Fe hemínico es baja cuando es evaluada fuera de su entorno natural que es la carne. Además se observó, que en general, un aumento en el GH del CHB está asociado con un incremento de la disponibilidad potencial del hierro.
Dializabilidad de Zn (DZn(%)). En la **Figura 2** se muestran los valores de DZn(%) obtenidos para las distintas muestras. Los hidrolizados presentaron valores de DZn(%) superiores al del CHB, lo que evidencia que la proteólisis del CHB contribuye al incremento de la DZn(%). Sin embargo, no fue posible establecer una relación entre el GH y la DZn(%).

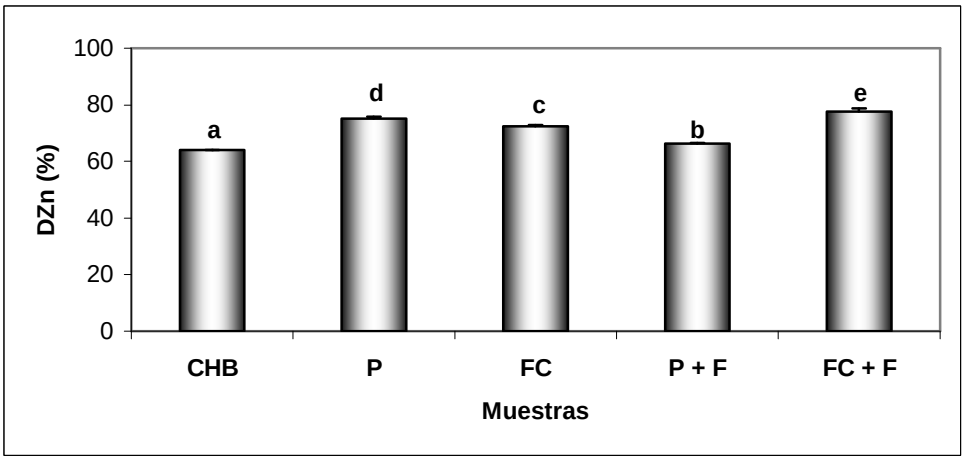


Figura 2 – Dializabilidad de zinc (DZn (%)) del Concentrado de Hemoglobina bovina (CHB) y los hidrolizados obtenidos a partir de la acción de P, FC, (P+F) y (FC+F). Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0,05$).

Uno de los motivos por los cuales algunos hidrolizados promueven más la disponibilidad del Zn endógeno que otros, probablemente radica en la naturaleza aminoacídica de los péptidos generados, ya que se ha visto en forma *in* vivo que ciertos aminoácidos quelantes presentes en los péptidos mantienen solubles al Zn dejándolo más disponible para la absorción a nivel intestinal (Salgueiro *et al.* 2000). Entre estos aminoácidos se pueden destacar la Metionina, Cisteína e Histidina. Cabe aclarar que la hemoglobina posee un elevado contenido de Histidina (tres veces más que la caseína hidrolizada) (Aubes-Dufau *et al.* 1995). Por lo tanto, este aminoácido podría estar jugando un rol clave en la DZn(%) y la hidrólisis contribuiría a la exposición o liberación de fragmentos peptídicos con estos péptidos quelantes.

Estudio del efecto promotor de los hidrolizados de CHB en la disponibilidad de minerales

Dializabilidad del Fe (DFe(%)). Como se puede observar en la **Figura 3**, no fue posible detectar Fe en los dializados correspondientes a la muestra de maíz y a las muestras con agregado de CHB o los hidrolizados P y FC, empleando espectroscopia de absorción atómica, para cuantificar Fe.

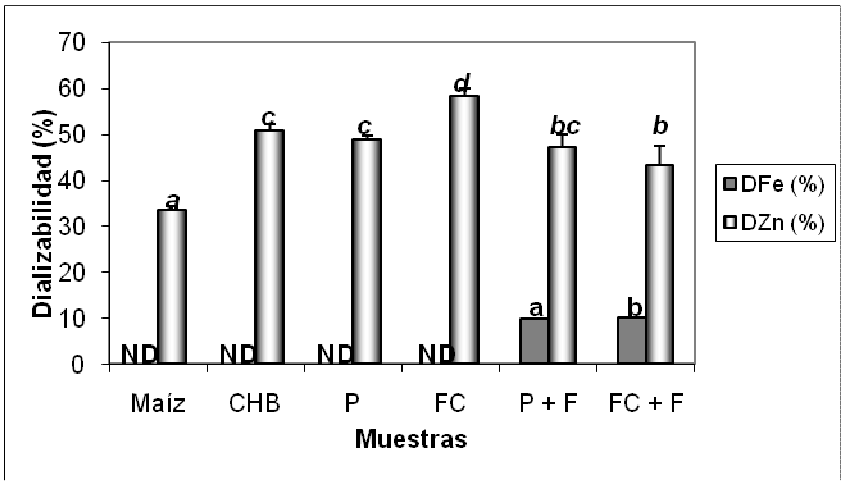


Figura 3 – Dializabilidad de hierro (DFe(%)) y de zinc (DZn(%)) de los productos extrudidos: harina de maíz; maíz + 0,5% del Concentrado de Hemoglobina bovina (CHB) y maíz + 0,5% de los hidrolizados obtenidos con las enzimas P, FC, P+F y FC+F. Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0,05$), ND: no detectado.

No obstante, resulta oportuno aclarar que se han reportado valores de DFe(%) superiores al 1% para productos a base de maíz comercial. Tal es el caso del estudio de Wolfgor *et al.* (1996), que midieron la disponibilidad del hierro en cereales para desayuno preparados con leche, utilizando el método de dializabilidad de Miller *et al.* (1981) modificado, obteniendo un valor de DFe(%) para copos maíz comercial de 4,8%. En otro estudio, Wolfgor *et al.* (2002) reportó una DFe(%) de copos de maíz sin la adicción de leche de 2,9%. García-Casal *et al.* (2003) determinaron el porcentaje de hierro absorbido de copos de maíz en humanos adultos voluntarios, en los cuales se calculó la incorporación del hierro radiactivo a la sangre. La biodisponibilidad del hierro obtenida en este estudio fue de 2,96%. Bovell-Benjamin *et al.* (2000) también encontraron valores de biodisponibilidad de Fe del 1,4% en comidas a base de maíz tipo polenta ("porridge") en ensayos en hombres adultos.

Si bien la información de disponibilidad de Fe encontrada en la literatura corresponde a alimentos a base de maíz, los procesos de elaboración del producto son diferentes al proceso de extrusión utilizado en la elaboración del expandido de maíz. Igualmente existen diferencias en la composición química de los alimentos evaluados en los distintos estudios (presencia de azúcar en los copos de maíz, leche, etc.) y no se informa si el maíz utilizado estaba descascarado/desgerminado o no.

También se observó que la adición de 0,5% de CHB a la harina de maíz comercial no se tradujo en un incremento de la DFe(%), no detectándose Fe en el dializado.

La baja DFe(%) de productos vegetales fortificados con hemoglobina (fuera de la matriz cárnica) ya ha sido reportada por algunos investigadores. Hurrell *et al.* (1988) observó que el agregado de hemoglobina a una comida de maíz ("porridge"), no incrementó la absorción de hierro en estudios en humanos sometidos al examen. Posibles interacciones entre el CHB y las proteínas de la matriz alimentaria (maíz), como la ausencia de proteínas cárnicas promotoras de la disponibilidad del Fe pueden explicar estos resultados. Weinborn *et al.* (2008), encontraron que la biodisponibilidad del hierro hemínico (evaluada en humanos), se ve afectada negativamente por algunas proteínas vegetales tales como los aislados de proteína de soja.

Sólo en el caso de los expandidos fortificados con los hidrolizados P+F y FC+F se detectó Fe en los dializados, resultando la DFe(%) de aproximadamente 10% y correspondiendo el mayor valor al expandido de maíz con agregado del hidrolizado FC+F. Estas diferencias en la DFe(%) están ligadas principalmente al tamaño y características de las fracciones peptídicas generadas y a las interacciones de éstas con los diferentes componentes del producto. Los péptidos producidos durante la proteólisis de las globinas podrían mantener soluble al hierro hemínico evitando su polimerización al pH neutro del sitio de absorción (duodeno), lo que favorecería su disponibilidad para ser absorbido.

Dializabilidad del Zn (DZn(%)). Como se puede observar en la **Figura 3** los valores de DZn(%) obtenidos en expandidos adicionados del CHB o los distintos hidrolizados son significativamente superiores al del maíz. Sin embargo, sólo el expandido de maíz con agregado del hidrolizado FC presentó una DZn(%) mayor respecto del expandido con agregado de CHB, mientras que para las

demás muestras no se hallaron diferencias significativas, a excepción de la muestra con FC+F, que presentó menor DZn(%).

CONCLUSIONES

El valor de DFe(%) del Concentrado de Hemoglobina Bovina (CHB) fue bajo y menor al de los hidrolizados. Estos bajos valores de disponibilidad potencial no se correspondieron con aquellos altos valores de disponibilidad de Fe hemínico de comidas cárnicas, lo que ponen de manifiesto que la disponibilidad de Fe es baja cuando es evaluada fuera de su entorno natural que es la carne.

Para los productos extrudidos se obtuvieron los mayores valores de DFe(%) con las muestras más hidrolizadas

Si bien los productos expandidos fortificados con hidrolizados de hemoglobina presentaron mayor DFe(%) que los fortificados con hemoglobina, tanto la disponibilidad del Fe como la disponibilidad del Zn dependió del tipo de hidrolizado adicionado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Black M. 1998. Zinc deficiency and child development. American Journal of Clinical Nutrition, 68: 464-469.

Bouglé D, Bouhallab S. 2005. Chapter 3: Mineral-Binding proteins and peptides and Bioavailability of Trace Elements. Nutraceutical proteins an peptides in health and disease. CRC Press.

Bovell-Benjamin A, Viteri F, Allen L. 2000. Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. American Journal Clinical Nutrition, 71: 1563-1569.

Carpenter C, Mahoney A. 1992. Contribution of heme and non heme iron to human nutrition. Critical reviews in food science and nutrition, 31(4): 333-367.

Del Río de Reyes M, Constantinides S, Sgarbieri V, & El Dash A. 1980. Chicken blood plasma proteins: physicochemical, nutritional and fuctional properties. Journal of Food Science, 45: 17 – 20.

Ericsson C. 1983. Heme-iron-enriched amino acid and process for the preparation of heme-iron-enriched amino acid. U.S. Int. Patent 4,411,915.

García-Casal N, Layrisse M, Peña-Rosas J, Ramirez J, Leets I, Matus P. 2003. Iron absorption from elemental iron-fortified corn flakes in humans. Role of vitamins A and C. Nutrition Research, 23: 451-463.

Gibson R S. 2006. Inadequate intakes of zinc in developing countries practical household strategies to reduce risk of deficiency. Department of Human Nutrition, University of Otago, Duneding, New Zealand.

Hallberg L. 1981a. Bioavailable nutrient density: a new concept applied in the interpretation of food iron absorption data. American Journal Clinical Nutrition, 34: 2242-2247.

Hallberg L. 1981b. Bioavailability of dietary iron in man. Annual Review of Nutrition, 34: 123-147.

Hallberg L, Rossander L. 1982. Effect of soy protein on nonheme iron absorption in man. American. Journal Clinical Nutrition, 36: 514-520.

Hurrell R, Lynch S, Trinidad T, Sassenko S, Cook J. 1988. Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. American Journal Clinical Nutrition, 47: 102-107.

King J. (2000). Measuring iron and zinc bioavailability in humans. Food and Nutrition Bulletin, 21(4): 434-439.

Lee C, Love J, Johnson, L. 1993. Sensory and physical properties of cakes with bovine plasma products substituted for egg. Cereal Chemistry, 70: 18-21.

Liu X, Yonekura M, Tsutsumi M, Sano Y. 1996. Physicochemical Properties of Aggregates of Globin Hydrolysates. Journal Agriculture Food Chemistry, 44(10): 2957-2961.

López de Romaña D, Lönnerdal B, Kenneth H. 2003. Absortion of zinc from wheat products fortified with iron and either zinc sulphate or zinc oxide. American Journal of Clinical Nutrition, 57: 190-194.

Lynch S. 1997. Interaction of iron with other nutrients. Nutrition Review, 55(4): 102-110.

Mendoza C, Viteri F, Lonnerdal B, Raboy V, Young K, Brown K. 2001. Absorption of iron from unmodified maize and genetically altered low-phytate maize fotified with ferrous sulfate or sodium iron EDTA. American Journal Clinical Nutrition, 73: 80-85.

Miller D, Schricker B, Rasmussen R, Van Campen D. 1981. An in Vitro method for estimation of iron availability from meals. American Journal Clinical Nutrition, 34: 2248-2256.

Nielsen P, Petersen D, Dambmann C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. Journal of Food Science, 66(5): 642-646.

Sadettin T, Sule Ustun N, Bogachan Altunkaynak T. 2004. Effect of cooking methods on total and heme iron contents of anchovy (Engraulis encrasicholus). Food Chemistry, 88(2): 169-172.

Uzel C, Conrad M. 1998. Absorption of heme iron. Seminars in Hematology, 35: 27-34.

Vaghefi N, Nedjaoum F, Guillochon D, Bureau F, Arhan P, Bougle D. 2002. Influence of the extent of hemoglobin hydrolysis on the digestive absorption of heme iron. An in vitro study. Journal Agricultural of Food Chemistry, 50: 4969-4973.

Viteri E, Alvarez E, Batres R, Torun B, Pineda O, Mejia L, Sylvi J. 1995. Fortification of sugar with iron sodium ethylenediaminotetraacetate (FeNaEDTA) improves iron status in semirural Guatemalan populations. American Journal of Clinical Nutrition, 61: 1153-1163.

Walter T, Hertrampf E, Pizarro F, Olivares M, Llaguno S, Letelier A, Vega V, Stekel A. 1993. Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of schoolchildren: a nationwide program in Chile. American Journal of Clinical Nutrition, 57(2): 190-194.

Weinborn V, Olivares M, Arreondo M, Hertrampf E, Pizarro F. 2008. Effect of purified animal and vegetal proteins on Heme – iron bioavailability. 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals. Pucon – Chile, November 9th – 13th, 2008.

Wolfgor R, Rodríguez V, Pellegrino N, Valencia M. 1996. Evaluación de cereales fortificados como aportadores de Fe. Revista de la Sociedad Argentina de Nutrición, 7(2): 33-37.

Wolfgor R, Drago S, Rodríguez V, Pellegrino N, Valencia M. 2002. In vitro measurement of available iron in fortified foods. Food Research International, 35: 85-90.

Modificación de las propiedades viscoelásticas en masas agrias fermentadas por *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus sanfranciscensis*

Modification of viscoelastic properties of sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus sanfranciscensis*

Colín OJ (1), Poo PJ (2), Moreno-Terrazas R (2) López F (3) y Pedroza-Islas R (1,2)

(1) Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional, Legaria 694. Colonia Irrigación, 11500 México D. F.
(2) Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas. Programa de Ingeniería de Alimentos. Universidad Iberoamericana. Prol. Paseo de la Reforma 880. Lomas de Santa Fe, 01219 México D.F.
(3) Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. Estado de México
jucolin_oro@yahoo.com.mx

RESUMEN

El uso de masas agrias ha recobrado relevancia por las características de mejor calidad que imparte a la masa de pan blanco y porque este proceso de fermentación puede degradar las proteínas responsables de la intolerancia al gluten (enfermedad celíaca). Para la producción de masas agrias, se han utilizado diversos lactobacilos que modifican el gluten, alterando sus propiedades viscoelásticas. Dicha modificación puede ser descrita a través de pruebas de extensión y compresión. En este trabajo, el objetivo fue evaluar el efecto de tres tipos de lactobacilos (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. sanfranciscensis*) sobre las propiedades del gluten de masa de trigo. El mayor efecto observado correspondió a la masa con *Lb. brevis*, que disminuyó 79,51% su resistencia a la extensión y tuvo el mayor incremento en extensibilidad. Esta masa exhibió la menor extensibilidad biaxial ($1{,}12 \times 10^4$ Pa/s) con predominio del comportamiento viscoso. La masa fermentada con *Lb. plantarum*, obtuvo la menor modificación en la resistencia a la extensión y presentó la mayor extensibilidad biaxial ($12{,}0 \times 10^4$ Pa/s), con predominio del comportamiento elástico. Los microorganismos estudiados actuaron de manera diferenciada sobre los componentes proteínicos de la harina, afectando sus propiedades viscoelásticas, sugiriendo que la actividad proteolítica varía con el tipo de microorganismo. *Lb. brevis* tuvo la mayor actividad en relación con los otros microorganismos utilizados.

ABSTRACT

The use of sourdough has earned special interest over the last decades due to the benefits gained by its use in breadmaking. Also, during the fermentation process proteins responsible of the gluten intolerance (celiac sprue), can be hydrolyzed reducing its toxicity. Different lactic acid bacteria have been used for the production of sourdough. It is known that the rheological properties of gluten are modified by these lactic acid bacteria. These changes can be studied and described by extension and compression tests. The objective of this work was to study the effect of different lactobacillus: *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* and *Lb. sanfranciscensis*, on the gluten properties of wheat dough. The most noticeable effect corresponded to the sourdough produced by *Lb. brevis*. According to the extensional tests, *Lb. brevis* caused a 79,51% drop in maximum resistance and showed the largest extensibility increment. Also, this sourdough exhibited the lowest biaxial extensibility ($1{,}12 \times 10^4$ Pa/s) with a prevalence of a viscous behavior. The sourdough produced with *Lb. plantarum* showed the lowest stretching resistance modification, and the largest biaxial extensibility ($12{,}0 \times 10^4$ Pa/s), with a predominance of an elastic behavior. A differentiated behavior on the protein components of the flour was observed by the micro-organisms studied in this work. It was observed that viscoelastic properties of the dough were affected, suggesting that the proteolytic activity varies with the type of the microorganism. The results indicated that *Lb. brevis* had the largest activity when compared with the other microorganisms utilized.

PALABRAS CLAVE: *masas agrias, lactobacilos, pruebas de extensión.*

KEYWORDS: *sourdough, lactobacilli, extension tests.*

INTRODUCCIÓN

En los años recientes, se ha retomado el uso de las masas agrias como proceso de leudado en la producción de pan blanco por el mejoramiento que imparte en sus propiedades, tales como el incremento en la vida de anaquel, la inhibición de la proliferación microbiana, la mejora del sabor, el aumento en el volumen del pan, el retardo en el envejecimiento y la mejora en la calidad nutritiva basada en un menor índice glicémico (Thiele *et al.*, 2004, Arendt *et al.*, 2007). La fermentación para obtener masas agrias es empleada actualmente en la producción de más del 20% del pan producido en Europa Central, Francia e Italia y es esencial para una amplia variedad de productos (Gänzle *et al.* 1998).

También se ha incrementado el interés, dado que se ha identificado que ciertos péptidos de la gliadina son los responsables de la enteropatía de sensibilidad al gluten manifestada por los enfermos celíacos (Dieterich y Schuppan, 2007), enfermedad considerada dentro de las más frecuentes intolerancias a los alimentos y que afecta a 1 de cada 130 a 300 personas en Europa y los Estados Unidos de Norteamérica. En América Latina no se tienen registros sistematizados al respecto e incluso se piensa que está sub-diagnosticada en la zona (Borda *et al.* 2006).

Los péptidos responsables de producir la intolerancia, pueden ser hidrolizados totalmente por las peptidasas de ciertos lactobacilos, en fermentaciones prolongadas, eliminando prácticamente su toxicidad para personas sensibles (D'Archivio *et al.* 2004, Di Cagno *et al.* 2004).

El efecto benéfico de la adición de masa agria a los panes de trigo, se ha atribuido a la producción de metabolitos por los lactobacilos, como bacteriocinas y exopolisacáridos, entre otros, que actúan como mejoradores del pan (Arendt *et al.* 2007, Edema y Sanni 2008, Ketabi *et al.* 2008). No obstante, los panes obtenidos a partir de masas agrias exclusivamente, carecen de las propiedades de calidad atribuidas al pan blanco.

Las masas de harina trigo son consideradas como un material compuesto, que estructuralmente constituye un sistema complejo donde hay una interrelación entre las proteínas hidratadas y la matriz de almidón, influyendo en las propiedades viscoelásticas del sistema. Además, las proteínas del gluten se combinan entre sí por enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, confiriendo la habilidad especial para la retención de gas en la masa. Durante el proceso de horneado, la masa sufre grandes deformaciones alternando la extensión uniaxial a tasas de deformación de intermedias a grandes y la extensión biaxial a tasas de deformación de pequeñas a intermedias. Esta habilidad de las masas de trigo de formar películas altamente extensibles con capacidad de retención de gas es debida principalmente a las propiedades de deformación de las fracciones proteínicas del gluten (Sliwinski *et al.* 2004). La naturaleza de los cambios que tienen lugar durante el procesamiento de la masa hasta la obtención del pan, afectan la calidad del producto final. Dichos cambios pueden ser evaluados por medio de pruebas de extensión (Abang *et al.* 2008) y por deformación extensional biaxial, esto es la deformación en dos direcciones perpendiculares en un plano entre placas planas, usando superficies lubricadas (Dobraszczyk y Morgenstern 2003, Osorio *et al.* 2003). Existe un acuerdo general de la relación existente entre las pruebas de extensión y el comportamiento de la masa en la panificación (Andersen *et al.* 2004).

La adición de lactobacilos, modifica la estructura del gluten por la actividad enzimática de los mismos. Se ha utilizado una amplia variedad de bacterias lácticas como cultivos iniciadores para la fermentación, sin embargo cada especie posee diferentes actividades enzimáticas afectando la intensidad de las modificaciones. La masa agria es a su vez un sistema biológico muy complejo y es necesario estudiarlo para entenderlo y manejarlo con eficiencia, buscando desarrollar productos de calidad, que cubran necesidades específicas.

Por tal motivo, se planteó el estudio comparativo del efecto de tres de los lactobacilos (Lb) más frecuentemente encontrados en las masas agrias, *Lb. plantarum, Lb. brevis* y *Lb. sanfranciscensis*, sobre las propiedades viscoelásticas de la masa de trigo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se desarrollaron cuatro lotes de masa con 400 g de harina comercial de trigo (12% de proteínas) (Hoja de plata, Harinas Elizondo, México) y 150 mL de agua cada uno y se inocularon con 50 mL de una suspensión celular conteniendo 1,25 x 10^8 ufc/mL de *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lb. sanfranciscensis*, solos y en una combinación terciaria.

Las cepas de *Lb. plantarum y Lb. brevis* fueron aisladas de pan broa y la de *Lb. sanfranciscensis* se aisló de una bebida fermentada tradicional mexicana (pulque). Las masas se sometieron a una fermentación de 24 horas a una temperatura de 30 °C y una humedad relativa de 85%.

Una vez concluida la fermentación, se evaluó la extensibilidad uniaxial de las masas utilizando un gancho SMS/Kieffer, también conocido como microextensógrafo (Dunnewind *et al.* 2004) con una velocidad de prueba de 3,3 mm/s y una fuerza de tracción de 5 g. También fue evaluado el flujo extensional biaxial, sometiendo a las muestras a una deformación con una velocidad de desplazamiento constante de 0,3 mm/s y una compresión del 80% de su altura inicial, usando la prueba P100 (100 mm de diámetro) (Osorio *et al.* 2003). En ambos casos se utilizó un texturómetro TA.XT2 (Texture Analyser, Stable Microsystems, Reino Unido). Se evaluó una masa control, sin adición de microorganismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la prueba de extensión uniaxial se muestran en la **figura 1**. Puede observarse que la masa control presentó una resistencia a la extensión de 40,5 g_f, mientras que la masa inoculada con *Lb. brevis* disminuyó este parámetro en 79,51%, con *Lb. sanfranciscensis*, 41,98%, con *Lb. plantarum*, 22,97% y con la mezcla de los tres, 22,47%. Esto concuerda con lo observado por Schober *et al.* (2003) quienes encontraron que en presencia de ácido, se incrementaba la suavidad y la elasticidad del gluten. Sin embargo, con los resultados aquí obtenidos puede decirse que la modificación en la suavidad y en la elasticidad, no es ni uniforme ni generalizada.

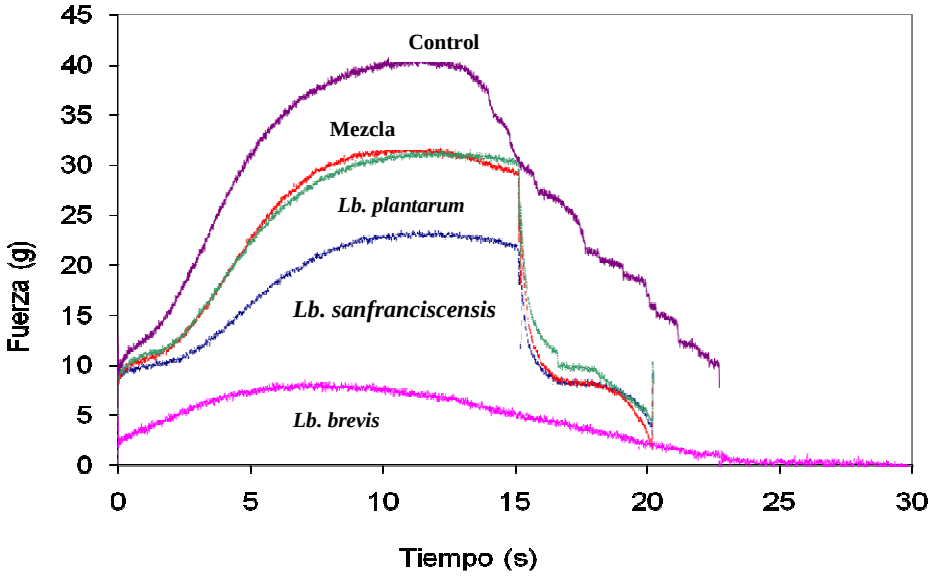


Figura 1. Gráficas de la extensión uniaxial de las masas agrias fermentadas con diferentes tipos de lactobacilos, comparadas con una masa control

La máxima resistencia a la extensión, ha sido atribuida principalmente a la glutenina (Verbruggen y Delcour 2003), mientras que las gliadinas imparten el carácter viscoso al gluten (Sun *et al.* 2009). En experimentos cuando se adicionó glutenina al gluten, se observó un incremento en la extensión máxima y un decremento en la extensibilidad (Verbruggen y Delcour 2003).

Kim *et al.* (1988) reportaron el efecto de la relación de glutenina a gliadina en las propiedades mecánicas del gluten en pruebas de extensión uniaxial, encontrando que un incremento en el contenido de gliadina, reducía la resistencia a la extensión e incrementaba la extensibilidad. En el presente trabajo, cuando las masas se fermentaron con *Lb. brevis* se observó una máxima disminución en la resistencia a la extensión (fig 1), lo que podría suponer que este microorganismo afectó a las

fracciones proteínicas responsables de la resistencia a la extensión y en menor medida a las que favorecen la extensibilidad.
Se ha sugerido que por la acción proteolítica, los grandes agregados proteínicos responsables de la integridad estructural de la masa se fraccionan en pequeños agregados de proteínas, dando lugar a un sistema más suave y menos elástico. Cabe mencionar, que las proteasas presentes en la harina de trigo, pueden también estar contribuyendo a los cambios mencionados, ya que su actividad se intensifica a valores de pH ácidos (Thiele *et al.* 2002).
Clarke *et al.* (2004) señalan que en condiciones de acidez, el incremento en las fuerzas de repulsión electrostática conduce al desdoblamiento de las proteínas del gluten y a un incremento en la exposición de grupos hidrofóbicos y que la presencia de fuerzas repulsivas electrostáticas, evitan la formación de nuevas uniones. El efecto neto de estos eventos es el debilitamiento de la estructura con la consecuente reducción de la fuerza. No obstante, las bases moleculares para explicar el incremento en elasticidad, permanecen poco claras.
Se observó durante la prueba de extensión, que el tiempo en que la muestra se rompió (extensibilidad) varió, siendo de 22,72 s para la muestra control, de 20,20 s para la masa con mezcla de microorganismos, 20,19 s para la de *Lb. plantarum* y *Lb. sanfranciscensis* y 29,9 s para la de *Lb. brevis*. Puede inferirse a partir de la forma de las curvas en relación a la muestra control (fig 1), una aparente pérdida de extensibilidad por la caída abrupta de las curvas de extensión, cuando la fermentación se efectuó con *Lb. plantarum*, con *Lb. sanfranciscensis* o con la mezcla de los tres lactobacilos, sugiriendo un comportamiento diferenciado sobre las proteínas del gluten con respecto al obtenido con *Lb. brevis*. La acción de este último microorganismo produjo una masa de muy baja resistencia a la extensión (fuerza) pero con muy larga extensibilidad, y fue el que mayor efecto tuvo sobre las propiedades de la masa.
Los resultados de la prueba de extensibilidad biaxial se muestran en la **figura 2**, donde se aprecian las curvas obtenidas por la compresión lubricada a velocidad de desplazamiento constante. Las formas de las curvas difirieron entre sí, aunque la de las masas con *Lb. plantarum*, *Lb. sanfranciscensis* y la de la mezcla, mostraron un comportamiento similar. Corsetti y Settani (2007) han mencionado que las interacciones entre las bacterias lácticas dependen de mecanismos variados en los que pueden encontrarse algunas ventajas competitivas.

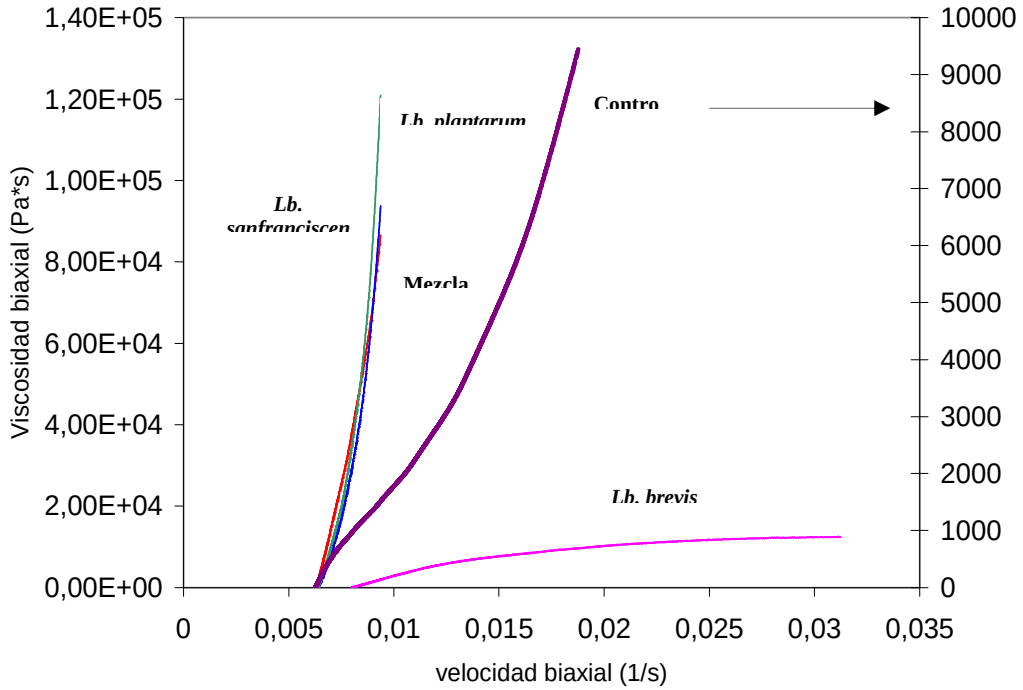


Figura 2. Gráficas de viscosidad biaxial de las masas fermentadas en función de las bacterias lácticas y comparadas con una masa control

La viscosidad extensional, definida como el resultado de la razón entre el esfuerzo biaxial y la velocidad de deformación biaxial, alcanzó el mayor valor cuando la masa fue inoculada con *Lb.*

plantarum ($12{,}0x10^4$ Pa/s), seguida de la masa con *Lb. sanfranciscensis* ($9{,}37x10^4$ Pa/s), luego la de la mezcla de los tres microorganismos ($8{,}64x10^4$ Pa/s) y por último, la masa que contenía *Lb. brevis* ($1{,}12x10^4$ Pa/s). La viscosidad de la masa control fue $0{,}94x10^4$ Pa/s. Aunque la viscosidad de esta masa fue menor que la de la masa con *Lb. brevis*, la forma de la curva de ésta última, sugiere que hay un predominio del comportamiento viscoso, mientras que en la masa control se mantuvo un equilibrio entre el comportamiento elástico y el viscoso. Resulta interesante observar que en la forma de la curva donde se encuentran presentes los tres microorganismos, supuestamente no se manifiesta la acción de *Lb. brevis*.

La apariencia de las masas obtenidas, concurrentemente con los efectos directos e indirectos de la acidificación de la masa, también fue diferente en función del tipo de microorganismo utilizado durante la fermentación. Di Cagno *et al.* (2004) mencionan que después de un proceso de fermentación prolongado (24 h), la estructura de la masa se colapsa lo cual coincide con lo observado en el presente trabajo.

Fue evidente que los microorganismos actuaron de manera diferenciada sobre los componentes proteínicos de la harina, afectando sus propiedades viscoelásticas. Coretti y Settani (2007), han clasificado a las especies de lactobacilos asociadas a la fermentación de masas agrias, así *Lb. brevis* y *Lb. sanfranciscensis* son catalogados como obligadamente heterofermentativos, esto es producen además del ácido láctico, CO_2, ácido acético/o etanol, mientras que *Lb. plantarum*, clasificado como heterofermentativo facultativo, con menor o nula producción de CO_2 y con un patrón diferente de fermentación de carbohidratos. Los resultados sugieren que la actividad proteolítica varía con el tipo de microorganismo y que *Lb. brevis* tuvo la mayor actividad en relación con los otros microorganismos estudiados.

CONCLUSIONES

Las propiedades viscoelásticas de las masas fueron afectadas diferencialmente, en función de cada microorganismo estudiado. *Lb. brevis* mostró la mayor actividad sobre los componentes de la masa, disminuyendo sustancialmente la resistencia a la extensión e incrementando la extensibilidad.

Lb. plantarum y *Lb. sanfranciscensis* incrementaron la viscosidad biaxial de las masas afectando en menor medida a los componentes que imparten elasticidad al sistema.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Carla Moita Brites por la donación de las cepas de lactobacilos, a la M.C. Mayela de la Rosa por su apoyo en los aspectos de cultivo bacteriano y al Dr, Miguel Frutis por sus amables comentarios sobre el escrito. La autora Colín agradece al CONACYT por el financiamiento otorgado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICÁS

Abang Zaidel DN, Chin NL, Abdul Rahman R, Karim R. 2008. Rheological characterization of gluten from extensibility measurement. Journal of Food Engineering, 86: 549-556.

Anderssen RS, Bekes F, Gras PW, Nikolov A, Wood JT. 2004. Wheat-flour dough extensibility as a discriminator for wheat varieties. Journal of Cereal Science, 39: 195-203.

Arendt EK, Ryan LAM, Dal Bello F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. Food Microbiology, 24: 165-174.

Borda GM, Kriebaum AM, Sánchez FA, Nicoletti CG. 2006. Enfermedad celiaca: Aún subestimada y sudiagnosticada. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina, 159: 26-30.

Clarke C, Schober TJ, Dockery P, O'Sullivan K, Arendt E. 2004. Whet sourdough fermentation: Effects of time and acidification on fundamental rheological properties. Cereal Chemistry, 81(3): 409-417.

Corsetti A, Settanni L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International, 40: 539-558.

Dieterich W, Schuppan D. 2007. Is gliadin harmful from the first morsel? Digestive and Liver Disease, 39: 917-921.

D´Archivio M, Landolfo F, Parrilli G, Minervini F, Arendt E, Gobetti M. 2004. Sourdough bread made from wheat and nontoxic selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Applied and Enviromental Microbiology, 70: 1088-1096.

Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, Greco L, Clarke Ch, De Vincenzi, M, Giovannini C, Dobraszczyk BJ, Morgenstern MP. 2003. Rheology and the breadmaking process. Journal of Cereal Science, 38: 229-245.

Dunnewind B, Sliwinski EL, Grolle K, Van Vliet T. 2004. The Kieffer dough and gluten extensibility rig. An experimental evaluation. Journal of Texture Studies, 34: 537-560.

Edema MO, Sanni AI. 2008. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. Food Microbiology, 25: 616-625.

Ketabi A, Solimanian-Zad S, Kadivar M, Sheikh-Zeinoddin M. 2008. Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. Food Research International, 41 (10): 948-951.

Gänzle MG, Ehmann M, Hammes WP. 1998. Modeling of growth of Lactobacillus sanfranciscensis and Candida millera in response to process parameters of sourdough fermenttion. Applied and Environmental Microbiology, 2616-2623.

Kim JJ, Kieffer R, Belitz HD. 1988. Rheological properties of wheat gluten, containing different amounts of prolamins from various cereals. Z. Lebensmittel Unters Forsch, 186: 16-21.

Osorio F, Gahona E, Álvarez F. 2003. Water absorption effects on biaxial extensional viscosity of wheat flour dough. Journal of Texture Studies, 34: 147-157.

Schober TJ, Dockery P, Arendt EK. Model studies for wheat sourdough systems using gluten, lactate buffer and sodium chloride. European Food Research Technology, 217: 235-243.

Sliwinski EL, van der Hoef F, Kolster P, van Viet T. 2004. Large-deformation properties of wheat dough in uni- and biaxial extension. Part II. Gluten dough. Rheological Acta, 43: 321-332.

Thiele C, Grassl S, Ganzle M. 2004. Gluten hydrolysis and depolimerization during sourdough fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1307-1314.

Verbruggen IM, Delcour JA. 2003. Extension properties of wheat flour dough fortified with characterized wheat gluten fractions. Journal of Cereal Science, 37: 151-156.

Estudio de las propiedades térmicas de proteínas de maní mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Differential scanning calorimetry (DSC) studies on thermal properties of peanut proteins

Colombo A (1), Ribotta PD (1), León AE (1)

(1) CONICET – Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
acolombo@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

La adición de proteínas de maní como suplemento proteico permite elevar la calidad nutricional y, al mismo tiempo, mejorar los atributos sensoriales de los alimentos. El conocimiento de las propiedades térmicas de las proteínas es fundamental en la elaboración de alimentos; sin embargo, su estudio en proteínas de maní ha sido limitado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar el comportamiento térmico de las proteínas de maní mediante DSC, examinando la influencia de distintos compuestos sobre la desnaturalización térmica. Se preparó aislado proteico de maní (APM) a partir de harina de maní deslipidizada y se estudiaron sus propiedades térmicas con un calorímetro. El APM mostró dos endotermas que corresponden a las fracciones proteicas de conaraquinas y araquinas. Se analizó la cinética de desnaturalización del APM, obteniéndose energías de activación (E_a) de 57,31 kcal/mol y 98,91 kcal/mol para conaraquinas y araquinas, respectivamente. Se estudió la influencia del contenido de agua sobre la desnaturalización y se obtuvo, para cada una de las fracciones proteicas, un nivel crítico de agua por debajo del cual la relación entre T_d y el contenido de agua fue inversa. Se analizó la influencia de distintos compuestos sobre la desnaturalización. La urea produjo una disminución de la entalpía de desnaturalización (ΔH) en ambas fracciones, producto del efecto de la urea sobre la estructura de los puentes hidrógenos del agua y a su interacción con los residuos menos polares y con el esqueleto de las proteínas. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se une a las proteínas mediante la interacción entre los grupos sulfatos y las cadenas laterales de aminoácidos cargadas positivamente, y entre las cadenas alquílicas y las cadenas laterales. Para la fracción de araquinas, el agregado de SDS produjo una disminución de la T_d y el ΔH. Para la fracción de conaraquinas, los resultados obtenidos luego del agregado de SDS indicaron desnaturalización y una estructura menos estable. El ditioteitrol (DTT) redujo los enlaces disulfuro de las proteínas, causando desestabilización. DTT produjo una disminución drástica del ΔH de conaraquinas. Para la fracción de araquinas, el agregado de DTT causó una disminución de T_d (y por lo tanto una disminución de la estabilidad térmica) y del ancho a la altura media de pico ($\Delta T_{1/2}$) (al igual que para conaraquinas), lo que indicaría una disminución en el número de enlaces disulfuro. En este trabajo se pudieron determinar parámetros relacionados a la desnaturalización térmica de las proteínas de maní, como la E_a y el nivel crítico de agua. El agregado de los agentes desnaturalizantes permitió determinar la importancia de cada tipo de interacción en el mantenimiento de la estructura nativa de las fracciones proteicas predominantes en maní.

ABSTRACT

Peanut protein addition to food allow to reduce malnutrition problems and, simultaneously, to enhance its sensorial attributes. Although thermal properties of proteins are very important in food processing, peanut proteins have not been studied so much. Therefore, the aims of this work were to analyze the thermal behaviour of peanut proteins by DSC and to examine the effect of several compounds on thermal denaturalization. Peanut protein isolate (PPI) was made from delipidized peanut flour and its thermal properties were studied with a calorimeter. PPI showed two endothermic peaks corresponding to conarachin and arachin fractions. Denaturation kinetics of PPI was analyzed and activation energies of 57, 31 kcal/mol and 98, 91 kcal/mol (corresponding to conarachin and arachin, respectively) were obtained. Water content effects on denaturalisation were studied; each protein fraction showed a critical water level. Just below this water level, inverse relationships between the denaturation

temperatures (T_d) and water contents were found. Urea addition decreased denaturalisation enthalpy (ΔH) values of both protein fractions. This compound affects hydrogen bonding structure of water and interacts with the less polar residues and with the backbone of proteins. Sodium dodecyl sulphate (SDS) joins to proteins by means of interactions between its sulphate groups and aminoacidic side chains bearing positive charge and between detergent alquilic chains and protein side chains. SDS lowered T_d and ΔH of arachin fraction. Besides, SDS addition caused denaturalisation and formation of a less stable structure of conarachin proteins. Dithiotreytol (DTT) disrupted disulfide bonds of proteins, producing protein desestabilization. ΔH values of conarachin were strongly lowered by DTT. Moreover, thermal stability of arachin proteins was diminished by DTT. Both protein fraction showed a less cooperative denaturation with DTT addition indicating a decrease in the number of disulfide bonds. In conclusion, two parameters related to thermal denaturation of peanut protein (activation energies and critical water contents) were determined. The addition of various compounds to protein isolate allowed determination of main interactions concerning native structure protein maintenance.

PALABRAS CLAVE: *proteínas, maní, desnaturalización, DSC.*

KEYWORDS: *proteins, peanut, denaturalisation, DSC.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la necesidad de incrementar la utilización de proteínas derivadas de oleaginosas. Las proteínas de maní constituyen una alternativa interesante para este fin, ya que su incorporación en los alimentos permite aliviar problemas de mal nutrición y, al mismo tiempo, mejorar los atributos sensoriales de los alimentos. La extracción del aceite de maní produce harina de maní parcialmente deslipidizada, que contiene aproximadamente 50% de proteínas con un alto contenido de aminoácidos esenciales, constituyendo una excelente fuente proteica de bajo costo (Yu *et al.*, 2007). A partir de esta harina deslipidizada se pueden obtener concentrados y aislados proteicos, aptos para ser incorporados en diversos sistemas alimenticios. A pesar de la importancia que tienen las propiedades térmicas y funcionales de las proteínas en la elaboración de alimentos, el estudio de estas propiedades en proteínas de maní ha sido limitado. Muchos de los tratamientos térmicos utilizados comúnmente en la industria alimenticia provocan una pérdida sustancial de la estructura nativa de las proteínas, la cual es crítica para su funcionalidad (Kinsella, 1976). Por lo tanto, el conocimiento de los cambios inducidos sobre las proteínas durante los procesos térmicos es de fundamental importancia en la comprensión de las propiedades funcionales. El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades térmicas de las proteínas de maní mediante Calorimetría diferencial de Barrido (DSC), analizando la influencia del contenido de agua sobre la desnaturalización y utilizando distintos compuestos capaces de perturbar la estructura proteica para comprender las interacciones que la mantienen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislado proteico de maní (APM)

Se preparó harina a partir de semillas de maní crudo (Runner Tegua) y se sometió a extracción en frío con hexano, con el objetivo de eliminar la fracción lipídica. Esta harina deslipidizada se suspendió en agua (relación harina:agua 1:20) y se ajustó a pH 10 utilizando NaOH 1N. La suspensión se agitó durante 1 h a temperatura ambiente (para solubilizar la mayor cantidad de proteínas) y luego se centrifugó a 3000 *g* durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue llevado a pH 4,5 (pH isoeléctrico de las proteínas de maní) con HCl 1N. Se obtuvo un precipitado (aislado proteico), que fue separado por centrifugación (a 3000 *g* durante 15 min) y resuspendido en agua en proporción 1:10. Esta suspensión fue dializada contra agua destilada y, posteriormente, liofilizada. El contenido de nitrógeno de los aislados se determinó mediante el método de Kjeldhal. El porcentaje de proteínas (N x 6,25) fue 79,33 ± 0,32%.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de los aislados proteicos de maní fueron estudiadas con un calorímetro Mettler Toledo DSC 823^e (Mettler Toledo, Suiza). La temperatura de inicio (T_o), la temperatura de pico o de desnaturalización (T_d), la entalpía de desnaturalización (ΔH) y la cooperatividad,

representada por el ancho a la altura media de pico ($\Delta T_{1/2}$), fueron analizados mediante el software Stare version 9.0x (Mettler Toledo, Suiza) a partir de los termogramas obtenidos.

Cinética de desnaturalización

Se analizó la cinética de desnaturalización de las proteínas de maní mediante DSC utilizando el método dinámico de Ozawa (Ozawa 1970). Se consideró que la relación entre la temperatura y la velocidad de reacción podía ser explicada mediante la ecuación de Arrhenius. Por lo tanto, la energía de activación (E_a) de esta ecuación se pudo obtener calculando la pendiente de una regresión lineal entre $\ln(\beta/T_d^2)$ y $1/T_d$ (β = velocidad de calentamiento). Se pesaron 3 mg de aislado seco en cápsulas de aluminio y se agregaron 15 µL de agua. Las cápsulas fueron herméticamente cerradas e incubadas a temperatura ambiente por 24 h. Se utilizó una cápsula de aluminio vacía y cerrada como referencia. Las muestras fueron calentadas a diferentes velocidades de calentamiento: 2,5, 5, 10, 15, 20 y 25 °C/min y se determinó la T_d de cada corrida.

Influencia del contenido de agua sobre la desnaturalización proteica

Para estudiar el efecto del agua sobre la desnaturalización proteica, se pesaron 3 mg de muestra en cápsulas de aluminio y se agregó agua para obtener suspensiones al 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, y 60% p/p de aislado proteico en agua. Las cápsulas fueron herméticamente cerradas e incubadas a temperatura ambiente por 24 h y se calentaron desde 30 hasta 120 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, utilizándose una cápsula de aluminio vacía y cerrada como referencia.

Efecto de diversos aditivos sobre la desnaturalización de APM

Se analizó la influencia de urea, dodecil sulfato de sodio (SDS) y ditiotreitol (DTT) sobre las propiedades térmicas de los aislados. Estos compuestos, capaces de perturbar la estructura proteica, fueron disueltos en buffer fosfato de sodio 0,05 M de pH = 7, en distintas concentraciones. Se pesaron 3 mg de aislado proteico y se agregaron 15 µL de buffer fosfato conteniendo los distintos aditivos antes mencionados. Las cápsulas fueron herméticamente cerradas, incubadas (a temperatura ambiente por 24 h) y posteriormente calentadas desde 30 hasta 120 °C a 10°C/min, utilizándose una cápsula de aluminio vacía y cerrada como referencia.

Análisis estadístico

En todos los casos se realizaron las determinaciones por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio ± la desviación estándar. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el Método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación de 0,05. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Infostat (Infostat 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la cinética de desnaturalización

En la **figura 1** se muestra un termograma obtenido para aislado proteico de maní en agua al 30% p/p. El 90% de las proteínas de maní corresponden a globulinas que se clasifican en dos fracciones principales: araquinas (14S) y conaraquinas (8S) (Mouécoucou *et al.* 2004). El termograma mostró dos picos endotérmicos, uno a aproximadamente 102 °C y otro aproximadamente a 91 °C, los cuales pueden ser atribuidos a la desnaturalización a las fracciones de araquinas y conaraquinas, respectivamente (Slade y Levine 2006). La energía de activación (E_a) para el proceso de desnaturalización se obtuvo mediante el método de Ozawa. En la **figura 2** se observa la representación entre $\ln(\beta/T_d^2)$ y $1/T_d$ y la curva ajustada para las fracciones de araquinas y conaraquinas. Para la fracción de conaraquinas, se obtuvo una E_a de 57,31 kcal/mol, con un coeficiente de correlación de 0,94. Para la fracción de araquinas, la E_a fue de 98,91 kcal/mol y el coeficiente de correlación de 0,96. Laidler y Bunting (1973) informaron que las energías de activación para desnaturalización térmica de proteínas variaron entre 40,8 kcal/mol (tripsina) y 129,0 kcal/mol (ovoalbúmina), por lo que los valores obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de este rango.

Efecto del contenido acuoso sobre la desnaturalización proteica

En la **figura 3** se muestran los termogramas obtenidos para el aislado proteico de maní conteniendo distintas proporciones de agua; los valores de T_o, T_d, ΔH y $\Delta T_{1/2}$ para estos termogramas, se informan en la **tabla 1**. El agua, que juega un papel fundamental en los sistemas alimenticios, afecta la conformación de las proteínas (Arntfield *et al.* 1990). Para cada una de las fracciones proteicas, se

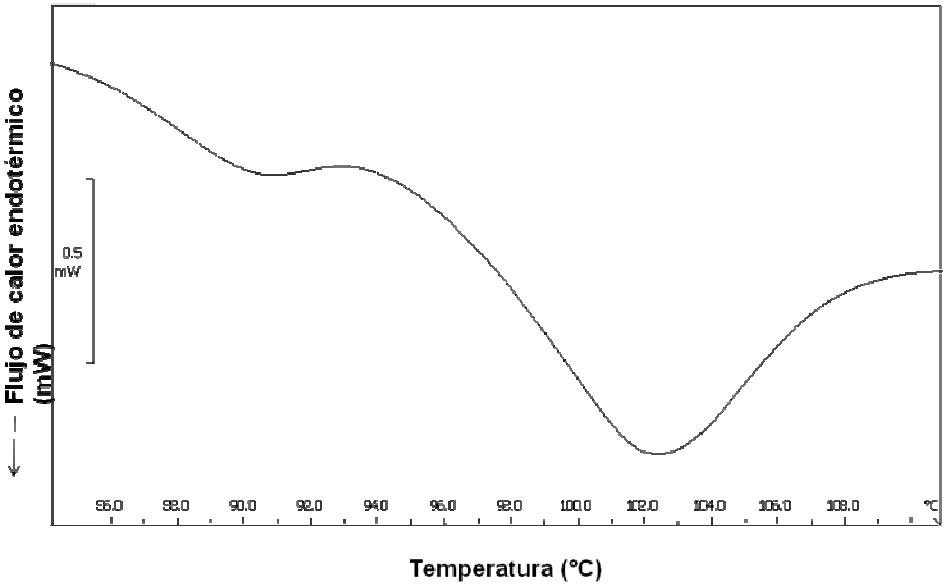
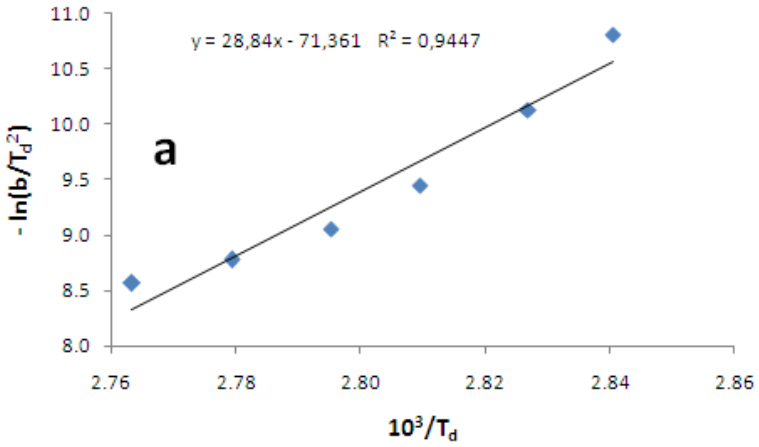


Figura 1. Termograma de DSC de aislado proteico de mani en agua al 30 % p/p (hr = 10 °C/min).



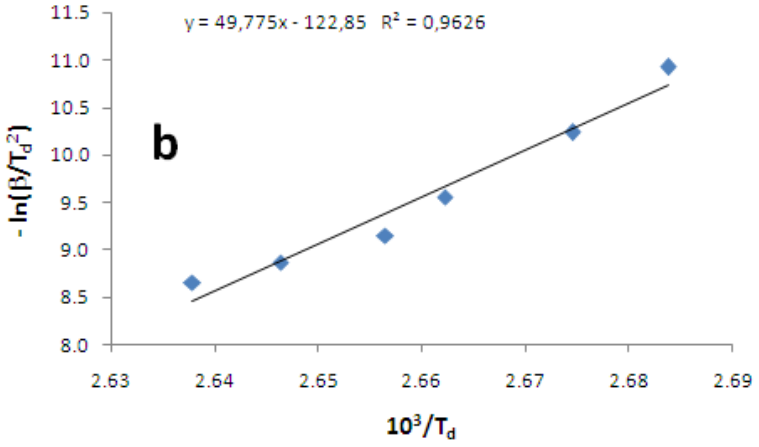


Figura 2. Valores y regresión lineal entre $\ln(\beta/T_d^2)$ y $1/T_d$ para las proteínas de maní: a) conaraquinas y b) araquinas. Se informan la ecuación y los coeficientes de regresión.

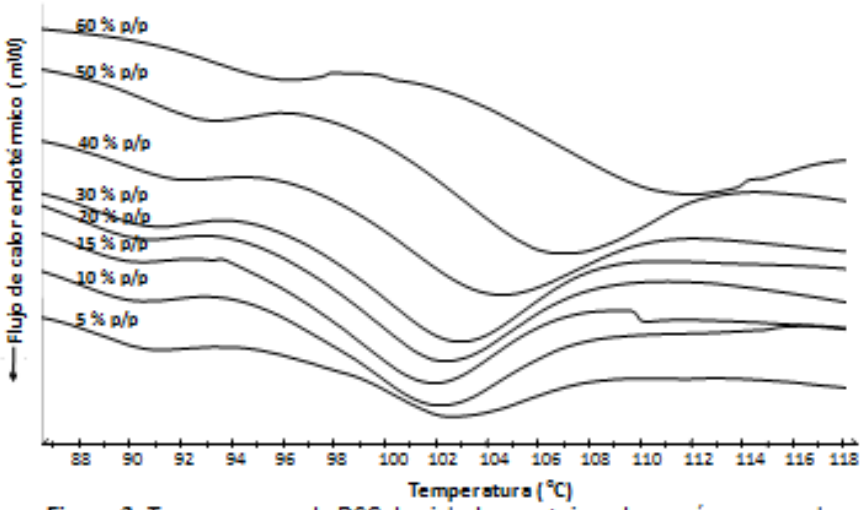


Figura 3. Termogramas de DSC de aislados proteicos de maní en agua al 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% y 60% p/p

Tabla 1. Temperatura de inicio (To), temperatura de desnaturalización (Td), entalpía de desnaturalización (ΔH) y ancho a la altura media de pico (ΔT1/2) de suspensiones de aislados proteicos de maní en agua. Se informan los parámetros correspondientes a las endotermas de conaraquinas y de araquinas.*

Endoterma de desnaturalización de conaraquinas				
Aislado proteico de maní en agua (% p/p)	**T_o (°C)**	**T_d (°C)**	**□H (J/g de aislado)**	**□$T_{1/2}$ (°C)**
5	85,51 ± 0,60 a	89,41 ± 0,04 a	0,76 ± 0,01 a	4,03 ± 0,35 ab
10	86,04 ± 0,27 ab	89,53 ± 0,08 ab	0,80 ± 0,06 ab	3,82 ± 0,13 a
15	86,07 ± 0,54 ab	89,76 ± 0,19 ab	0,76 ± 0,09 a	3,83 ± 0,08 a
20	85,63 ± 0,68 a	89,64 ± 0,40 ab	1,07 ± 0,15 bc	4,08 ± 0,13 ab
30	86,02 ± 0,03 ab	90,23 ± 0,35 b	1,16 ± 0,07 c	3,95 ± 0,09 ab
40	86,86 ± 0,26 b	91,11 ± 0,59 c	1,28 ± 0,21 c	4,27 ± 0,25 bc
50	88,75 ± 0,33 c	92,96 ± 0,36 d	1,26 ± 0,06 c	4,28 ± 0,01 bc
60	91,41 ± 0,52 d	95,84 ± 0,33 e	1,21 ± 0,23 c	4,54 ± 0,01 c
Endoterma de desnaturalización de araquinas				
Aislado proteico de maní en agua (% p/p)	**T_o (°C)**	**T_d (°C)**	**□H (J/g de aislado)**	**□$T_{1/2}$ (°C)**
5	95,69 ± 0,44 a	101,09 ± 0,15 a	3,89 ± 1,14 a	6,14 ± 0,34 a
10	95,34 ± 0,25 a	101,39 ± 0,04 a	9,14 ± 0,41 b	6,97 ± 0,23 b
15	95,19 ± 0,54 a	101,47 ± 0,08 a	10,86 ± 2,68 bcd	7,39 ± 0,57 b
20	95,25 ± 0,39 a	101,68 ± 0,28 a	12,21 ± 1,39 cd	7,29 ± 0,30 b
30	95,88 ± 0,11 a	102,19 ± 0,11 a	12,84 ± 0,58 d	7,33 ± 0,21 b
40	97,19 ± 0,48 b	103,49 ± 0,47 b	9,83 ± 0,25 bc	6,91 ± 0,05 b
50	99,27 ± 0,17 c	106,67 ± 0,48 c	11,10 ± 0,93 bcd	8,26 ± 0,08 c
60	102,94 ± 0,49 d	111,56 ± 1,15 d	8,63 ± 0,93 b	9,24 ± 0,21 d

*Medias ± desviaciones estándares de duplicados, Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

pudo observar que a medida que disminuye el contenido de agua en el sistema, aumentan tanto la temperatura de inicio (T_o) como la de pico (T_d). En la **figura 4** se muestra la relación entre la temperatura de pico y la entalpía de desnaturalización combinada (correspondiente a la suma de las entalpías de cada fracción proteica) con el contenido acuoso del sistema (expresado como g agua/g

APM). Para ambas fracciones proteicas, existe un nivel crítico de agua por debajo del cual la relación entre T_d y el contenido de agua es inversa. Este nivel crítico, que varía según el origen de las proteínas analizadas, es bastante similar para araquinas y conaraquinas (aproximadamente 2,3 g/g). El contenido acuoso crítico está relacionado a la hidratación de las proteínas de manera tal que la temperatura de desnaturalización se incrementa cuando el agua disponible solamente pertenece a la primera capa de hidratación (asociada directamente a la proteína) o segunda capa de hidratación (estructurada por la proteína). Las moléculas de agua asociadas con la hidratación de las proteínas requieren mayor energía para movilizarse y formar parte del proceso de desnaturalización (Arntfield *et al.* 1990). Asimismo, a partir del nivel crítico de agua antes mencionado, se observa una disminución de los valores de ΔH a medida que disminuye el contenido acuoso, lo que está asociado a un menor grado de desnaturalización de las proteínas (Hagerdal y Martens 1976). La **figura 4** también muestra una disminución de la entalpía de desnaturalización a partir del nivel crítico con el aumento de la cantidad de agua del sistema, indicando que la energía necesaria para desestabilizar la estructura proteica es menor. Tanto para araquinas como para conaraquinas, el ancho a la altura media de pico ($\Delta T_{1/2}$) aumentó significativamente a medida que el contenido de agua disminuyó (**tabla 1**), indicando una disminución de la cooperatividad del proceso de desnaturalización.

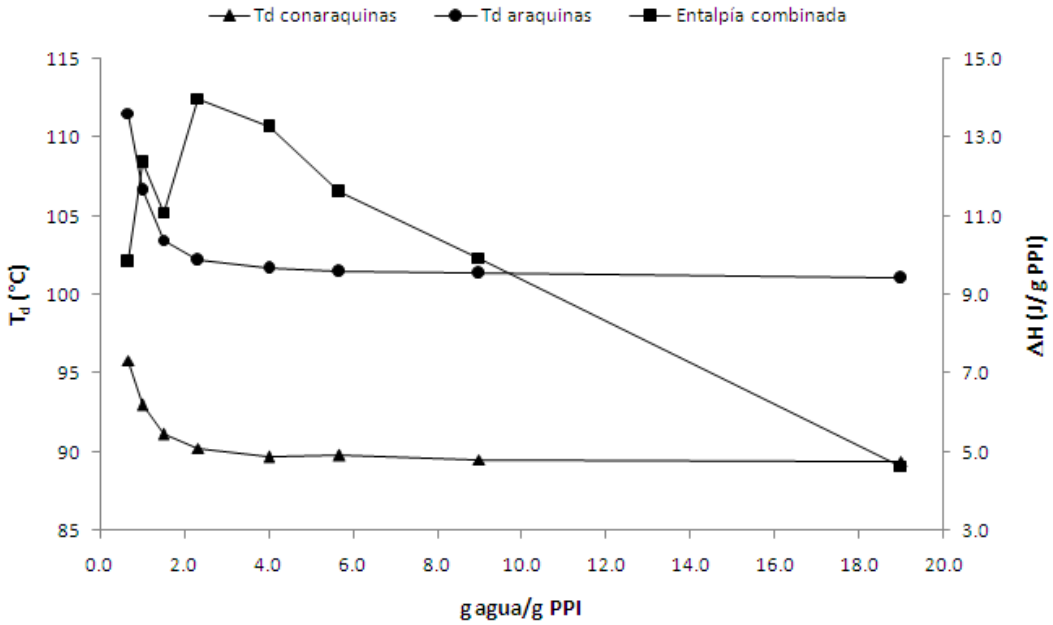


Figura 4. Relación entre la temperatura de desnaturalización (T_d) y la entalpía de desnaturalización combinada (correspondiente a la suma de las entalpías de cada fracción proteica) con el contenido acuoso del sistema (expresado como g agua/g APM).

Efecto del agregado de urea

Para comprender con mayor detalle el comportamiento térmico de las proteínas de maní, se analizó la influencia de diversos compuestos sobre las desnaturalización proteica. En la **figura 5** se muestra el efecto de distintas concentraciones de urea sobre T_d y ΔH. Se puede ver que a medida que aumenta la concentración de urea disminuye el ΔH, lo que implica que existe una disminución de la energía requerida para la desnaturalización, en coincidencia con otros estudios (Ellepola y Ma 2006; Tang 2007). La T_d aumentó inicialmente para la fracción de conaraquinas, pero comenzó a disminuir a partir de una concentración de urea 4 M, para la fracción de araquinas no se observaron diferencias significativas en la temperatura de desnaturalización hasta una concentración de urea de 4 M, a partir de la cual comenzó a disminuir. Chan y Ma (2002), estudiando proteínas de semillas de lino, también observaron un aumento en T_d con el agregado de urea. La urea, que es un compuesto comúnmente utilizado para desnaturalizar proteínas, puede también estabilizarlas, ya que rompe la estructura de puentes hidrógenos del agua, lo cual permite que las proteínas se desplieguen más fácilmente por el debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas (Kinsella, 1982). Asimismo, aumenta la

"permisividad" del agua para los residuos apolares, causando una disminución del orden de la estructura proteica y de la estabilidad térmica (Harwalkar y Ma 1987). Recientemente, Stumpe y Grubmüller (2007) determinaron que, además de interferir en la estructura de puentes hidrógenos del agua, la urea interacciona principalmente con los residuos menos polares y con el esqueleto de las proteínas, desplazando a las moléculas de agua y facilitando el despliegue de la proteína por la exposición de los grupos apolares. Desde este punto de vista, en la desnaturalización inducida por urea, las interacciones hidrofóbicas serían más determinantes que las interacciones de grupos polares.

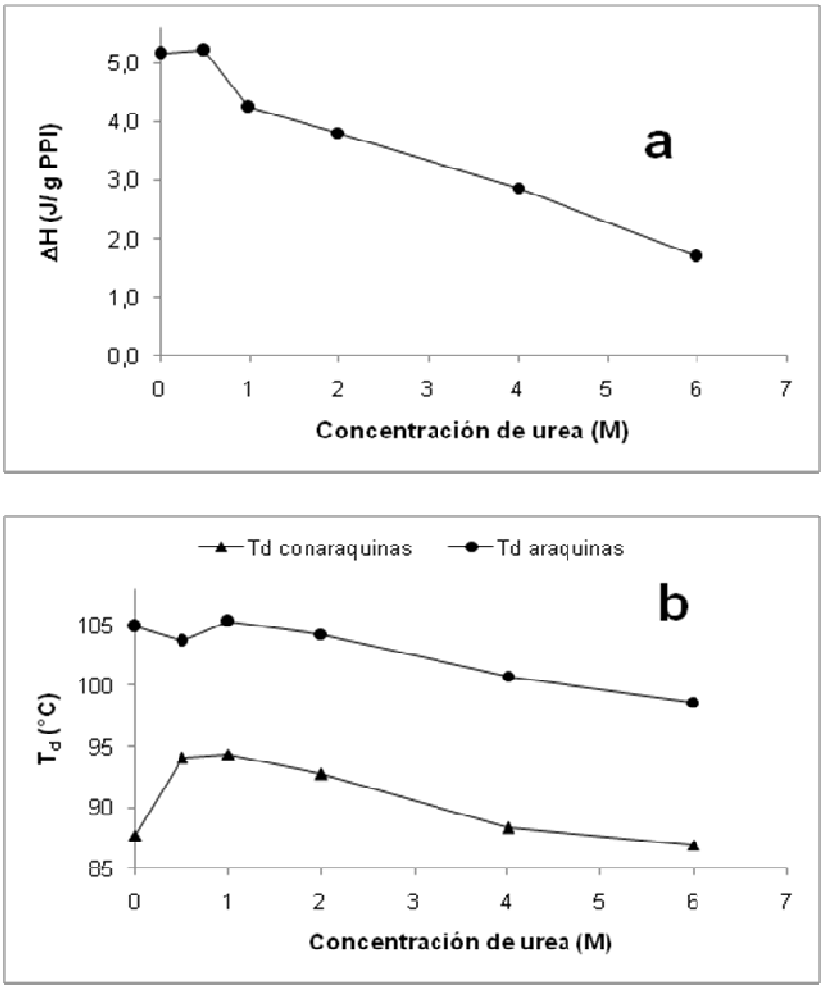


Figura 5. Efecto de distintas concentraciones de urea sobre: a) ΔH combinado (suma de las entalpías de cada fracción) y b) T_d de conaraquinas y araquinas.

Efecto de la adición de SDS

En la **tabla 2** se muestra el efecto de SDS sobre la temperatura de desnaturalización de araquinas y conaraquinas. Para la fracción de conaraquinas, el agregado de SDS produjo un aumento de $\Delta T_{1/2}$ y una disminución drástica del ΔH. La T_d comenzó a disminuir significativamente a partir de 20 mM. Estos resultados indican desnaturalización previa y una estructura menos estable. Un número considerable de moléculas cambian a un estado que contribuye mucho menos a la transición de desnaturalización, causando entonces una disminución significante de la entalpía calorimétrica (Gorinstein *et al.* 2001), Para la fracción de araquinas, la T_d disminuyó sólo a partir de SDS 40 mM y el ΔH, a partir de SDS 20 mM. El SDS puede ejercer tanto un efecto estabilizante como desestabilizante en las proteínas, dependiendo de su concentración (Arntfield *et al.* 1990). La desnaturalización de proteínas por SDS ocurre típicamente a concentraciones de SDS en agua superiores a 7 mM (concentración micelar crítica) (Gimel y Brown 1996). Este detergente se une a las proteínas mediante la interacción entre los grupos sulfatos y las cadenas laterales de aminoácidos

cargadas positivamente, y entre las cadenas alquílicas y las cadenas laterales hidrofóbicas (Wang *et al.* 1996).

Tabla 2. Efecto de distintas concentraciones de SDS sobre los parámetros de desnaturalización térmica de aislados proteicos de maní. Se informan los parámetros correspondientes a las endotermas de conaraquinas y de araquinas.*

Endoterma de desnaturalización de conaraquinas				
Concentración de SDS (mM)	**T_o (°C)**	**T_d (°C)**	**□H (J/g de aislado)**	**□$T_{1/2}$ (°C)**
0 (control)	84,35 ± 1,36 ba	88,47 ± 0,47 b	2,39 ± 0,12 b	5,19 ± 0,25 a
5	82,59 ± 0,75 ab	87,03 ± 1,18 ab	1,50 ± 0,25 a	5,56 ± 0,21 a
10	80,67 ± 0,49 ab	87,17 ± 0,70 ab	1,14 ± 0,06 a	6,27 ± 0,01 b
20	78,02 ± 2,91 a	85,15 ± 0,48 a	1,18 ± 0,00 a	6,23 ± 0,04 b
40	sin respuesta térmica			
Endoterma de desnaturalización de araquinas				
Concentración de SDS (mM)	**T_o (°C)**	**T_d (°C)**	**□H (J/g de aislado)**	**□$T_{1/2}$ (°C)**
0 (control)	99,12 ± 0,42 c	104,34 ± 0,11 b	3,73 ± 0,34 b	5,87 ± 0,00 ab
5	97,85 ± 0,23 bc	103,81 ± 0,04 b	3,63 ± 0,52 b	6,16 ± 0,14 b
10	97,32 ± 0,19 b	103,72 ± 0,35 b	4,16 ± 0,05 b	6,59 ± 0,01 c
20	97,55 ± 0,81 b	104,11 ± 0,02 b	2,025 ± 0,05 a	5,51 ± 0,18 a
40	94,49 ± 1,05 a	101,81 ± 0,45 a	2,445 ± 0,02 a	7,65 ± 0,25 d

*Medias ± desviaciones estándares de duplicados. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Efecto del agregado de DTT

Tabla 3. Efecto de distintas concentraciones de DTT sobre proteínas de maní. Se informan los parámetros correspondientes a las endotermas de conaraquinas y de araquinas.*

Endoterma de desnaturalización de conaraquinas				
Con DTT/mM	**T_o (°C)**	**T_d (°C)**	**□H (J/g de aislado)**	**□$T_{1/2}$ (°C)**
0,00	82,1 ± 0,71 a	87,73 ± 0,76 a	2,63 ± 0,03 b	6,07 ± 0,10 c
10,00	84,91 ± 0,42 b	89,37 ± 0,33 b	1,80 ± 0,08 a	4,62 ± 0,11 a
20,00	86,39 ± 0,52 c	90,81 ± 0,36 c	1,53 ± 0,27 a	4,95 ± 0,14 b
50,00	84,53 ± 0,49 b	88,93 ± 0,15 b	1,45 ± 0,04 a	4,56 ± 0,09 a
100,00	84,11 ± 0,46 b	88,60 ± 0,43 ab	1,42 ± 0,25 a	5,12 ± 0,13 b
Endoterma de desnaturalización de araquinas				
Con DTT/mM	**T_o (°C)**	**T_d (°C)**	**□H (J/g de aislado)**	**□$T_{1/2}$ (°C)**
0,00	98,97 ± 0,24 c	104,89 ± 0,05 c	2,53 ± 0,28 b	6,03 ± 0,41 c
10,00	96,64 ± 0,23 b	101,50 ± 0,57 b	2,59 ± 0,24 b	5,76 ± 0,30 bc
20,00	97,44 ± 0,11 b	101,75 ± 0,35 b	1,27 ± 0,15 a	5,56 ± 0,27 abc
50,00	95,30 ± 0,13 a	99,74 ± 0,15 a	2,21 ± 0,35 b	5,32 ± 0,21 ab
100,00	95,15 ± 0,60 a	99,29 ± 0,55 a	0,98± 0,11 a	4,97 ± 0,00 a

La fracciones de araquinas y conaraquinas pueden ser disociadas en diferentes subunidades mediante SDS y agentes reductores (Basha y Cherry 1976). En la **tabla 3** se observa el efecto de varias concentraciones de DTT sobre las fracciones de araquinas y conaraquinas. DTT es una agente reductor y puede reducir los enlaces disulfuro a grupos sulfhidrilo en las proteínas, causando desestabilización. Para la fracción de conaraquinas, se observó que la T_d aumentó significativamente con el agregado de DTT hasta 20 mM. Para concentraciones mayores a 20 mM, la T_d fue similar a la del control, La entalpía de desnaturalización y el ancho a la altura media de pico disminuyeron drásticamente con agregado de DTT. Debido a que los enlaces disulfuro necesitan mucha energía para ser rotos, la ruptura de estos enlaces antes de la desnaturalización térmica reduce marcadamente la energía necesaria para desorganizar la estructura remanente (Uruakpa y Arntfield 2006). Para la fracción de araquinas, se observó una disminución drástica de T_d con el agregado de DTT y no se observó una tendencia clara para los valores de ΔH. Sin embargo, al igual que en la fracción de conaraquinas, se observó una disminución drástica de $\Delta T_{1/2}$. La desnaturalización proteica implica transiciones cooperativas, en las cuales varios enlaces se rompen simultáneamente. Por lo tanto, los valores menores de $\Delta T_{1/2}$ obtenidos luego del agregado de DTT, indicarían una disminución en el número de enlaces disulfuro.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se determinaron parámetros relacionados a la desnaturalización térmica de proteínas de maní, como la E_a y el nivel crítico de agua. El agregado de los desnaturalizantes permitió determinar la importancia de cada tipo de interacción en el mantenimiento de la estructura nativa de las fracciones proteicas predominantes en maní. La urea produjo un marcado efecto sobre la entalpía de desnaturalización, lo que implicaría que los aminoácidos hidrofóbicos cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la estructura de proteínas de maní. El agregado de SDS afectó principalmente a la fracción de conaraquinas. Se pudo determinar que los enlaces disulfuro son un factor esencial en la estabilidad térmica de araquinas y conaraquinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arntfield SD, Murray ED, Ismond MAH. 1990. Influence of salts on the microstructurall and rheological properties of heat-induced protein networks from ovalbumin and vicilin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 1335-1343.

Basha SM, Cherry JP. 1976. Composition, solubility, and gel electrophoretic properties of proteins isolated from florunner (Arachis hypogaea L.) peanut seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 24: 359-365.

Chan ECY, Ma CY. 2002. Thermal analysis of flaxseed (Linum usitatissimum) proteins by differential scanning calorimetry. Food Chemistry 77: 495–502.

Ellepola S W, Ma CY. 2006. Thermal properties of globulin from rice (Oryza sativa) seeds. Food Research International 39: 257–264.

Gimel JC, Brown W. 1996. A light-scattering investigation of the sodium dodecyl sulfate-lysozyme system. Journal of Chemical Physics 104: 8112–8117.

Gorinstein S, Delgado-Licon E, Pawelzik E, Permady HH, Weisz M, Trakhtenberg S. 2001. Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 5595-5601.

Hagerdale B, Martens H. 1976. Influence of water content on the stability of myoglobin to heat treatment. Journal of Food Science 41: 933–937.

Harwalkar VR, Ma CY. 1987. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry. Journal of Food Science 52: 394–398.

InfoStat 2002. InfoStat/Profesional, versión 1.1. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Kinsella JE. 1976. Functional properties of proteins in foods: a survey. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 23: 323–395.

Kinsella JE. 1982. Relationship between structure and functional properties of food proteins. En: Food proteins. P. F. Fox. & J. J. Cowden (Eds,). Applied Science Publisher (London), pp. 51–103.

Laidler KJ, Bunting PS. 1973. The denaturation of proteins. En: The chemical kinetics of enzyme action. Clarendon (Oxford).

Mouecoucou J, Villaume C, Sanchez C, Mejean L. 2004. Effects of gum arabic, lowmethoxy pectin and xylan on in vitro digestibility of peanut protein. Food Research International 37: 777–783.

Ozawa T. 1970. Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. Journal of Thermal Analysis 2: 301-324.

Slade L, Levine H. 2006. Optimization of roasting process and product quality of peanuts. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 83 (1): 163–166.

Stumpe MC, Grubmüller H. 2007. Interaction of urea with amino acids: implications for urea-induced protein denaturation. Journal of the American Chemical Society *129* (51): 16126–16131.

Tang C. 2007. Thermal properties of buckwheat proteins as related to their lipid contents. Food Research International 40: 381–387.

Uruakpa FO, Arntfield SD. 2006. Structural thermostability of commercial canola protein–hydrocolloid mixtures LWT - Food Science and Technology 39: 124–134.

Wang GW, Treleaven D, Cushley RJ. 1996. Conformation of human serum apolipoprotein A-I(166–185) in the presence of sodium dodecyl sulfate or dodecylphosphocholine by 1H-NMR and CD. Evidence for specific peptide-SDS interactions. Biochimica et Biophysica Acta 1301: 174–184.

Yu J, Ahmedna M, Goktepe I. 2007. Peanut proteins concentrate: Production and functional properties as affected by processing. Food Chemistry 103: 121–129.

Precocción del Almidón en productos de kiwicha

Precooking of Starch in kiwicha products

Corregidor, J[2], Hoyos, N [2], Armada, M [1], Jiménez, P

[1]Facultad de Ingeniería, INIQUI, CIUNSa, [2] Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta-
Avenida Bolivia Nº 5150- Salta-CP 4400
armadam@unsa.edu.ar

RESUMEN

La kiwicha (*Amarantus caudatus*), pseudocereal, se investiga como potencial económico y/o fuente alimenticia, debido a su buen valor nutricional y tolerancia a las condiciones áridas de cultivo, estrés térmico y eficiente aprovechamiento del agua. Es importante desarrollar tecnologías apropiadas para procesar kiwicha. Fue objetivo de este trabajo evaluar el grado de gelatinización del almidón en productos precocidos de Kiwicha (hojuelas, extrudidos y harinas precocidas).

Se procesaron granos de kiwicha , procedentes de la localidad de Cachi en la provincia de Salta.

Las harinas precocidas, las hojuelas y los extrudidos se caracterizaron en composición química con técnicas de A.O.A.C. y en grado de precocción del almidón a través de : Amilografía, microscopía con luz polarizada e Índices de absorción de agua (WAI) y de solubilidad en agua (WSI).

La curva amilográfica de la harina cruda de Kiwicha se ubicó entre 350 y 400 UB, mientras que las cocidas presentaron un valor menor a 100 UB. El valor encontrado para la harina de kiwicha estudiada (60 mesh, sin tratamiento térmico previo) fue inferior a valores informados por otro autor (530 UB). Las diferencias entre las muestras comprobó que el tratamiento térmico aplicado para la obtención de harina precocida, produjo la modificación física y molecular del almidón, determinando un pico de viscosidad bajo.

La microscopía bajo luz polarizada, de harinas de Kiwicha sin tratar mostró la presencia de la birrefringencia correspondiente al almidón nativo. En el resto de los productos, se realizó un análisis de 200 campos, sin observar ningún gránulo que presentara birrefringencia, lo que corroboró que todos los tratamientos térmicos realizados (calor húmedo, seco, microondas y extrusión) habrían ocasionado la pregelatinización del almidón nativo presente en las muestras.

Los productos elaborados presentaron un WAI entre 4,58 y 6,77, mayores a los índices encontrados para granos y harinas sin tratamiento: 2,25 y 2,20, respectivamente. De acuerdo a los resultados observados, las muestras con mayor índice de absorción fueron las hojuelas, los extrudidos y las harinas precocidas; lo que demostró que fueron las mezclas con mayor pregelatinización del almidón.

Los productos elaborados presentaron un WSI entre 11,50 y 13,00; valores mayores respecto a la muestra sin tratamiento: 0,20 para granos y 8,14 para harina 60 mesh. Se concluyó que todos los tratamientos térmicos produjeron modificaciones en el almidón, con consecuencias en sus propiedades reológicas, de absorción y de solubilidad.

ABSTRACT

The kiwicha (*Amarantus caudatus*), pseudocereal, is investigated as a potential economic and / or food source, due to its good nutritional value and tolerance to dry growing conditions, heat stress and water use efficiency. It is important to develop appropriate technologies for processing kiwicha. Objective of this study was to assess the degree of gelatinization of starch in precooked Kiwicha products (flakes, extruded and pre-flours cooked).

Processed grains kiwicha from the town of Cachi in the province of Salta. Pre-flours cooked, the flakes are extruded and characterized with chemical techniques of AOAC and degree of starch precooking through: Amilografía, with polarized light microscopy and water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI).

Amylographics curves of the raw flour Kiwicha was located between 350 and 400 UB, while the pre-flours cooked showed a lower value of 100 UB. The value found for the studied kiwicha flour (60 mesh, without prior heat treatment) was lower than values reported by other authors (530 UB). The

differences between the samples found that the heat treatment applied to obtain pre-flours cooked, place the physical and molecular modification of starch, producing a peak of low viscosity.
Under polarized light microscopy, would raw flour of Kiwicha showed the presence of birefringence for the native starch. In other products, an analysis of 200 fields, without observing any present granule birefringence, which confirmed that all the heat treatments carried out (moist heat, dry heat, microwave, and extrusion) would have resulted in the present of native starch pregelatinization in the samples.
The products presented WAI between 4.58 and 6.77, higher than the rates found for grain and flour without treatment: 2.25 and 2.20, respectively. According to the results observed, the samples with the highest uptake were the flakes, the extruded and pre-meal, which proved that the mixtures were more pregelatinisation starch.
The products showed a WSI between 11.50 and 13.00, higher values on the sample without treatment: 0.20 to 8.14 for grain and flour 60 mesh. It was concluded that all treatments produced changes in starch, with an impact on their rheological properties, solubility and absorption.

PALABRAS CLAVE: *kiwicha, almidones modificados, hojuelas, extrudidos.*

KEYWORDS: *kiwicha,modified starches, flakes, extruded.*

INTRODUCCIÓN

El amaranto es una planta autóctona de América, domesticada, cultivada y utilizada desde hace más de 4000 años (Sauer 1976).
Las excavaciones arqueológicas revelan que las semillas y hojas fueron consumidas por habitantes prehistóricos mucho antes del proceso de domesticación, ya que en las regiones tropicales y subtropicales era una planta importante de recolección. Esta especie tuvo relevancia en la época pre-hispánica y actualmente está retomando auge, por su excelente calidad nutritiva y amplia adaptación, incluso en ambientes desfavorables (Hauptli y Jain 1980)
Su cultivo se mantiene en el Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina así como en México y Guatemala, bajo distintos sistemas de producción (Early 1986). Actualmente, el cultivo se encuentra reducido a pequeñas áreas, ello debido históricamente a la resistencia cultural de los nativos hacia las prohibiciones de su cultivo y al desconocimiento del mercado de este valioso grano alimenticio de uso directo en la alimentación humana y animal.
El amaranto es un grano muy versátil para la transformación e industrialización, puede transformarse y utilizarse como cualquier cereal; lógicamente con mayores ventajas nutricionales, aunque por la falta de gluten, en la panificación debe mezclarse a la harina de trigo para enriquecerlo y darle características panificables adecuadas
La transformación primaria del grano de amaranto, es el grano tostado del cual se elabora la alegría (México), turrón (Perú, Bolivia, Ecuador), nigua (Guatemala) y consiste de la mezcla de dicho grano reventado con miel, chocolate y dándole formas de diferentes figuras geométricas o de animales (Casillas 1986)
El proceso de tostado es un tratamiento térmico que se utiliza, no sólo para mejorar las características organolépticas del alimento sino aumentar su digestibilidad entre otras cosas; puesto que cuando el amaranto es sometido a dicho tratamiento, cambian sus cualidades físicas y químicas, siendo este cambio deseable, ya que mediante el calor, la configuración de las proteínas se altera, haciéndolas más digeribles; pero a su vez hay pérdidas considerables de algunos aminoácidos, por lo que se debe tener especial cuidado cuando se somete a algún tratamiento térmico; algunos autores (Jaik y Tena 1986), observaron que el tostado durante 10 segundos a una temperatura de 168°C, no afectó el contenido de proteína y los aminoácidos (lisina y triptófano).
La siguiente etapa de la transformación es la obtención de harina, tanto del grano crudo como tostado o precocido, las cuáles adecuadamente envasadas se utilizan para preparar mazamorras (Perú, Bolivia, Ecuador), atole, pinole (México, Guatemala), budines, sopas, papillas y diferentes potajes. La harina se utiliza también para preparar pasteles, panes tamales, humitas, tortillas, bebidas refrescantes y alcohólicas (Chicha en la zona andina) (FAO 1999)
El almidón de amaranto (nativo o modificado), posee propiedades únicas que lo presentan como una alternativa potencial de la industria de alimentos; ya que en productos enlatados podría actuar como

coloide protectivo para reducir o prevenir la desnaturalización de las proteínas; los almidones nativos presentan menor temperatura de "pasting" y menor pico de viscosidad que lo hace un ingrediente ideal para la mezcla de sopas instantáneas.
Del grano se obtiene hojuelas, laminando el grano mediante rodillos, granola, aglomerando las partículas y luego encapsulándolas (Casillas 1986)
Así mismo se preparan productos instantáneos de amaranto para elaborar cremas instantáneas (Peres *et al.* 1986)
El cultivo del amaranto tanto en el área andina como en la costa de los países de América, tiene enormes posibilidades y perspectivas técnicas de desarrollo, puesto que las características agroclimáticas, edáficas y tecnológicas son adecuadas y propicias para el cultivo, transformación e industrialización; así mismo el uso y consumo de este producto de alto valor proteico traería como consecuencia disminución considerable de los niveles de desnutrición existente en muchos países en desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con granos de kiwicha de la variedad Caudatus, Ecotipo Fuerte Alto, cosecha 2007, procedente del Departamento de Cachi, Provincia de Salta. Se emplearon las instalaciones y el equipamiento del Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Salta.

Obtención de harina de kiwicha

Se obtuvo en el laboratorio, utilizando un molinillo a hélice, el producto de la molienda se colocó en el equipo tamizador Zony Test, hasta obtener una harina 60 mesh (0,25 mm de diámetro de malla, 250 micrones según Normas ASTM).

Elaboración de productos precocidos

Harinas precocidas. En la elaboración de harina precocida se partió de granos previamente tratados por calor húmedo durante 15 minutos con una relación sólido líquido 1:3, se alcanzó una temperatura de 80° C (considerando como temperatura de gelatinización del almidón 60 a 95° C) (Robutti 1995)
Posteriormente, los granos fueron colocados sobre bandejas y secados en estufa con corriente de aire, durante 15, 30 y 60 minutos a una temperatura de 100° C.
En granos secados durante 15 minutos (a) se observó aglomeración de granos y restos de humedad en el recipiente que los contenía.
En granos secados durante 30 minutos (b) se observó una mayor dispersión de granos, menos grupos de aglomeración y cambios de color sobre todo en granos sueltos, los cuales eran más oscuros, que los que aún se mantenían adheridos entre sí.
Los granos secados durante 60 minutos (c) estaban todos separados, sin presencia de humedad visible, con un color uniforme (más oscuro).
Las tres muestras fueron enfriadas y conservadas en recipientes herméticamente cerrados a temperatura ambiente, al cabo de 10 días en las muestras (a) y (b) se evidenció desarrollo de mohos (debido al contenido de humedad presente en las muestras), observándose ausencia de éstos en la muestra (c).
Para el secado en microondas, los granos pretratados, se colocaron en placas de Petri, a potencia media durante 2, 4 y 6 minutos, mezclando la muestra con una varilla de vidrio cada 1 minuto. En la muestra secada durante 6 minutos se observó, a diferencia de las restantes, ausencia de humedad en el recipiente, ausencia de granos adheridos, coloración más oscura y olor característico a tostado.
De acuerdo a las características observadas en granos pretratados y secados en estufa y microondas se seleccionaron los secados durante 60 minutos en estufa (HP1*) y 6 minutos en microondas (HP2*), para la elaboración de las harinas precocidas y su posterior análisis.
Los granos, posteriormente fueron molidos en un molinillo a hélice y tamizados hasta obtener harinas 60 mesh (0,25mm. de diámetro).
Hojuelas. Para la obtención de las mismas se partió de una mezcla de harina de kiwicha (60 mesh) y agua, en proporción 1:0,8, con una humedad final de la pasta de 47%. El hojuelado se realizó sometiendo la pasta obtenida a 150° C entre 2 planchas planas calefaccionadas, durante un tiempo de residencia de 25 segundos.
Se distribuyeron pequeñas porciones de la mezcla sobre la plancha inferior, se aplicó presión con la plancha superior, con el fin de dar forma de hojuelas y precocer la mezcla.

Realizado el hojuelado, el producto fue enfriado y conservado en recipientes de plástico herméticamente cerrados.

Extrudidos. Fueron realizados en el Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA) de la Universidad Nacional del Litoral, de la Provincia de Santa Fe.

El equipo utilizado fue un Extrusor Brabender 10 DN, compuesto con un tornillo de relación de compresión 3/1, con un diámetro de boquilla de 2mm.

La humedad de alimentación de la kiwicha cruda al extrusor fue del 16%. Los parámetros de proceso en el extrusor fueron: 180° C y 175 rpm.

Los productos elaborados, harinas precocidas, hojuelas y extrudidos, fueron evaluados en composición y características de calidad: funcionales y sensoriales.

Composición química

Se determinó sobre las harinas y los productos precocidos, humedad, proteína, Almidón, grasas, cenizas, hierro, calcio y fibras por diferencia, según técnicas oficiales de A.O.A.C. (A.O.A.C. 1996)

Características funcionales

Se realizó sobre las harinas y los productos el Índice de solubilidad en agua (WSI), y el Índice de absorción de agua (WAI), (Anderson et. al. 1969)

Precocción del almidón

Se determinó a través de:

Amilografía. Para esta determinación se utilizó el Amilógrafo Brabender, la misma se realizó en:

- Harina de kiwicha 60 mesh: se empleó 75g de harina (8,4% base húmeda) y 455 ml de agua destilada.
- Harina precocida (HP1*): se empleó 72g de harina (5,6% base húmeda) y 458 ml de agua destilada.

Para ambas muestras (harina de kiwicha y HP1*), la prueba se inició a una temperatura de 19° C, incrementando la misma 1,5° C/ minuto, a una agitación constante. El tiempo en que se llevó a cabo la prueba fue de 50 minutos, llegando a una temperatura final de 95° C.

Microfotografía en Microscopio Óptico. Se utilizó un Microscopio de Polarización Leitz Orthoplan-Pol, con aumento de 400x. Para tomar las fotografías se acopló una cámara digital.

Para obtener las imágenes, se prepararon suspensiones de las distintas muestras al 0,5% con agua destilada. Las suspensiones se colocaron en vasos de precipitado y se agitaron durante 5 minutos, con un agitador de laboratorio (buzo magnético), transcurrido ese tiempo se tomó la muestra con una micropipeta y se colocó sobre un portaobjeto, se esparció con un cubreobjeto y se dejó secar antes de ser analizada.

Análisis de Datos

Los resultados de las evaluaciones en la materia prima y productos obtenidos se expresan en Promedios con sus respectivos Desvíos Estándar y ordenados en cuadros. El análisis estadístico se realizó utilizando el Método de Análisis de Varianza de un solo factor (ANOVA) ((Murray 1991) y la Prueba de Duncan (Duncan 1955)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición Química

Harina. En la **Tabla 1** pueden observarse los valores promedios de composición química proximal de la harina de kiwicha.

La composición química de la variedad en estudio, presentó un elevado contenido de proteínas 15,55g/100g de muestra, el mismo fue un valor intermedio entre el encontrado por otros autores (14,2%) (Rayas-Duarte *et. al.* 1996) y del 17,8% (Sánchez y Maya 1986), para harina de amaranto.

El contenido de hidratos de carbono de la muestra en estudio, fue de 62,5g/100g, contenido menor al publicado por INCAP-ICNND (65,10%) (FAO 1997).

El porcentaje de grasas 7,35g/100g, fue semejante al referido por INCAP-ICNND de 7,2% (INCAP-ICNND 1961); a diferencia de otro autor que obtuvo un mayor valor para este nutriente (11,55%) (FAO 1997).

El contenido de humedad de 8,40g/100g, fue inferior a los de la Tabla de Composición Química del INCAP (INCAP-ICNND 1961) y al manifestado por otro autor (12,3% y 12,26% respectivamente) (FAO 1997), lo cual podría deberse a las condiciones climáticas del cultivo y a las condiciones de almacenamiento.

Tabla 1. Composición química proximal de harina de kiwicha (60 mesh) (g/100g en base húmeda)

Componentes	g/100 g en base húmeda X±DE
Hidratos de Carbono	62,50 ± 0,28
Proteínas	15,55 ± 0,09
Grasas	7,35 ± 0,04
Humedad	8,40 ± 0,05
Cenizas	4,90 ± 0,08
Fibras	9,70**
Densidad calórica (Kcal/ g)	3.77
Calcio (mg/100g)	169,38 ± 2,52
Hierro (mg/100g)	17,40 ± 0,29

*Muestra molida y tamizada (60 mesh)
**Calculado por diferencia
X Promedio
DE Desvío estándar

La cantidad de cenizas fue de 4,9%, superior al citado por INCAP (2,5%) y otro autor (3,07%) (FAO 1997).
El contenido de fibras fue 9,7g/100g, superior al publicado en las tablas del INCAP (6,7%) (FAO 1997).
En referencia a los minerales determinados, tanto el Calcio como el Hierro presentaron valores inferiores a los publicados por otros autores (217 y 303 mg /100g para Calcio y 21 y 104 mg /100g para Hierro) (FAO 1997).
Sin embargo, las diferencias encontradas con respecto a la misma variedad estudiada, guarda una relación promedio con los resultados de otros autores; inclusive se puede observar que los contenidos de minerales en varios autores presentan valores extremos, podríamos inferir que las diferencias encontradas con estudios similares, se deberían a condiciones de ecosistemas de cultivo, condiciones climáticas y de almacenamiento diferentes.
Si bien la kiwicha es un pseudocereal, observamos que la densidad calórica del grano 3,77 kcal/g; para la variedad estudiada fue elevada, similar a la que presentan las leguminosas.
Los valores de Índice de Absorción de agua (WAI) e Índice de Solubilidad en agua (WSI) se presentan en la **Tabla 2.**

Tabla 2. Índice de absorción de agua (WAI) e Índice de solubilidad (WSI) determinados en granos crudos y harina de kiwicha (60 mesh)

Características	Granos X±DE	Harinas X±DE
WAI (g. de gel/g. de mtra seca)	2,25 ± 0,08	2,20 ± 0,06
WSI (g/100g. de mtra seca)	0,20 ± 0,13	8,14 ± 0,13

El valor de WAI fue similar para granos y harina, 2,25 y 2,20. En tanto que el WSI fue mayor para harina, 8,14; esto se podría atribuir a la rotura de la estructura celular del grano, con liberación de componentes solubles, por molienda.

Productos

Determinaciones químicas.

En la **Tabla 3** se presentan los valores promedios de composición química proximal de los productos elaborados.

Tabla 3. Composición química proximal de harina de kiwicha (60 mesh) y de los productos

*Harina de kiwicha 60 mesh (g/100g en base húmeda).

Componentes	Materia Prima* (g/100g) X ± DS	Productos (g/100g)			
		Hojuelas X ± DE	HP1* X ± DE	HP2* X ± DE	Extrudido X ± DE
Carbohidratos	62,50 ± 0,28	62,20 ± 0,1	62,10 ± 0,3	62,20 ± 0,15	62,30 ± 0,560
Proteínas	15,55 ± 0,09	15,39 ± 0,02[a]	15,40 ± 0,04[a]	15,37 ± 0,032[a]	14,03 ± 0,016[b]
Grasas	7,35 ± 0,04	7,08 ± 0,008	7,10 ± 0,05	7,15 ± 0,005	7,00 ± 0,008
Humedad	8,40 ± 0,05	2.66 ± 0,1[c]	5,60 ± 0,16[b]	6,20 ± 0,08[a]	1,54 ± 0,4[d]
Cenizas	4,90 ± 0,08	4,7 ± 0,16[bc]	4,65 ± 0,02[c]	4,65 ± 0,02[c]	5,3 ± 0,16[a]
Fibras	9,7**	10,63**	10,75**	10,63**	11,37**
Calcio[1]	169,38 ± 2,52	167,00± 0,016[a]	64,20 ± 3,84[bc]	64,20 ± 3,84[c]	167,00 ± 0,016[a]
Hierro[2]	17,40 ± 0,29	17,01 ± 0,008	16,54 ± 3,46	16,54 ± 3,46	17,03 ± 0,024

HP1*: secado en estufa con corriente de aire (60 minutos a 100° C).
Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras.
HP2*: secado en microondas (4 minutos a potencia media).
** Calculado por diferencia.
[1,2] mg/100 g de muestra

El contenido de Hidratos de Carbono fue similar para todos los productos obtenidos. También fueron semejantes a los encontrados en la materia prima, lo cual podría deberse, a que las condiciones de procesamiento permitirían reducir la pérdida de nutrientes.

Al analizar los distintos productos elaborados, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, según el análisis de varianza.

El contenido de Proteínas fue semejante al de la materia prima con valores que van de 14,03g/100g en extrudidos hasta 15,39g/100g en hojuelas, lo que demostraría que en la molienda y posterior tamizado de los granos se eliminaría material rico en celulosa, conservando valores de proteínas presentes.

El análisis de varianza demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los productos. Al aplicar la Prueba de Duncan no se encontraron diferencias entre hojuelas, HP1* y HP2*; pero sí entre éstas y extrudidos.

El porcentaje de grasas que presentaron los productos, al igual que para los otros nutrientes fueron similares al de la materia prima, valores elevados, sobre todo si los comparamos con el contenido lipídico que presentan otros cereales (harina de maíz 4g/100g; harina de trigo 1,8g/100g; cebada 1,5g/100g).

Al aplicar el análisis de varianza no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre las distintas muestras.

Los valores de humedad fueron mayores en HP2* y HP1* y menores en hojuelas y extrudidos. Esto se debería a los tratamientos de precocción utilizados, considerando que para la obtención de harina se aplicó calor húmedo ocasionando un mayor contenido de humedad en el producto final.

Según el análisis de varianza ($P \leq 0,05$) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Al aplicar la Prueba de Duncan también se encontraron diferencias estadísticas entre los cuatro productos

Los valores de ceniza fueron semejantes para hojuelas, HP1* y HP2*, similares a los de la materia prima, siendo mayores para los extrudidos, pudiéndose deber ésta diferencia al tratamiento previo, de los granos, a la extrusión, los cuales fueron ligeramente molidos sin tamizar (se realizo sobre grano entero y no con harinas).

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre hojuelas, HP1*, HP2* y extrudidos ($P \leq 0,05$). Al aplicar la Prueba de Duncan no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hojuelas, HP1* y HP2*, pero si entre éstas y extrudidos.

En cuanto al contenido mineral se observó mayor concentración de calcio en hojuelas y extrudidos cuyos valores fueron de 167 mg/100 g, similares a los encontrados en la materia prima. En el caso de HP1* y HP2* presentaron valores más bajos en relación a los demás productos y a la materia prima, siendo éste de 64,2mg/100 g. Esto podría deberse al tratamiento térmico aplicado, ya que para la elaboración de harina precocida se empleó calor húmedo, lo que ocasionaría mayores pérdidas de minerales, por un aumento de solubilización de los mismos.
El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre los productos ($P \leq 0,05$). Según la Prueba de Duncan no hubo diferencias significativas entre hojuelas y extrudidos, pero sí entre éstos y HP1* y HP2*.
El contenido de hierro se encontró entre 16,54 y 17,03 mg/100 g para los productos elaborados, siendo éstos similares a los encontrados en la materia prima.
Estadísticamente no existieron diferencias significativas entre los productos según el análisis de varianza.

Determinaciones Físicas y Funcionales

Índice de Absorción y de solubilidad en agua (WAI y WSI) en productos. Estos análisis nos permitieron determinar el grado de cocción de los productos.Los valores se presentan en la **Tabla 4** y en la **Figura 1**.

Tabla 4. WAI y WSI determinados en productos elaborados con kiwicha

Índices	Productos X ± DE			
	Hojuelas	**HP1***	**HP2***	**Extrudidos**
WAI	6,77 ± 0,08[a]	4,58 ± 0,01[b]	5,86 ± 0,01[ab]	6,25 ±0,67[a]
WSI	12,00 ± 1,00	12,00 ± 1,00	11,50 ± 0,50	13,00 ±2,00

HP1*: secado en estufa con corriente de aire (60 minutos a 100° C).
HP2*: secado en microondas (6 minutos a potencia media).
Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras.

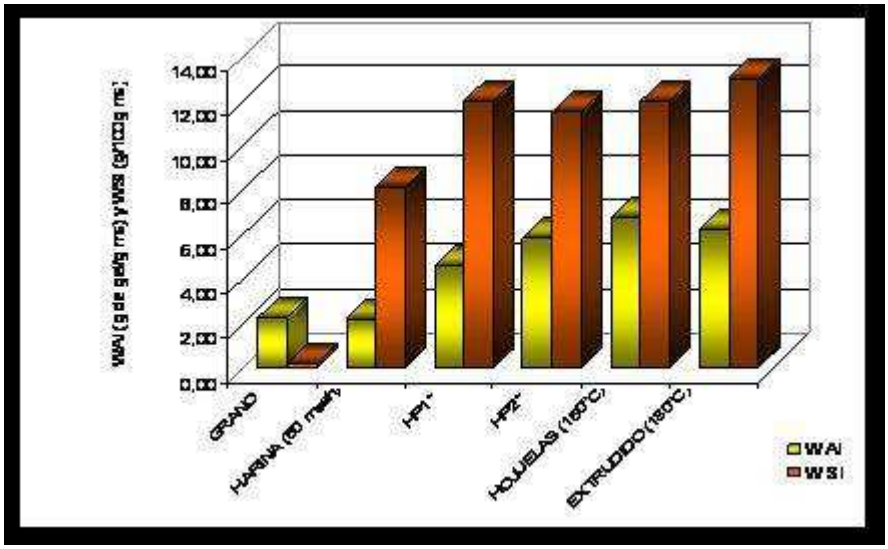


Figura 1. Efecto del tratamiento térmico aplicado sobre WAI y WSI de las diferentes muestras.

El WAI es una medida de la capacidad de absorción de agua de los componentes de la muestra, especialmente almidones y proteínas. Por el procesamiento el almidón modifica su capacidad de absorción sobre todo por gelatinización del mismo (Jiménez y Herrera 2003). Los productos elaborados presentaron un WAI entre 4,58 y 6,77, mayores a los índices encontrados para granos y

harina sin tratamiento, 2,25 y 2,20 respectivamente**.** Las variaciones observadas en la capacidad de absorción de agua, se deberían, a los cambios físicos y moleculares sufridos por los gránulos de almidón, al ser modificados, por gelatinización y dextrinización en los casos de tratamiento térmico con disponibilidad reducida de agua.

De acuerdo a los resultados observados, las muestras con mayor índice de absorción fueron las hojuelas, los extrudidos y HP2*, lo que indicaría que fueron las muestras con mayor pregelatinización del almidón

De acuerdo al análisis de varianza para los valores de WAI se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre hojuelas, HP1*, HP2* y extrudidos. Aplicando la Prueba de Duncan no se encontraron diferencias significativas entre hojuelas, extrudidos y HP2*, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre HP1* con hojuelas y extrudidos.

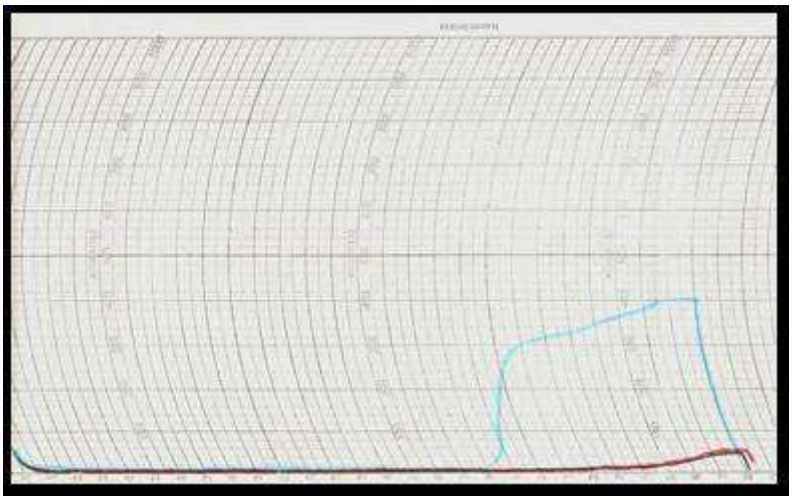
El WSI está relacionado con la cantidad de sólidos solubles presentes en una muestra seca. Permite verificar el grado de severidad del tratamiento en función de la degradación, gelificación, dextrinización y consecuente solubilización del almidón (Jiménez, et. al 2003). Los productos elaborados presentaron un WSI entre 11,5 y 13, valores mayores respecto a la muestra sin tratamiento, 0,20 para granos y 8,143 para harina 60 mesh **.** El mayor valor de éste índice, lo presentó el extrudido, esto podría deberse a las condiciones de procesamiento empleadas, particularmente a la temperatura, lo que incrementaría la solubilidad de los componentes de la muestra, principalmente del almidón.

En función de los valores obtenidos, se pudo observar que es menor la solubilidad en la materia prima, mejorando dicha propiedad funcional por la aplicación de los diferentes tratamientos térmicos lo que se reflejaría en el aumento de WSI en los productos elaborados.

Considerando el análisis de varianza para WSI no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las hojuelas, HP1*, HP2* y extrudidos.

Precocción del almidón

Amilografía. Permite evaluar el comportamiento de flujo de las muestras suspendidas en agua cuando gelatiniza el almidón presente en ellas.



A: Harina de kiwicha cruda (60 mesh).
B: HP1* 60 mesh (aplicación de calor húmedo, a una temperatura de 80° C y secado en estufa con corriente de aire a 100° C, durante 60 minutos).
C: HP2* 60 mesh (aplicación de calor húmedo, a una temperatura de 80° C y secado en microondas a potencia media, durante 6 minutos).

Figura 2. Amilogramas de harinas de kiwicha cruda, HP1* y HP2* (60 mesh).

El Amilógrafo es un instrumento que registra en forma gráfica (amilograma), las variaciones de la viscosidad de una suspensión agua-harina, a medida que se aumenta uniformemente la temperatura. La viscosidad medida en Unidades Brabender (UB), permite determinar el punto de gelatinización y las propiedades de la pasta bajo enfriamiento.

Los amilogramas, son característicos y diferentes para cada tipo de almidón. Y para el mismo almidón con diferente grado de modificación por procesamiento.
El comportamiento de flujo de la harina de kiwicha 60 mesh y HP1*, en función del tiempo y temperatura se observan en el **Figura 2**.
La curva amilográfica de la harina de kiwicha se ubicó entre 350 y 400 U.B. mientras que HP1* presentó un valor menor a 100 U.B. El valor encontrado para harina de kiwicha de la variedad estudiada (60 mesh, sin tratamiento térmico previo) fue inferior a valores informados por otro autor (530 U.B.) (Bucaro Segura 2002)
Las diferencias entre las dos muestras comprobó que el tratamiento térmico aplicado para la obtención de harina precocida, produjo la modificación física y molecular del almidón, determinando un pico de viscosidad bajo.
En función de las U.B obtenidas para HP1*, menor a 100, podría decirse que se trataría de una harina de uso limitado, generalmente de uso en la Industria Cervecera, no apta para panificación, requiriendo ser mezclada con otras harinas.

Microscopía con luz polarizada

El objetivo de la observación de las distintas muestras por microscopia con luz polarizada, fue el de determinar si en los distintos productos elaborados existió o no, una modificación del almidón nativo presente, por efecto de los procesos térmicos aplicados.
Bajo luz polarizada el almidón nativo presenta birrefringencia, que se identifica con la aparición de la cruz de malta, por la existencia de partes del gránulo de almidón con estructura cristalina. La perdida de birrefringencia bajo luz polarizada es producida por modificación de la estructura del almidón que se torna amorfa, como consecuencia de procesamientos sufridos.
En la **Figura 3**, se observan las distintas muestras analizadas, en la microfotografía a, que corresponde a harina de kiwicha sin tratar se observó la presencia de la birrefringencia típica correspondiente al almidón nativo.

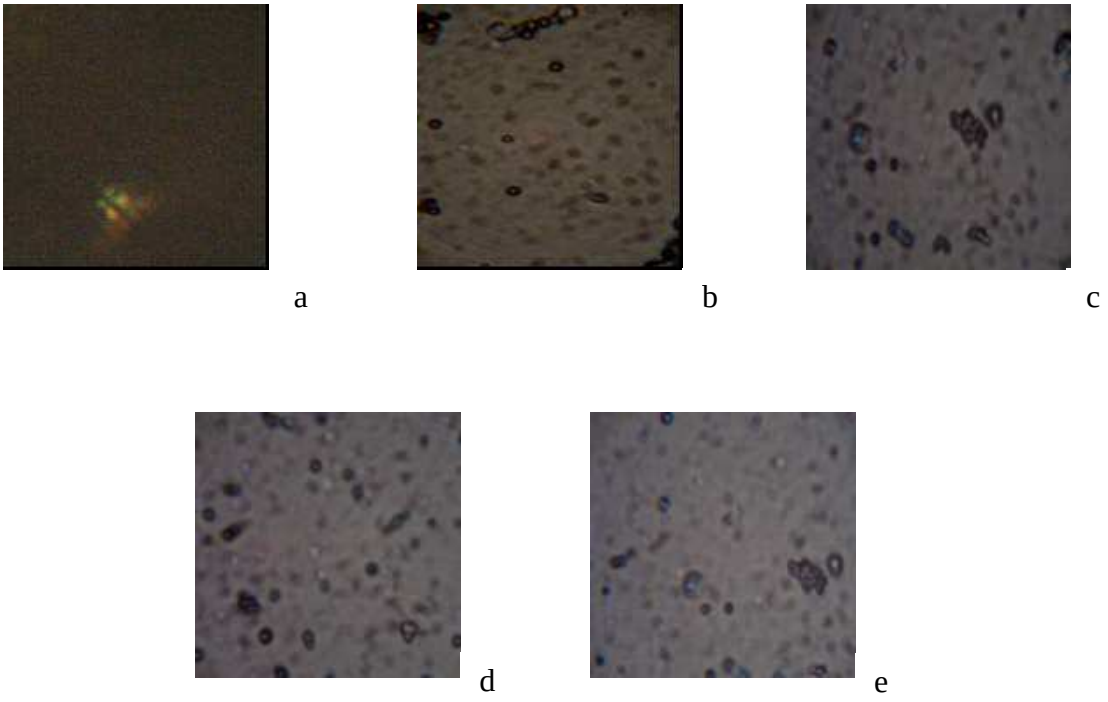


Figura 3. Microscopía de luz polarizada en: a) Harina de kiwicha, b) HP1*, c) HP2*, d) Hojuelas y e) Extrudidos.

En el resto de los productos, se realizó un análisis de 200 campos, sin observar ningún gránulo que presentara birrefringencia, lo que corroboró que todos los tratamientos térmicos realizados (calor húmedo, seco, microondas y extrusión) habrían ocasionado la pregelatinización del almidón nativo presente en las muestras.

CONCLUSIONES

La variedad de kiwicha estudiada presentó un buen valor nutritivo, el cual estaría dado por su contenido de proteínas, grasas, hidratos de carbono y minerales presentes.

Los resultados de este estudio, predicen que es factible la elaboración de alimentos precocidos de kiwicha, aplicando tratamientos térmicos que no afectan su composición y que amplían la posibilidad de incluirlos en distintas preparaciones, solos o complementando distintas mezclas.

La microscopía de los productos elaborados, revela que los tratamientos térmicos aplicados (calor húmedo, seco, microondas y extrusión) pregelatinizaron el almidón presente en las muestras, lo que aumentaría la digestibilidad de los mismos.

Se observó un incremento en WAI y WSI, lo que indicó que el almidón presente en los productos elaborados sufrió pregelatinización, sobre todo en hojuelas y extrudidos.

Según actividad de agua los productos elaborados presentaron buena estabilidad al almacenamiento a temperatura ambiente, lo que disminuiría costos durante el almacenamiento.

Los distintos productos de kiwicha tuvieron buena aceptabilidad, la cual aumentaría si se saborizan los mismos en otras instancias tecnológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson RA, Conway HF, Pfeiffer UF, Griffin EL.1969.Gelatinization of corn grits by roll and extrusion-cooking. Cereal Science Today,14: 1-4.

Anderson RA, Conway HF, Pfeiffer UF, Griffin EL.1969.Roll and extrusion-cooking of grain sorghum grits. Cereal Science Today, 14: 372-375.

Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 1996.16 th ed. The Association, Washington, D.C.

Casillas G.F. 1986. Obtención de nuevos productos a partir de la semilla de la alegría.. *En*: Primer Seminario Nacional del Amaranto.Chapingo,México. pág. 300-306.

Cervantes M.J. 1986. El amaranto como alimento para animales. *En*: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. pág. 354-360.

Domingo VMV. 1986. Utilización de la harina de amaranto, en la elaboración de pan tipo caja. *En*: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. Pág. 406-419.

Duncan D B. 1955.Multliple Range And Multiple F. Test. Biometrics 11.pp. 1-42.

Early K.D. 1986. Cultivo y usos del Amaranthus (kiwicha) en dos centros de domesticación: México y Perú. *En*: V Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos. Puno. PISA, IID-CANADA. Puno, Perú. pág. 0- 14.

FAO. OFICINA REGIONAL DE LA FAO PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE 1997. Ángel Mujica Sánchez A, Berti Díaz M. El Cultivo Del Amaranto (*Amaranthus* spp.): producción, mejoramiento genético y utilización. Chile Coordinación Técnica y Edición Juan Izquierdo.

Hauptli H, Jain, K. 1980. Genetic polymorphisms and yield components in a population of amaranth. The Journal of Heredity, 71: 290-292.

Jaik AD, Tena FJ. 1986. Optimización del proceso de tostado de la semilla de alegría *(Amaranthus hipochondriacus)* y diseño de un prototipo de tostadora. *En*: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México.pág. 397-405

Jiménez MJ, Herrera De Zelarayán SA. 2003. Fundamentos Para El Manejo De Alimentos. Salta, Argentina. Ediciones Crisol. Pag. 256.

Leung Wu WT, Flores M. INCAP-ICNND. 1961. Food Composition Table for Use in Latin America. INCAP, Guatemala and NIH, Bethesda, MD, USA. (English or Spanish). pág. 145

Murray R. 1991.Estadistica. 2° ed. Chile: Industrias Gráficas S.A. 1991. pág. 534

Peres JL, Sánchez A, Kuri J, Zavala L. 1986. Producto instantáneo para elaboración de cremas alimenticias. *En*: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México.pág. 321-328

Rayas-Duarte P, Mock CM, Satterlee LD. 1996. Quality of spaghetti containing buckwheat, amaranth and lupin flours. Cereal Chemistry 73 (3): 381-387.

Robutti JL. 1995. Maize Kernel Hardness Estimation In Breeding By Near-Infrared Transmission Analysis. Cereal Chemistry. pág. 632-636.

Sánchez MA, Maya S.1986. Enriquecimiento del maíz con harina de amaranto en la elaboración de tortilla. *En*: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, México. pág. 421-435.

Sauer JD. 1976. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. Annals of Missouri Botanical Garden, 54:103-137.

Efecto de harina de yuca sobre las propiedades reológicas de panquecas

Effect of cassava flour on rheological properties of panquecas

Cueto D [(1)], Pérez E [(1)], Borneo R [(2,)] Ribotta PD [(2, 3)]

[(1)] ICTA. Universidad Central de Venezuela
[(2)] CEPROCOR - Centro de Excelencia de Productos y Procesos de Córdoba
[(3)] CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
pribotta@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

La enfermedad más común provocada por la ingesta de cereales es conocida como celiaquía, que se presenta en individuos genéticamente susceptibles cuando consumen alimentos que contienen proteínas provenientes del trigo y otros cereales. Eliminando el consumo de alimentos que contienen estos cereales se produce una recuperación clínica e histológica. Sin embargo, la disponibilidad de productos para esta población es exigua y onerosa. La panqueca elaborada con trigo es uno de los alimentos que se consume con frecuencia en el desayuno de países como México, Venezuela, Estados Unidos, etc. gracias a su facilidad de preparación. Ésta puede acompañarse con otros tipos de alimentos (tanto de origen vegetal como de origen animal) para variar su sabor e incrementar su valor nutricional. La harina de yuca o mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), puede ser utilizada como sustituyente del trigo en la elaboración de alimentos aptos para celíacos ya que no posee proteínas del gluten, causantes de esta enfermedad, y tiene potencial para elaborar panquecas. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la sustitución de la harina de trigo por harina de yuca en un 30 y 100% sobre la calidad de las panquecas, evaluándose: parámetros térmicos de las mezclas, color, textura y resistencia a la extensión del producto terminado. Las propiedades térmicas de las mezclas sin cocinar y a 24 horas de almacenamiento fueron estudiadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se midió el color de la corteza en la zona oscura y clara. Se realizó análisis de perfil de textura (TPA) de muestras tomadas de la parte central de las panquecas. La resistencia a la extensión extensión se realizó estirando la panqueca a velocidad constante hasta ruptura. El almidón de yuca mostró una estructura granular más estable, mayor estructura cristalina y mayor heterogeneidad de cristales que el de trigo. El proceso de gelatinización sólo fue levemente afectado por la mezcla de harinas en comparación con el proceso de gelatinización de las harinas por separado. Los resultados señalan que la luminosidad (L*) disminuyó a medida que se incrementó la proporción de yuca. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros a* y b* en la zona clara, pero se observó una tendencia a la tonalidad roja y amarilla, la cual se acrecienta en la zona oscura. El TPA no mostró diferencias significativas entre las panquecas con 100% trigo y 100% yuca, mientras que ambas presentaron mayor firmeza, gomosidad y masticabilidad que las panquecas con 30% de yuca. La panqueca 100% yuca fue más extensible y requirió mayor fuerza para estirarse que las restantes. Con estos resultados se refuerza la factibilidad de sustitución parcial o total de la harina de trigo por harina de yuca en panquecas, especialmente en países de clima tropical, no productores de trigo y considerar además el empleo de la formulación 100% yuca como una alternativa en la dieta de los celíacos.

ABSTRACT

Celiac disease is the most common disease brought about by cereal ingestion. It appears genetically susceptible individuals when they consume foods that contain gluten proteins. Eliminating the gluten-containg foods consumption produces a clinical and histological recovery. Nevertheless, the availability of gluten-free food products for celiac patients is insufficient and onerous. Wheat`s panquecas is one of the meals consumed frequently in breakfast of countries like Mexico, Venezuela, the United States, etc. due its easiness in preparation panquecas can be accompanied with other types of foods (either of vegetal origin or animal origin) to vary its flavor and to increase its nutritional value. Cassava (*Manihot esculenta* C.) flour can be used in the production of food products suitable for celiac patients, since it does not contain gluten proteins. The goal of this work was to study the

effects of substitution of wheat flour by cassava flour (at levels of 30 and 100%) on the quality of panquecas. Thermal parameters of the mixtures, color, texture and resistance to the extension of the finished product were evaluated. The thermal properties of mixes without cooking at 0 and 24 hours of storage were studied by differential scanning calorimetry (DSC). The color of the crust in dark and clear zone of panquecas was measured. Texture profile analysis (TPA) of samples taken from the central part of panquecas was made. The resistance to the extension was evaluated stretching a panqueca sample at constant speed until rupture. Cassava starch had a more stable granular structure, a higher crystalline structure and crystal heterogeneity than wheat starch. The luminosity (L*) value fell as the ratio of cassava was increased. There were not significant differences in the parameters a* and b* in the clear zone, but a tendency was observed on yellow-red tonality and, which is increased in the dark zone. TPA did not show significant differences between panquecas with 100% wheat and 100% cassava, whereas both presented major firmness, gumminess and chewiness that panquecas with 30% of cassava. Panqueca made of 100% cassava was more tensile and required greater force to stretch that the rest. The results of this study reinforce the idea that cassava flour could be used to substitute wheat in panqueca formulations, especially in tropical climates were wheat may be limited. Also, having a 100% cassava panqueca mix would be an excellent choice for celiac patients.

PALABRAS CLAVE: *harina de yuca, panquecas, propiedades reológicas*.

KEYWORDS: *cassava flour, panquecas, rheological properties*.

INTRODUCCIÓN

Las panquecas normalmente son preparadas con harina de trigo, azúcar, un agente leudante, un ácido reactivo y agua (Nakamura y Seguchi 2007); las cuales pueden elaborarse en el hogar o industrialmente y además se comercializan como mezclas listas de rápida y fácil preparación. Sin embargo, no todo el mundo puede consumir trigo o productos elaborados a partir de este cereal en su dieta. En este sentido, los enfermos celíacos deben excluir de por vida el trigo y otros cereales que contienen gluten ya que su consumo en personas con esta intolerancia produce una atrofia de las vellosidades intestinales impidiendo la correcta absorción de los nutrientes (Bisset 2001, Ali *et al.* 2006, Da Silva 2006). La omisión del gluten en la dieta es muy difícil, debido a que muchos alimentos contienen gluten (Sánchez *et al.* 2002).

La harina y el almidón de yuca están siendo utilizados como sustitutos del trigo, cebada, centeno y avena en productos para celíacos en países desarrollados. Sin embargo, en países ubicados en las zonas del trópico, donde es un cultivo de gran importancia, no se han hecho suficientes estudios ni desarrollo de productos con estos fines. Estos nuevos productos pueden ser diferentes en textura y sabor a los productos usualmente elaborados con trigo, por lo que deben reformularse para que puedan ofrecer productos con características tecnológicas y sensoriales aceptables. Debido a que el gluten es la principal proteína de la harina formadora de estructura y responsable de las propiedades reológicas en la masa, tales como; elasticidad, extensibilidad, resistencia al estiramiento y tolerancia al mezclado. El reemplazo del gluten del trigo total o parcial resulta en un desafío importante, principalmente desde el punto de vista estructural. Para mejorar la textura en productos libres de gluten se han incorporado proteínas provenientes del huevo y/o de lácteos como ingredientes altamente funcionales (formadores de estructura, emulsificantes, espumantes, etc.), por su alta calidad alimenticia al aumentar el contenido de aminoácidos esenciales y por sus características sensoriales, siendo adecuados en muchos tipos de productos (Ibanoglu y Erc- elebi 2007, Lorenzo *et al.* 2008).

La textura relacionada principalmente con la suavidad, el color y el aspecto visual, son importantes atributos para la aceptación de los alimentos, siendo por tanto la evaluación de tales características, una forma de garantizar la satisfacción del consumidor en cuanto a sus expectativas sensoriales, en especial en la preparación de panes, tortas y panquecas (Von Atzingen 2005).

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la sustitución de harina de trigo por harina de yuca en un 30 y 100% sobre la calidad de las panquecas, evaluándose: parámetros térmicos de las mezclas, color, textura y resistencia a la extensión del producto terminado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ingredientes

La harina de yuca fue elaborada a nivel de laboratorio a partir de la parte comestible de muestras de raíces comerciales, siguiendo el método descrito por Pérez *et al.* (2007). La harina de trigo, el azúcar, la leche en polvo completa, la sal, el crémor tártaro y el bicarbonato de sodio, fueron adquiridos en el mercado local y usados sin tratamiento adicional. Agua potable, margarina y huevos frescos, fueron usados en la preparación de las panquecas.

Elaboración de las panquecas

La formulación base utilizada para la preparación de la mezcla lista para panquecas se muestra en la **Tabla 1**. Se prepararon panquecas a partir de mezclas listas de 30 y 100% de harina de yuca y una mezcla control 100% de harina de trigo. Se cernió 153 g de mezcla y se le incorporó 100 ml de agua, 8 g de margarina y 1 huevo y se batió por 2 min en una batidora planetaria (Arno, Brasil). Luego, el batido se vertió en un sartén caliente y se cocinó a fuego bajo por 2 min cada lado.

Tabla 1. Fórmula base para la preparación de las mezclas listas para panquecas.

Ingredientes	Cantidad (%)
Harina	65
Azúcar	26
Leche en polvo entera	6
Bicarbonato de sodio	0,2
Crémor tártaro	0,5
Sal	1,3

Propiedades térmicas

Se utilizó un calorímetro DSC823e (Mettler Toledo, Suiza), se calibró el equipo con indio y zinc. Se tomaron alícuotas (~36 mg) de los batidos y (~73 mg) de las panquecas y se colocaron en cápsulas de aluminio. Las cápsulas fueron herméticamente selladas para evitar la deshidratación de la muestra y el análisis se realizó a una tasa de calentamiento de 10 *ºC*/min desde 30 hasta 120 *ºC*. Además se estudió el perfil térmico de la harina de yuca en función del contenido de agua: harina de yuca con 28, 35, 45, 60 y 75% de humedad. A partir de los termogramas se determinó: temperatura de inicio (T□), temperatura pico (Tp), rango de temperatura (ΔT), así como el calor (ΔH en joule por g de materia seca) involucrado en la gelatinización del almidón en los batidos y la retrogradación de la amilopectina en las panquecas.

Color

El color en la superficie de las panquecas se determinó con el colorímetro Minolta 508d (Japón), utilizando el iluminante D65, y un ángulo de observador 10º, a partir de los valores obtenidos de la escala CIEL*a*b*. Se midió el color en la corteza en la zona oscura y clara. Se tomaron 3 lecturas por zona, en distintas panquecas y se informa el valor promedio. Se obtuvieron los parámetros L*, a* y b*.

Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Se usó un analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido) para determinar las características de textura de panquecas, utilizando el método estándar de la **AACC 74-09 (2003)**. Se tomaron cilindros de la parte central, cortados con un dedal de 2,5 cm de diámetro, y se sometieron a doble ciclo de compresión hasta alcanzar el 60% de deformación. Los parámetros del análisis de textura se determinaron con el programa provisto con el texturómetro (Texture Expert 1.22, Stable Microsystems). Se registró el pico de firmeza, cohesividad, gomosidad, elasticidad y masticabilidad. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Resistencia a la extensión

Se usó un analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido) para determinar la resistencia a la extensión de las panquecas. Este ensayo se realizó estirando la panqueca a velocidad constante hasta ruptura. Se usó una sonda de bola y se ubicó la panqueca en la plataforma por medio de abrazaderas, asegurando que la misma cubriera el agujero de la plataforma. El cabezal esférico se desplazó a 50 mm/s hasta la ruptura de la panqueca. A partir de las curvas de fuerza versus distancia,

se obtuvo el pico de fuerza, la distancia de ruptura y el área bajo la curva. Todas las mediciones se realizaron al menos por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico Statgraphics plus versión 5.1 a un nivel de confianza del 95%. Se usó un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, utilizando el método de menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades térmicas

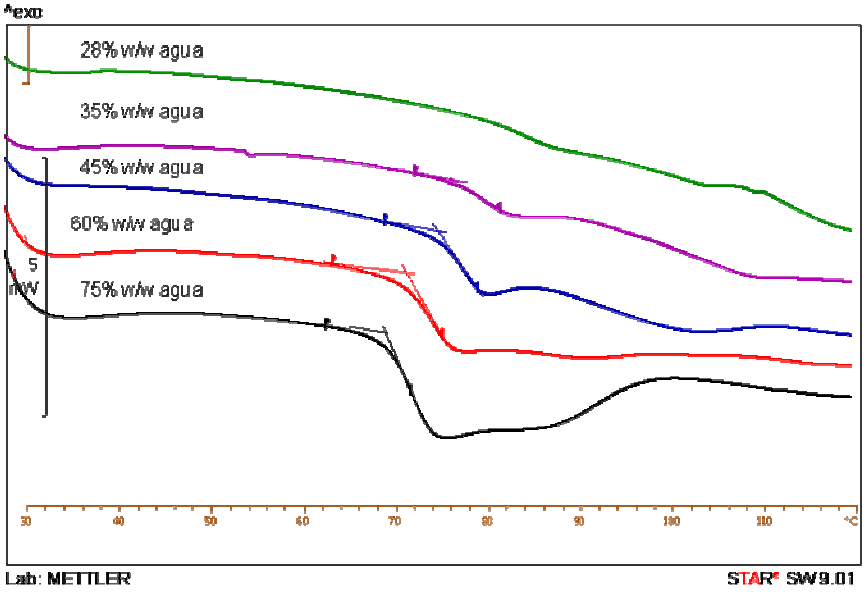


Figura 1. Análisis térmicos en harina de yuca.

La **figura 1** muestra los termogramas encontrados cuando la harina de yuca, con diferentes contenidos de agua (desde 28 hasta 75%) fue sometida a análisis térmico en el DSC. A partir de una humedad de 35% se observó un pico endotérmico relacionado con la gelatinización del almidón alrededor de los 80 *ºC* y un segundo pico muy pequeño cercano a los 110 *ºC*, posiblemente debido a la fusión de cristales de almidón. A medida que aumenta la cantidad de agua se observó un incremento de la energía involucrada en la gelatinización del almidón y una disminución de la temperatura de inicio del pico en esta transición. Esto sugiere que solo parte de los cristales del almidón funden a bajas cantidades de agua mientras que los restantes dan origen a una segunda endoterma a mayor temperatura, la cual se comporta de acuerdo a la teoría de Flory para las interacciones entre polímeros y diluyentes. Esta analogía de los polímeros sintéticos propone que la gelatinización del almidón es un proceso de fusión facilitado por un solvente el cual obedece a la ecuación de Flory-Huggins (**Biliaderis 1992, Sandoval y Rodríguez 2005**). A medida que se incrementa el agua disponible para la gelatinización, ocurre un aumento de la energía involucrada en el proceso de gelatinización y ambos picos se acercan hasta solaparse, como puede observarse en las endotermas obtenidas con una humedad igual o mayor al 60%. El incremento del agua disponible facilita la hidratación, hinchamiento y fusión de los cristales del almidón presente en la harina de yuca (**Tabla 2**). Con estos resultados se pueden establecer patrones de referencia en cuanto al comportamiento de la harina de yuca en presencia de diferentes niveles de humedad, y permiten comparar los picos obtenidos en las panquecas con el pico obtenido en la harina de yuca a un 45% de humedad, valor más próximo al porcentaje de humedad obtenido de los batidos en las panquecas.

Tabla 2. Análisis térmico del batido de las panquecas y harina de yuca.

Muestra	Temperatura de inicio (ºC)	Temperatura de Pico (ºC)	Temperatura de finalización (ºC)	Rango de gelatinización (ºC)	ΔH (J/g BS)
BP 30Y	73,28	79,46	92,08	18,8	-4,19
BP 100Y	80,34	85,20	94,94	14,6	-6,92
BP 100T	75,10	79,58	84,94	9,8	-1,06
HY (28%)	83,19	90,32	100,88	17,7	-0,29
HY (35%)	82,13	86,46	92,37	10,2	-0.59
HY (45%)	79,93	83,61	88,87	8,9	-1,12
HY (60%)	75,84	81,27	94,60	18,7	-3,34
HY (75%)	73,87	79,23	100,58	26,7	-9,64

BP = batido panqueca; HY = harina de yuca. Los resultados son promedios de al menos 2 determinaciones.

Los termogramas de los batidos de harina de trigo y de yuca (**Figura 2**), mostraron un pico correspondiente a la gelatinización del almidón. La harina de trigo gelatinizó a temperatura más baja y tuvo menor absorción de energía y menor rango de temperatura durante este proceso que la harina de yuca (**Tabla 2**), mostrando estructura granular más estable, mayor estructura cristalina y mayor heterogeneidad de cristales que en el almidón de yuca. Por otro lado el batido con mezcla de trigo y yuca (P30Y) mostró dos picos solapados correspondientes a la gelatinización del almidón presente en ambas harinas. Esta mezcla presentó menor temperatura de inicio y mayor rango de temperatura de gelatinización comparada con los valores obtenidos para las harinas por separado (P100T y P100Y), mientras que la energía involucrada en el proceso de gelatinización tuvo un valor intermedio. Esto permite concluir que el efecto de la mezcla de gránulos de almidón afectó sólo levemente el proceso de gelatinización comparado con el de las harinas por separado.

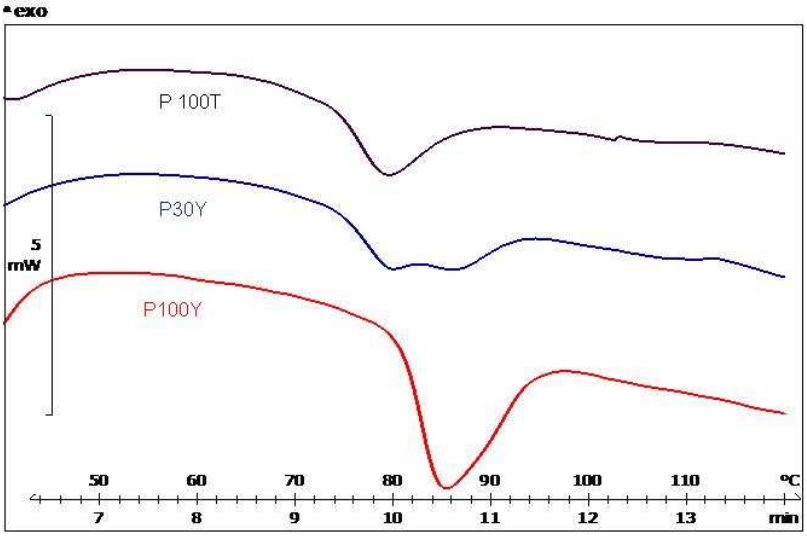


Figura 2. Análisis térmicos en los batidos de las panquecas.

A 24 horas de elaboradas las panquecas se realizaron nuevos ensayos en el calorímetro para determinar la presencia de amilopectina retrogradada. Ninguna de las muestras mostró cambios en la señal del calorímetro en el rango estudiado, por lo que podemos afirmar que luego de 24 h de almacenamiento no se detectó retrogradación de amilopectina en las panquecas.

Color

El color en los productos es un atributo sumamente complejo que depende fundamentalmente de factores como: tipo de harina, cantidad de pigmentos amarillos presentes, granulometría y presencia de

impurezas y es característico de cada producto, por lo que cualquier cambio incidiría en la aceptabilidad del producto. En la **Tabla 3** se presentan los resultados de la determinación del color en las panquecas. En la corteza se distinguen dos zonas con diferentes tonalidades, una clara y otra oscura. La luminosidad (L*) disminuyó a medida que se incrementó la proporción de yuca. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros a* y b* en la zona clara, aunque se observó un incremento en la tonalidad roja en la zona oscura con la adición de yuca.

Tabla 3. Color en las panquecas.

Panquecas	**Corteza zona oscura**			**Corteza zona clara**		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
P30Y	51,07 a	16,69 a	33,55 a	70,85 a	2,05a	23,15 a
P100Y	48,12 a	15,77 a	29,07 b	66,09 b	2,05a	22,09 a
P 100T	60,54 b	11,54 b	34,03 a	68,53 ab	1,97 a	22,00 a

Valores con letras iguales en la misma columna, no son diferentes significativamente (p <0,05)
Los resultados son promedios de 3 determinaciones

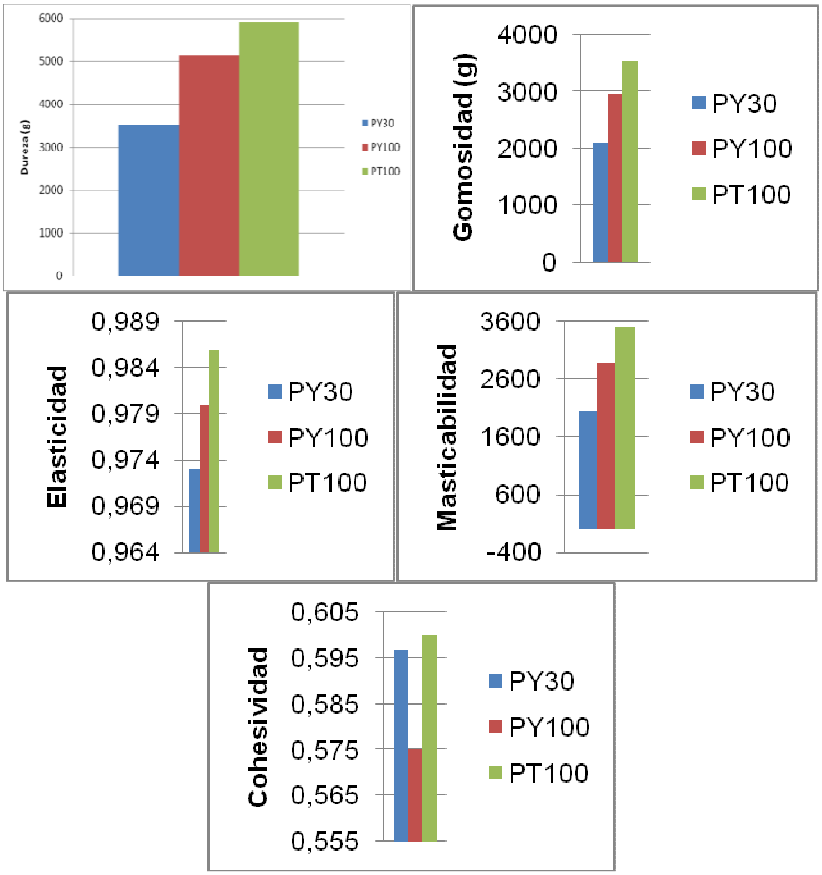


Figura 3. Análisis del Perfil de textura en panquecas.

Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Las características de textura son importantes en la calidad de los productos debido a su directa relación con la aceptación por parte del consumidor. Los resultados del TPA se presentan en la **Figura 3**. Las panquecas elaboradas con 100% harina de trigo fueron las que presentaron mayor firmeza, gomosidad, elasticidad y masticabilidad, por el contrario, las mezclas de harina de trigo y yuca (PY30) presentaron los valores más bajos, y sólo una leve diferencia fue encontrada entre las panquecas con 100% trigo y 100% yuca. Es importante resaltar el efecto sinérgico de la mezcla de harinas sobre la mejora de los parámetros de textura.

Resistencia a la extensión

La **Figura 4**, muestra los resultados de la extensión en las panquecas. No se encontraron diferencias significativas en la fuerza requerida para estirar las panquecas, es decir en su resistencia. No obstante, a pesar de esto, la panqueca 100% yuca requirió mayor fuerza para estirarse (por lo tanto más resistente) y además fue más extensible que las otras. Indicando que esta panqueca fue más elástica que las otras dos, por lo cual sería interesante correlacionar estos resultados con una evaluación sensorial a fin de determinar si esto influye en la aceptación.

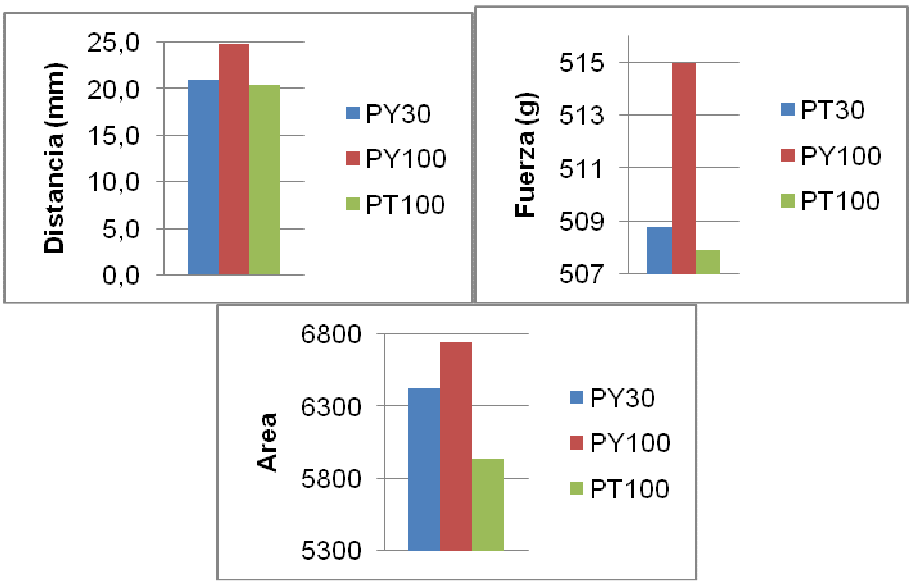


Figura 4. Resistencia a la extensión de las panquecas.

Los cambios encontrados en los parámetros de textura y resistencia podrían estar relacionados con las diferencias en los perfiles viscoelásticos de las pastas formadas por la gelificación del almidón. En general, es conocido que la yuca produce geles más viscosos y menso firmes que el almidón de trigo. Por otro lado, la presencia de proteínas formadoras de gluten en la harina de trigo podría explicar la mayor firmeza de las panquecas elaboradas con harina de trigo.

CONCLUSIONES

Los batidos elaborados con las harinas de trigo y yuca presentaron termogramas donde se observaron la presencia de un pico correspondiente a la gelatinización del almidón. El almidón de yuca mostró una estructura granular más estable, mayor estructura cristalina y mayor heterogeneidad de cristales. El proceso de gelatinización sólo fue levemente afectado por la mezcla de harinas en comparación con el proceso de gelatinización de las harinas por separado.

Luego de 24 horas de almacenamiento, las panquecas no presentaron retrogradación de amilopectina.

El color de la superficie de las panquecas fue levemente afectado por la presencia de harina e yuca. A medida que se incrementó la proporción de yuca las panquecas resultaron más oscuras.

La panqueca con 30% de trigo presentó menor firmeza, gomosidad y masticabilidad que las elaboradas con 100% harina de trigo y 100% harina de yuca.

La panqueca 100% yuca fue más extensible y requirió mayor fuerza para estirarse que las restantes.

Estos resultados refuerzan la factibilidad de sustitución parcial o total de la harina de trigo por harina de yuca en panquecas, especialmente en países de clima tropical, no productores de trigo y considerar además el empleo de la formulación 100% yuca como una alternativa en la dieta de los celíacos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento para la realización de este estudio a los proyectos:
Obtención de productos de panificación para necesidades específica. PANXTODOS. Cyted/ 106AC0301. 2006-2009.

Aprovechamiento integral de raíces, tubérculos y musáceas comestibles cultivadas en Venezuela. No. 2007002000. Programa de Cooperativo de Postgrado FONACIT- PCP. Francia – Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. (American Association of Cereal Chemists). 2003. Laboratory Method 10th edn.

Ali I, Mariasch N, Maurel S, y Deschutter S. 2006. Enfermedad celíaca: formas de presentación clínica en la población pediátrica.

Biliaderis C. 1992. Structures and phase transitions of starch in food systems. Food Technology, 145: 98-109.

Bisset W, 2001. Understanding diarrhea. *Current paediatrics*, 11, 291-295.

Da Silva-Kotze, L. 2006. Doença celíaca. *Jornal Brasileiro de Gastroenterologia*, Rio de Janeiro, 6 (1):23-34.

Ibanoglu E, Erc- elebi EA. 2007. Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums. *Food Chemistry*, 101 (2): 626–633.

Lorenzo G, Zaritzky N, Califano A. 2008. Optimization of non-fermented gluten-free dough composition based on rheological behavior for industrial production of ‘‘empanadas’’ and pie-crusts. *Journal of Cereal Science*, 48:224–231.

Pérez E, Lares M, González Z, y Tovar J. 2007. Production and characterization of cassava (Manihot esculenta Crantz) flours using different thermal treatment. *Interciencia*, 32(9):615-619.

Nakamura Ch, and Seguchi M. 2007. Improving effects of stored wheat flour on pancake texture. *Food Science and Technology*, 13 (3): 221-226.

Sánchez HD, Osella CA, de la Torre MA. 2002. Optimization of gluten-free bread prepared from cornstarch, rice flour, and cassava starch. *Journal of Food Science*, 67 (1): 416–419.

Sandoval A, Rodríguez E, Fernández A. 2005. Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. Revista de la Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia, 72(146): 45-53.

Von Atzingen M, Machado P, e Siva M. 2005. Evaluación de la textura y color de almidones y harinas en preparaciones sin gluten. *Ciencia y Tecnología alimentaria*, 4(5):319-323.

Evaluación de calidad de pastas elaboradas con diferentes cultivares de trigo pan

Assessment of quality of pasta made from different cultivars of hard wheat

Eroles E (1), Allin MG (1), Montenegro M (1), Bustos M (2), Colombo A (3), Ribotta PD (1, 3)

(1) Facultad de Ciencias, Exactas, Físicas y Naturales. UNC. Argentina.
(2) FONCYT - UNC. Argentina.
(3) CONICET
mcbustos@fcq.unc.edu.ar

RESUMEN

En la Argentina una gran cantidad de pastas se elaboran con harinas de trigo utilizadas en la elaboración de pan. En contraste, muy pocos estudios se han realizado para evaluar el desempeño de variedades de trigo pan cultivadas en nuestro país en la elaboración de pastas. El objetivo de este trabajo fue comparar el desempeño de nueve cultivares de trigo en la elaboración de pastas y su relación con la composición química de las harinas. Los cultivares de trigo empleados fueron: Arriero, Baguette 11, Baguette 13, Biguá, Capricornio, Chacarero, Gaucho, Guapo y Mataco. Los granos fueron molidos con AQC 109-Laboratoy Mill-Agromatic AG. Las harinas fueron caracterizadas mediante los siguientes análisis: humedad, proteínas, gluten, almidón dañado, pentosanos totales y solubles. También se determinó contenido de gluteninas y gliadinas. Las muestras de fideos laminados fueron preparadas a partir de 50 g de harina, 0,1% de NaCl, y cantidad óptima de agua. Se secaron en estufa bajo las siguientes condiciones: 45 *ºC* a 75% humedad relativa por 17 hs. Para evaluar la calidad de las pastas se determinó: tiempo óptimo de cocción (TOC), residuo de cocción, absorción de agua, índice de hinchamiento y color de los fideos cocidos. Para este estudio se eligieron cultivares de trigo de diferente calidad panadera, como se evidenció en los contenidos de proteínas y de gluten de las harinas (proteínas entre 8,69 y 13,32% y gluten húmedo entre 20,26 y 34,65%). Los fideos mostraron TOC entre 8,5 y 12,5 min. Los valores de residuo de cocción no superaron los niveles esperados para pastas elaboradas con sémola (entre 6,16 y 7,17%). La absorción de agua y el índice de hinchamiento presentaron valores que fluctuaron entre 172,6 y 297,0% y entre 2,24 y 2,67, respectivamente. El color de las pastas cocidas mostró diferencias según el cultivar utilizado. La luminosidad (L*) varió entre 64,63 y 69,85, mientras que la coordenada b* (tonalidad de azul a amarillo) cambió entre 10,16 y 14,85. Gaucho presentó el coeficiente de color más elevado (4,9). El análisis estadístico mostró que el tiempo óptimo de cocción presentó correlación positiva y significativa con el contenido de gluten y de gluteninas de las harinas. A pesar de que un mayor número de estudios deben realizarse, los resultados obtenidos en este trabajo indican que existen diferencias en el desempeño de los cultivares de trigo estudiados en los parámetros de calidad de pastas, lo que permitiría la selección de cultivares con mejores cualidades para la producción de este tipo de productos.

ABSTRACT

In Argentina, many pasta products are made with bread-wheat flour. Conversely, few researches have been focused on the evaluation of Argentinean-wheat varieties on pasta making performance. The aim of this work was to compare the performance of nine wheat cultivars on technological parameters of pasta making and their relationship with flour composition. Wheat cultivars evaluated was: Buck Arriero, Baguette 11, Baguette 13, Buck Biguá, Klein Capricornio, Buck Chacarero, Gaucho, Buck Guapo and Buck Mataco. Seeds were milled and flour samples were analyzed. Moisture, protein, gluten, damaged starch, total and soluble pentosans contents were determined. Also glutenin and gliadin contents were determined. Pasta was prepared from 50 g of flour, 0.1% of NaCl and water to produce a visually optimum dough prior lamination. Pasta was dried at 45 °C in a humidity controlled drier (75%) for 17 h. Optimum cooking time (OCT), cooking losses, water absorption, swelling index and pasta color were determined. Protein content ranged between 8.69 and 13.32% and gluten content

ranged between 20.3 and 34.6%, showing the wide spectrum of wheat quality used in this study. Pasta showed OCT between 8.5 and 12.5 min. Cooking losses (were between 6.16 and 7.17%) did not exceed the expected values for durum wheat pasta. Water absorption and swelling index showed values between 172.6 and 207.0%; and between 2.24 and 2.67, respectively. Wheat cultivars produced differences on pasta color. The L* value varied between 64.63 and 69.85, while b* value change between 10.16 and 14.85. The highest color coefficient (4.9) was obtained from Gaucho cultivar. The statistical analysis showed that OCT correlated positively and significantly with the flour content of gluten and glutenin. Even though further work is needed, the results obtained in the present study indicate that exist differences in the performance of the wheat cultivars in pasta quality parameters, which could allow the selection of wheat varieties with better performance and improve the quality of this type of products.

PALABRAS CLAVE: *trigo pan, pastas, calidad tecnológica.*

KEYWORDS: *hard wheat, pastas, technological quality.*

INTRODUCCIÓN

Los trigos se clasifican en función de la estación de cultivo, del color, de la dureza y textura del endospermo y de su contenido proteico. El trigo más duro, también conocido como candeal, es el *Triticum durum* (*Triticum turgidum* L. var. *Durum)*, cuya harina se utiliza en la fabricación de macarrones, espaguetis y otros tipos de pasta. A través de microscopía electrónica se ha observado que en el *T. durum* existe una fuerte adherencia entre la proteína y el almidón. Los trigos duros producen una harina con mayor granulometría (sémola o semolina), arenosa y formada por partículas de forma regular que son, en su mayoría, células enteras del endospermo. Por el contrario, los trigos blandos proporcionan una harina muy fina formada por fragmentos irregulares de las células del endospermo y partículas planas que se adhieren unas a otras.

Las pastas son alimentos muy populares debido a su facilidad de cocción y sus cualidades nutricionales (Brennan *et al.* 2004). Tradicionalmente, para la fabricación de pasta seca, se selecciona sémola de trigo *durum*, debido principalmente a su color, *flavor* y calidad a la cocción (Feillet y Dexter 1996). En Argentina, la pasta seca se fabrica con sémola de trigo candeal, semolado de trigo, harina de trigo o harina integral. Con sémola se logra un producto de mayor calidad culinaria, más consistente y resistente en la cocción, mientras que los fideos elaborados con harina de trigo pan, al contener más almidón y menos gluten, son más quebradizos y se pegan en el hervor. La comercialización de *trigo Durum* en la Argentina se realiza a través de contratos de abastecimiento, en los que los productores se obligan a sembrar una cierta superficie y a vender toda la producción, y el comprador se obliga a comprar la totalidad de la producción. En las últimas décadas, la poca oferta, el alto precio y la baja calidad del trigo candeal derivaron en el mayor empleo de trigo pan (*Triticum Aestivum* L.) en la industria de pasta seca (SAGPyA 2009). Al mismo tiempo, la mayor parte de la pasta fresca es elaborada a partir de variedades de trigo como las utilizadas en la elaboración de pan.

Evaluar la calidad a la cocción de las pastas es difícil debido a que es un parámetro que perciben los distintos consumidores de manera subjetiva. Las características de las pastas, como color, peso después de la cocción, índice de hinchamiento, absorción de agua, materia seca, pérdida por cocción y características de textura, son factores importantes que afectan la aceptación y la calidad del producto final. En este sentido, la calidad de la pasta cocida debe alcanzar las expectativas y criterios de los consumidores, por ejemplo, firmeza, pegajosidad, color, flavor y pérdida de sólidos durante la cocción (Tudorică *et al*. 2002, Kovacs *et al.* 2004).

Es por esto que se han utilizado gran cantidad de análisis para predecir la calidad a la cocción de pasta elaborada con trigo *durum*. Los principales parámetros empleados para predecir la calidad de las pastas son la cantidad de proteínas y el contenido de gluten, además de la composición proteica de la sémola obtenida a partir de dicho grano (D´Egidio *et al.* 1990, Kovacs *et al.* 1993, Kovacs *et al*. 2004). Sin embargo, son pocos los estudios que se han llevado a cabo para evaluar el desempeño de diferentes variedades de trigo pan cultivadas en nuestro país en la elaboración de pastas.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el desempeño de nueve cultivares de trigo pan en la elaboración de pasta y su relación con la composición química de las harinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se emplearon 9 cultivares de trigo pan: Buck Arriero, Baguette 11, Baguette 13, Buck Biguá, Klein Capricornio, Buck Chacarero, Gaucho, Buck Guapo y Buck Mataco. Los cultivares fueron provistos por Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) (campaña 2005). Los granos fueron molidos en un molino de rodillos AQC 109-Laboratoy Mill-Agromatic AG y la harina fue tamizada con una criba de 250 μm.

Métodos

Composición de las harinas

La humedad de las harinas se determinó sobre ~2 g de harina calentada por 2 h a 130 °C (AACC 44-15, 1995). El contenido de proteínas se determino utilizando el método de micro Kjeldahl y el factor de conversión de nitrógeno usado fue 5,7 (AACC 46-13, 1995). El contenido de gluten y almidón dañado fue determinado según AACC 38-10 y 76-30 A (1995). El contenido de pentosanos totales y solubles, y de gluteninas y gliadinas se determinó según Roccia *et al.* (2006) y Colombo *et al.* (2008); respectivamente.

Índices de calidad de las harinas

Índice de Sedimentación en Dodecil Sulfato de Sodio (IS-SDS) (Dick y Quick 1983). El método de sedimentación en SDS consiste en medir el volumen de sedimentación de una suspensión de harina en una solución de ácido láctico-SDS. Se empleó 1 g de harina a la que se le agregaron 8 mL de Azul de Coomassie 10 mg/L y se agitó con 5 inversiones. Posteriormente se agitó en vortex por 1 min y se dejó reposar hasta los 3 min 40 s. Se repitió la agitación en vórtex y se le agregaron 12 mL de una solución de SDS al 2% -ácido láctico 1:8 v/v, con posterior agitación por 1 min en agitador horizontal. La muestra se dejó sedimentar por 14 min; pasado este tiempo se midió el volumen de harina depositada.

Índice de Retención de Agua Alcalina (Método 56-10, AACC, 1995). El índice de retención de agua alcalina mide la cantidad de agua alcalina que puede retener una muestra de harina (sobre una base del 14% de humedad). Se pesaron 0,95 g de harina en tubos de 15 mL y se agregaron 5 mL de $NaHCO_3$ 0,1N. Se resuspendió toda la harina y se agitó en vortex cada 5 min durante 20 min. Luego, se centrifugó a 1000 g por 15 min. Se descartó el sobrenadante y el gel obtenido fue escurrido en ángulo de 45º por 5 min y luego a 90º por 5 min. Se pesaron las muestras hidratadas y se calculó la cantidad de agua retenida como porcentaje de peso de la muestra de harina.

Elaboración de la pasta

Las muestras de fideos laminados fueron preparadas a partir de 50 g de harina, 0,1% de NaCl y cantidad óptima de agua, que se determinó experimentalmente hasta obtener masas con las características adecuadas. Las masas obtenidas fueron cortadas en tiras de aproximadamente 2 mm de ancho y 150 mm de largo. Las piezas de pasta fueron secadas a 45 °C a 75% de humedad relativa por 17 h. Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas herméticas a temperatura ambiente.

Parámetros de calidad de la pasta

Cocción. Las muestras de pasta (4 g) fueron cortadas en piezas de 5 cm y cocidas en agua hirviendo (200 ml), manteniendo el hervor por todo el período de cocción. El tiempo óptimo de cocción (TOC) se determinó como el tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra fue colocada en el agua de cocción hasta la desaparición del centro blanco en el interior de la pasta; la determinación fue realizada por observación del corazón del fideo a través de un corte con una hoja de afeitar (AACC 16-50 1995**)** o bien por compresión de la pasta entre dos porta objetos a intervalos de 30 segundos. Luego de la cocción, la pasta fue escurrida y se le determinó absorción de agua, índice de hinchamiento y color. El agua de cocción se utilizó en la determinación del residuo de cocción. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

Absorción de agua. La absorción de agua de la pasta cocida fue determinada mediante la siguiente fórmula (Tudorică *et al.* 2002):

Absorción de agua (%) = [(peso pasta cocida (P1) – peso de la pasta cruda (P2))/ peso de la pasta cruda (P2)] x 100

Índice de hinchamiento. El índice de hinchamiento de la pasta cocida fue evaluado secando las muestras hasta peso constante a 105 °C, y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Tudorică *et al.* 2002):

Índice de hinchamiento = (peso de la pasta cocida (P1) – peso después del secado (P3))/ peso después del secado (P3)

Color. El color de la pasta cocida fue determinado con un espectrofotómetro Minolta 508d (Ramsey, NJ), utilizando una fuente de iluminación D65 y 10° de ángulo del observador (AACC 14-22 1995). Cinco tiras de fideos de 5 cm fueron colocadas en paralelo sobre un fondo negro (~0% reflectancia). Diez lecturas fueron tomadas de distintas zonas y se registraron, en escala CIE-LAB, los valores de L* (luminosidad) y b* (tonalidad de amarillo a azul). A partir de los parámetros obtenidos se calculó un coeficiente de color (coeficiente de color = $L^* + (b^* 2)/20$) (Hareland *et al.* 1995). El valor del coeficiente varía entre 0 y 10, siendo 10 la mejor calificación.

Residuo de cocción. El residuo de cocción, en el agua de cocción recolectada de cada muestra, fue determinado por evaporación a 105 °C hasta peso constante. El residuo sólido obtenido fue pesado y expresado como porcentaje de la muestra de pasta original (Tudorică *et al.* 2002).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como: promedio de los duplicados ± DS. Se realizó un análisis de correlación de Pearson utilizando el programa de análisis estadístico Infostat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las harinas

Los resultados obtenidos en el análisis de la composición química de las harinas se muestran en la **tabla 1**. El contenido de proteínas y de gluten húmedo de las harinas varió entre 8,7 y 13,3% y 20,3 y 34,7%, respectivamente.; mientras que el contenido de gliadinas y gluteninas osciló entre 2,9 y 4,5%, y 3,7 y 6,2%, respectivamente.

Tabla 1. Composición química de las harinas

Trigo	Proteínas (%)	Gluten (%)	Almidón dañado (%)	Gliadinas (%)	Gluteninas (%)	Pentosanos totales (%)	Pentosanos solubles (%)
Buck Arriero	10,5±1,2	31,2±0,6	10,6±0,2	3,8±0,3	5,7±0,1	6,1±1,2	0,67±0,03
Baguette11	10,6±0,1	28,4±0,3	7,1±0,0	3,8±0,0	5,4±0,2	4,3±0,5	0,51±0,04
Baguette13	10,5±0,2	29,3±0,4	9,1±0,3	3,8±0,1	4,9±0,2	4,8±0,1	0,76±0,02
Buck Biguá	11,1±0,3	29,3±0,1	9,9±0,3	4,3±0,4	5,0±0,1	4,8±0,2	0,77±0,09
Klein Capricornio	10,2±0,2	26,5±0,1	8,6±0,3	3,9±0,1	5,0±0,4	4,6±0,0	0,70±0,06
Buck Chacarero	13,3±0,3	34,7±0,2	6,9±0,3	4,5±0,2	6,2±0,1	4,6±0,1	0,54±0,19
Gaucho	8,7±0,0	20,3±0,1	9,1±0,3	2,9±0,2	3,7±0,1	5,0±0,1	1,16±0,24
Buck Guapo	12,0±0,0	28,4±0,4	9,0±0,3	4,4±0,3	5,7±0,2	5,1±0,1	0,87±0,06
Buck Mataco	9,8±0,0	25,4±0,2	9,7±0,0	3,7±0,0	4,5±0,1	4,8±0,3	0,62±0,05

Todas las harinas presentaron valores de almidón dañado mayores a 7,1%. Estos elevados resultados de almidón dañado eran esperables debido a que el molino utilizado posee tres pares de rodillos, lo cual produjo una rápida reducción del tamaño de partícula y gran daño sobre los gránulos de almidón.

Los valores de pentosanos totales variaron entre 4,3 y 6,1% y los de pentosanos solubles, entre 0,51 y 1,16%.

La calidad panadera de las harinas fue evaluada mediante el índice de sedimentación en SDS (**tabla 2**). El índice se asocia con la calidad y cantidad de las proteínas formadoras de la red de gluten, por lo tanto mientras mayor sea el valor del índice más apta será la harina para el desarrollo de pan. El agregado del detergente SDS facilita la ruptura de las células del endosperma y la dispersión de las proteínas, permitiendo la detección de materiales con gluten de buena calidad. Los valores de este

índice variaron entre 13,4 y 19,3 cm^3y mostraron una correlación positiva y significativa con el contenido de gluten y de proteínas.

Tabla 2. Índice de sedimentación en SDS (IS-SDS) e índice de Retención de Agua Alcalina (IRAA) de los trigos

Muestra	IS- SDS (cm^3)	IRAA (%)
Buck Arriero	18,5 ± 0,0	86 ± 2
Baguette11	17,3 ± 0,4	78 ± 3
Baguette13	19,1 ± 0,2	86 ± 3
Buck Biguá	17,9 ± 0,2	82 ± 2
Klein Capricornio	16,3 ± 0,4	81 ± 3
Buck Chacarero	19,3 ± 0,0	75 ± 2
Gaucho	13,4 ± 0,2	84 ± 0
Buck Guapo	18,0 ± 0,0	85 ± 4
Buck Mataco	15,8 ± 0,4	85 ± 1

El índice de Retención de Agua Alcalina (IRAA) es utilizado para predecir la calidad de una harina para elaborar galletitas. La capacidad de retener agua de las harinas es un inconveniente para el desarrollo de galletitas, por lo tanto harinas con valores de IRAA altos son consideradas de mala calidad galletitera. La fracción de las harinas responsable de altos valores de IRAA está constituida por los pentosanos, proteínas, glicoproteínas y complejos proteína- polisacáridos. Los valores de IRAA fluctuaron entre 74,8 y 86,2%; y se obtuvo una correlación positiva y significativa entre IRAA y el contenido de almidón dañado.

Los cultivares de trigo seleccionadas para el presente estudio mostraron diferencias significativas en la composición química, lo cual se tradujo en diferente calidad panadera y galletitera.

Parámetros de calidad de las pastas

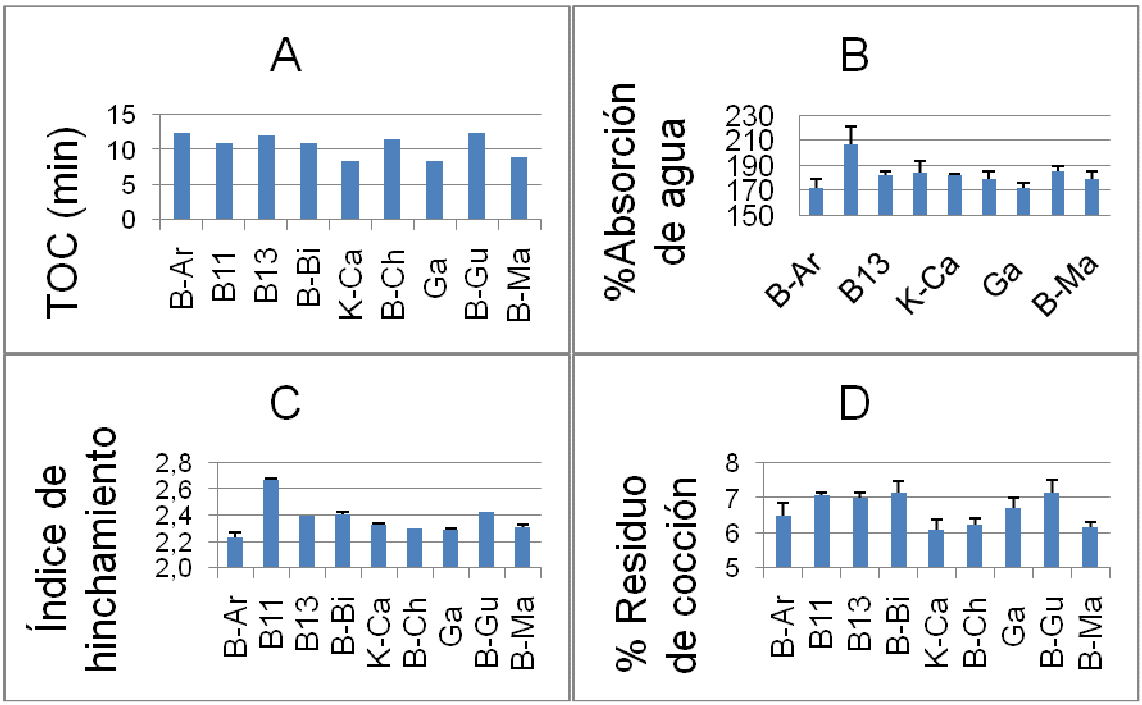


Figura 1. Evaluación de los parámetros de calidad de pastas elaboradas con los diferentes cultivares seleccionados. A: TOC, B: absorción de agua, C: Índice de hinchamiento, y D: Residuo de cocción. B-Ar (Buck Arriero), B11 (Baghette 11), B13 (Baghette 13), B-Bi (Buck Biguá), K-Ca (Klein Capricornio), B-Ch (Buck Chacarero), Ga (Gaucho), B-Gu (Buck Guapo) y B-Ma (Buck Mataco).

El punto óptimo de cocción de las pastas se considera cuando el producto cocinado se encuentra "al dente", y es alcanzado cuando el centro blanco del espagueti, formado de almidón sin gelatinizar, desaparece. Las muestras de pastas elaboradas a partir de las diferentes cultivares seleccionadas presentaron TOC entre 8,5 y 12,5 min (**Figura 1A**); siendo Buck Arriero y Buck Guapo las muestras que tuvieron los tiempos de cocción más altos, y Klein Capricorio y Gaucho los más bajos. Los tiempos óptimos de cocción estuvieron en el mismo rango de tiempos encontrados para muestras de espaguetis comerciales secos (7,5 a 10,5 min), según fue publicado en un trabajo previo (Martínez *et al.* 2007).

La calidad de las pasta está determinada por el mantenimiento del *film* proteico superficial que se desarrolla durante el laminado y que envuelve los gránulos de almidón (Dexter *et al.* 1978). A medida que la pasta es cocinada, el agua absorbida aumenta debido al hinchamiento de los gránulos de almidón, ocasionando un aumento en el volumen del producto; lo que conlleva a que se generen tensiones sobre este *film* proteico y ocasionando roturas en el mismo. A mayores valores de absorción de agua, mayores serán las tensiones generadas así como las roturas, y por tanto el producto final sufre un mayor deterioro en su calidad.

En este sentido, la absorción de agua y el índice de hinchamiento para las pastas elaboradas con las distintas harinas de trigo, presentaron valores que fluctuaron entre 172,6 y 207,0% y entre 2,24 y 2,67, respectivamente **(Figura 1B y 1C**). Baguette11 y Buck Guapo fueron las pastas que absorbieron mayor cantidad de agua, lo que podría indicar menor desarrollo del retículo proteico. Por otro lado, según estos parámetros, los retículos proteicos mejor estructurados corresponden las pastas elaboradas con Buck Arriero, Gaucho y Buck Mataco. La absorción de agua presentó menores valores que aquellos encontrados para pastas secas comerciales (254-267%) (Martínez *et al.* 2007).

La cantidad de sólidos perdidos durante el proceso de cocción se cuantifican evaluando el residuo de cocción, que es uno de los parámetros más importantes en la evaluación de la calidad de la pasta que realiza el consumidor. Las pastas elaboradas a partir de los cultivares de trigo seleccionadas presentaron valores de residuo de cocción entre 6,16 y 7,17% (Figura 1D), los cuales se encuentran dentro de los límites esperados para pastas elaboradas a partir de sémola de trigo *durum* (7 a 8%). En este sentido, Klein Capricornio, Buck Chacarero y Buck Mataco presentaron los valores más bajos y por tanto la mejor calidad de pasta.

El color de las pastas es un importante factor de calidad para los consumidores, mientras mayores índices de color tengan, más deseables serán los productos. El color de las pastas mostró diferencias según el cultivar utilizado. La luminosidad (L*) varió entre 64,63 y 69,85: mientras que la coordenada b* (tonalidad de azul a amarillo) cambió entre 10,16 y 14,85. Las pastas elaboradas con el cultivar Gaucho presentaron el coeficiente de color más elevado (4,9), mientras que las producidas con Buck Biguá el más bajo (4,3) (**Figura 2**).

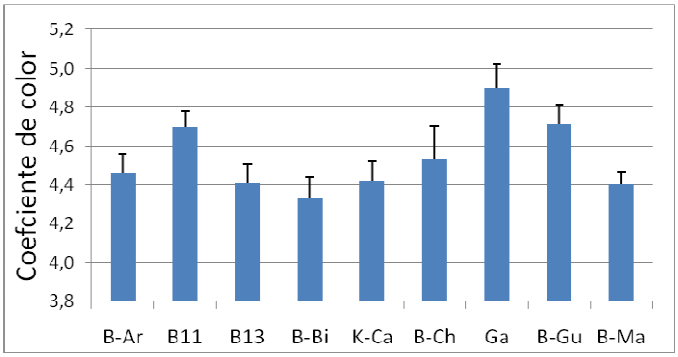


Figura 2. Coeficiente de color de las pastas elaboradas con los diferentes cultivares seleccionados. B-Ar (Buck Arriero), B11 (Baghette 11), B13 (Baghette 13), B-Bi (Buck Biguá), K-Ca (Klein Capricornio), B-Ch (Buck Chacarero), Ga (Gaucho), B-Gu (Buck Guapo) y B-Ma (Buck Mataco).

El análisis estadístico mostró correlación positiva y significativa entre el TOC y el contenido de gluten, de proteínas y gluteninas de las harinas obtenidas a partir de los trigos seleccionados, mostrando que es esencial la cantidad y calidad de proteínas formadoras de gluten para el mantenimiento de la estructura de la pieza de pasta durante el proceso de cocción.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron diferencias en el desempeño de los cultivares de trigo pan estudiados en los parámetros de calidad de pastas.
El contenido de gluten y el de gluteninas podrían ser buenos índices para la selección de harinas de calidad para la elaboración de pastas laminadas.
Si bien un mayor número de experiencias deben ser realizadas para confirmar estos resultados, la selección de trigos pan permitiría obtener harinas con mejores cualidades para la producción de este tipo de productos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a SECYT-UNC y a ANPCyT (PICT 33882) por el financiamiento otorgado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association of Cereal Chemistry. 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th Ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.

Brennan Cs, Kuri V, Tudorica CM. 2004. Inulin-enriched pasta: effects on textural properties and starch degradation. Food Chemistry, 86:189–193.

Colombo A, Pérez GT, Ribotta PD and León AE. 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.

D´Egidio MG, Mariani BM, Nardi S, Novaro P and Cubadda R. 1990. Chemical and technological variables and their relationships: a predictive equation for pasta cooking quality. Cereal Chemistry, 67(3):275-281.

Dexter JE, Dronzek BL and Matsuo RR. 1978. Scanning electron microscopy of cooked spaghetti. Cereal Chemistry, 55(1): 23-30.
Dick J, Quick J. 1983. A modified screening test for rapid stimation of gluten strength in early-generation durum wheat breeding lines. Cereal Chemistry, 60: 315-318.

Feillet P and Dexter JE. 1996. Quality requirements of durum wheat for semolina milling and pasta production. In: Pasta and noodle technology, (J.E. Kruger, R.R. Matsuo and J.W. Dick, Editors) AACC Inc, St. Paul, MN, USA , 95–123.

Hareland GA, Puhr D, Wear JG y Skunberg M. 1995. Color score: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service in cooperation with the ND state agricultural experiment stations, quality evaluation of durum wheat cultivars.
http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/gopher/Quality/Durum/1995/95durum.txt.html

Kovacs MIP, Fu BX, Woods SM, Khan K. 2004. Thermal stability of wheat gluten protein: its effect on dough properties and noodle texture. Journal of Cereal Science, 39:9–19.

Kovacs MIP, Howes NK, Leisle D, Skerritt JH. 1993. The effect of high Mr glutenin subunit composition on the results from tests used to predict durum wheat quality. Journal of Cereal Science, 18:43–51.

Martinez CS, Ribotta PD, León AE, Añón MC. 2007. Relationship between chemical analysis, cooking properties, instrumental texture and sensory evaluation in spaghetti. Journal of Texture Studies, 38: 666-683.

Roccia P, Moiraghi M, Ribotta PD, Pérez GT, Rubiolo OJ y Leon AE. 2006. Use of Solvent Retention Capacity Profile to Predict the Quality of Triticale Flours. Journal of Cereal Chemistry, 83(3):243–249.

SAGPyA. 2009. Pastas secas. SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS. República Argentina. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/farinaceos/default.asp.

Tudorică CM, Kuri V and Brennan CS. 2002. Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. Journal of Agricultural Food Chemitry, 50: 347–356.

Desarrollo de masas precocidas libres de gluten aptas para congelación

Development of free-gluten partially baked bread for frozen storage

Ferrero C [(1)], Ribotta PD [(2)], de Lamballerie M [(3)]

1 CIDCA-CONICET-Fac.de Cs. Exactas, Universidad Nac. La Plata, 47 y 116 (1900)
La Plata, Pcia. Buenos Aires. Argentina
2 CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
3 GPEA (UMR CNRS 6144) ENITIAA BP 82225, F-44322 Nantes, Cedex 3, France
E mail**:** cferrero@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

La obtención de panes de buena calidad sensorial aptos para celíacos constituye un desafío tecnológico ya que es difícil lograr productos de buen volumen y alveolado que tengan una vida útil razonable, dada la tendencia al rápido endurecimiento que presentan estos panes. La utilización de panes precocidos congelados cuya cocción final se realiza poco antes del expendio constituye una alternativa para lograr un producto de mayor aceptabilidad por parte del consumidor. El presente trabajo tuvo como objetivo la optimización y evaluación de masas de pan sin gluten aptas para precocer y congelar. En esta primera instancia se evaluó el efecto de una congelación lenta sobre los atributos de calidad. Las formulaciones se prepararon a partir de las siguientes proporciones: 45 g de fécula de arroz, 45 g fécula de mandioca, 10 g de harina de soja activa, 2 g de margarina, 2 g de sal, 3 g de levadura fresca, 0,1 g de polvo de hornear, 0,5 g de SSL, 0,5 g de hidrocoloide y 70 mL de agua destilada. Los hidrocoloides utilizados fueron goma xántica y carboximetilcelulosa (CMC). Los controles fueron preparados con la misma formulación pero sin hidrocoloide. Las masas obtenidas se fermentaron 30 min, se fraccionaron en moldes y se volvieron a fermentar durante 25 min en cámara a 30 °C antes de hornear durante 25 min a 200 °C. Los panes precocidos fueron congelados en cámara de -20 °C, después de lo cual se descongelaron a T ambiente y se terminaron de cocer (15 min). Como control de proceso se utilizó en cada caso la masa sin congelar, cocida en un solo paso de 40 min. Se evaluó volumen específico (Bread Volume Measurer BVM-L500), uniformidad del alveolado a través de análisis de imágenes, textura de miga (texturómetro Lloyd LR5K) y retrogradación de amilopectina (MicroDSCIII, Setaram) en los panes precocidos, precocidos congelados y descongelados, en los panes terminados de cocer y después de un período de almacenamiento de 24 h a temperatura ambiente. Las formulaciones con hidrocoloide mostraron un mayor volumen específico, y una distribución de alveolado más uniforme, sin colapso, en particular las que incorporaron CMC. La congelación de los panes precocidos no afectó significativamente el volumen específico salvo en el caso de la muestra con CMC. Después de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente se observó un aumento en la dureza de la miga en todos los casos pero en menor proporción en los panes con CMC. A través de los ensayos de calorimetría diferencial de barrido se observó un pico incipiente de retrogradación de amilopectina, aun en presencia de hidrocoloide.

ABSTRACT

Obtaining breads without gluten and with good sensorial quality for celiac regimes is a technological defy since it is difficult to obtain a product with good volume and air cells size and with a reasonable shelf life because of the rapid staling exhibited by these breads. The employment of frozen partially cooked breads where final cooking is performed a short period before consumption is an alternative to obtain products with a higher acceptability by consumers. The objective of the present work was to optimize and evaluate doughs able to be precooked and frozen. In this first instance it was evaluated the effect of a slow freezing on the quality attributes. Formulations were prepared with: 45 g de rice flour, 45 g tapioca flour, 10 g soy flour , 2 g shortening, 2 g salt, 3 g fresh yeast, 0,1 g leavening agent, 0,5 g SSL, 0,5 g hydrocolloid and 70 mL of distilled water. The employed hydrocolloids were xanthan gum and carboxymethylcellulose (CMC). Controls were prepared with the same component proportions but without hydrocolloids. The obtained doughs were leavened 30 min, fractioned in molds and left to leaven 25 min in a chamber at 30 °C before going to oven during 25 min at 200 °C.

Partially cooked breads were frozen at -20°C, unfrozen at room temperature and completely cooked (15 min). As a control of processing, it was employed a dough without freezing treatment that was cooked in a single step during 40 min. The following measurements were performed: specific volume (Bread Volume Measurer BVM-L500), air cell size distribution through image analysis crumb texture (texturometer Lloyd LR5K) and amylopectin retrogradation (MicroDSCIII, Setaram). These measurements were accomplished in the precooked breads, in precooked breads after freezing, in breads after final cooking and in completely cooked breads after a storage of 24 h at room temperature. Formulations with hydrocolloid showed a higher specific volume and a more uniform air cell size distribution, without collapse, particularly those with incorporated CMC. Freezing did not significantly affect the specific volume except in the case of samples with CMC. After 24 h storage at room temperature an increase in crumb hardness was observed in all cases but in a greater extent in those breads with CMC. By calorimetric assays an incipient retrogradation peak was observed even when hydrocolloid was present.

PALABRAS CLAVE: *hidrocoloide, masa, textura, retrogradación.*

KEYWORDS: *hydrocolloid, dough, texture, retrogradation.*

INTRODUCCIÓN

El pan es uno de los productos más antiguos en la alimentación humana. El pan es un producto de formulación versátil y adaptable a distintos hábitos de consumo y necesidades nutricionales. En los últimos 50 años, se han introducido nuevas tecnologías, ingredientes y aditivos que han contribuido a ampliar la oferta de productos de panificación así como a mejorar los atributos del producto. Las proteínas de gluten, gliadinas y gluteninas confieren a la harina de trigo la capacidad única de formar una masa viscoelástica capaz de retener el CO_2 producido durante la fermentación y obtener así un buen volumen de pan y alveolado de miga, características deseables en este producto por parte del consumidor. Sin embargo, existe una parte importante de la población (1 cada 167 habitantes en la Argentina según datos de la Asociación Celiaca) en la que se observa una intolerancia permanente (celiaquía) a las gliadinas del trigo y a las prolaminas presentes en otros cereales como la avenina (avena), hordeína (cebada) y secalina (centeno).

Estas proteínas afectan directamente la mucosa del intestino delgado, alterando la absorción de los nutrientes. En niños los síntomas característicos son "diarrea crónica" (síndrome de mala absorción), vómitos reiterados, marcada distensión abdominal, falta de masa muscular, pérdida de peso, retraso del crecimiento, escasa estatura, cabello y piel seca, descalcificación, inapetencia, mal carácter. La celiaquía tiene un origen genético y no siempre se manifiesta clínicamente. El único tratamiento es una dieta estricta y de por vida sin trigo, avena cebada ni centeno (sin T.A.C.C), que permite alcanzar los niveles nutricionales perdidos (Asociación Celíaca Argentina, 2009).

En la formulación de panes libres de gluten se utilizan harinas sin T.A.C.C.. Estas harinas (maíz, arroz, mandioca, soja, entre otras) no permiten obtener una masa con buenas propiedades para la elaboración de pan y por lo tanto, con el objeto de lograr un volumen y textura similares a la de los panes a base de harina de trigo se emplean diferentes aditivos, entre ellos emulsificantes e hidrocoloides.

Los panes precocidos o parcialmente cocidos son aquellos que han sido sometidos a un horneado casi completo, que ha permitido fijar la estructura, y luego han sido almacenados a bajas temperaturas (refrigeración o congelación) hasta el momento del consumo, en el que se termina la cocción durante unos minutos. En masas tradicionales, el objetivo del proceso de precocción es producir la gelatinización del almidón y la coagulación del gluten, sin alcanzar las reacciones de oscurecimiento en la corteza (Ribotta y Le Bail, 2007). Esta tecnología permite brindar al consumidor productos con las características del pan recién horneado pero con la ventaja de poder almacenarlos por períodos más prolongados y flexibilizar tanto el momento del consumo como la distribución. Si bien existe investigaciones respecto al efecto de la precocción en panes tradicionales (Carr y Tadini, 2003; Barcenas y Rosell, 2005, 2007), son más escasos los trabajos realizados sobre formulaciones sin T.A.C.C.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la congelación sobre panes libres de gluten parcialmente cocidos, formulados con harinas de arroz, mandioca y soja, emulsificante y dos diferentes hidrocoloides (goma xántica, carboximetilcelulosa).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para las formulaciones se utilizó la siguiente proporción de ingredientes: harina de arroz, 45 g; harina de mandioca, 45 g; harina de soja, 45 g; agua 70 g, *shortening*, 2g; sal, 2 g; SSL (emulsificante), 1g; levadura fresca prensada, 3 g; leudante químico, 0,1 g. Se prepararon dos formulaciones con hidrocoloide, una con 0,5 g de goma xántica y otra con 0,5 g de CMC.

Las masas se prepararon mezclando los ingredientes secos en un equipo Kitchen Aid (Reino Unido) a la mínima velocidad. Se incorporó el agua con la levadura disuelta y luego se mezcló por 3 minutos más a mayor velocidad. Seguidamente, se realizó una primera fermentación en cámara Hengel a 30 *ºC* (HR 90%) por 30 min, se mezcló por un minuto más y se vertió en moldes (60 g por molde). Se realizó una segunda fermentación por 25 min y luego se procedió a hornear las piezas durante 200 *ºC* por 40 min (cocidos en un solo paso) o por 25 min (precocidos o parcialmente cocidos). Los panes precocidos se desmoldaron, dejaron enfriar a temperatura ambiente, se introdujeron en bolsas plásticas individuales y se congelaron en cámara de -20 *ºC* a una velocidad de 0,05 *ºC*/min. Luego fueron descongelados a temperatura ambiente y terminados de cocer en horno a 200 *ºC*. Los panes precocidos, congelados y terminados de cocer fueron almacenados 24 h a temperatura ambiente para analizar su envejecimiento.

Sobre los panes cocidos en un solo paso (1), parcialmente cocidos (precocidos) (2), parcialmente cocidos y congelados (3), parcialmente cocidos, congelados y terminados de cocer (4) y los almacenados 24 h a temperatura ambiente (5) se realizaron las siguientes determinaciones:

Volumen de pan

Se midió el volumen de la pieza con equipo láser Bread Volume Measurer BVM-L500 (Suecia) y a partir del peso de cada pieza se determinó el volumen específico (mL/g). Se midieron al menos tres piezas para cada condición.

Evaluación del tamaño de los alvéolos de la miga

Se obtuvieron imágenes digitales con iluminación rasante a partir de rodajas de los panes. Estas fotografías de las rodajas fueron binarizadas, obteniéndose imágenes donde la matriz de la miga es blanca, y los alvéolos son negros. Las imágenes binarizadas fueron analizadas con un analizador de imágenes (Image J 1.38n, National Institute of health, EUA) y se determinó el tamaño alveolar medio.

Humedad de miga

Se determinó en estufa a 105°C hasta peso constante.

Análisis de perfil de textura de la miga (TPA)

Se realizaron dos ciclos de compresión (hasta un 40% de la altura original de las muestras) en un texturómetro Lloyd LR5K (Reino Unido). Los ensayos se realizaron sobre las rodajas de pan sin descortezar (dos rodajas por pan) utilizando una sonda de 20 mm de diámetro. Se evaluaron al menos dos piezas de pan por cada condición. Los atributos analizados fueron dureza (N, altura máxima de pico positivo del primer ciclo de compresión), resiliencia (adimensional, cociente del área entre el máximo del primer pico y el final del mismo y el área entre el inicio del primer pico y su máximo) y cohesividad (adimensional, cociente entre el área del pico positivo del segundo ciclo de compresión y el área del pico positivo del primer ciclo).

Retrogradación de amilopectina

Para evaluar si la congelación promovía la retrogradación de amilopectina se realizaron ensayos de Calorimetría Diferencial de Barrido en un equipo Micro DSC III Setaram (Francia). Se realizó un calentamiento programado a una velocidad de 1 *ºC*/min, entre 20 y 80 *ºC* utilizando alrededor de 300 mg de miga. Se analizó mediante el software las temperaturas inicial, de pico y final y se calculó la entalpía expresándola en J/g de muestra seca. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Tratamiento estadístico

El efecto del agregado de hidrocoloide y de los diferentes pasos del proceso (precocción, congelación, cocción después de la congelación, almacenamiento) sobre los distintos atributos (volumen especifico, alveolado, textura) fue evaluado a través de Análisis de Varianza (ANOVA) y comparación de medias con test de Tukey utilizando el software SYSTAT versión 5.0 (SYSTAT INC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Volumen de pan y características de la miga

Los panes sin hidrocoloide mostraron colapso de la miga (**Figura 1**) ya en la etapa de pre-cocción, lo que hace inaceptable al producto aun cuando el volumen específico obtenido sea similar al de las otras formulaciones (**Figura 2**). Este defecto se debe a la carencia de una matriz capaz de retener el gas formado durante el leudado y la posterior expansión de los alvéolos durante el horneado. El volumen específico de los panes no presentó diferencias significativas ($p>0,05$) entre las distintas formulaciones cuando el producto se terminó de cocer después de congelar. Se observó un aumento del volumen específico al agregar CMC respecto a la muestra sin hidrocoloide, tanto en los panes cocidos en una sola etapa como en los precocidos. Sin embargo, la congelación afectó significativamente el volumen específico de los panes con CMC como resultó de comparar los valores de la muestra cocida en un solo paso y cocida después de congelar.

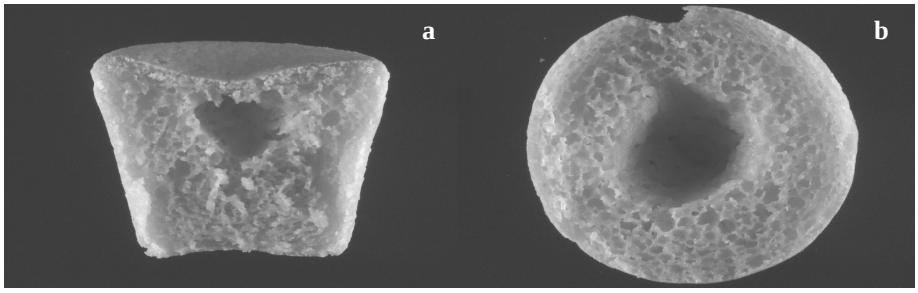


Figura 1. Colapso de la miga de pan sin hidrocoloide a) corte longitudinal b) corte transversal.

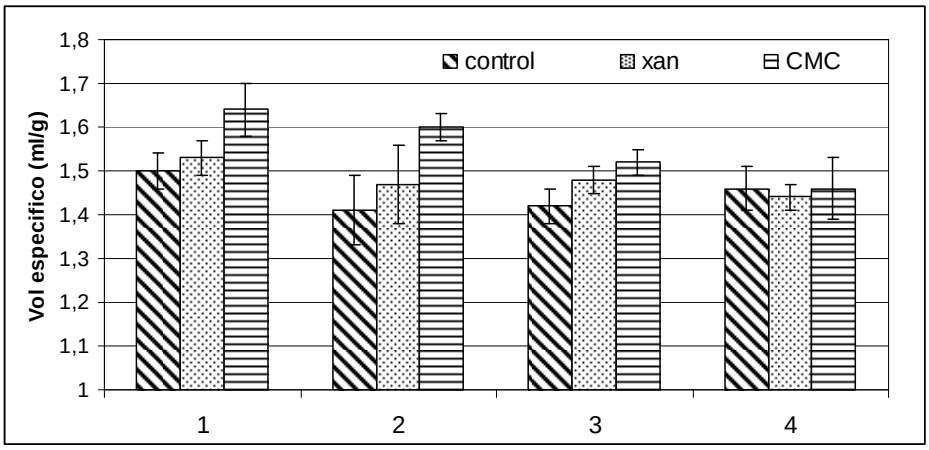


Figura 2. Efecto de los distintos tratamientos sobre el volumen especifico de las piezas sin hidrocoloide (control), con goma xántica (xan) y con carboximetilcelulosa (CMC): 1- cocido en un solo paso, 2- parcialmente cocido, 3- parcialmente cocido y congelado, 4- parcialmente cocido, congelado y terminado de cocer después de descongelar .

El histograma de tamaño alveolar mostró en todos los casos la forma típica que se muestra en la **Figura 3**. En todos los panes la mayor cantidad de alvéolos (entre un 75 y 85% según la muestra) tuvo un área inferior a 2 mm^2. Sin embargo las muestras con goma xántica fueron las que presentaron mayor cantidad de alvéolos de tamaño inferior a 2 mm^2 en el producto cocido en un solo paso. Esta goma fue la que produjo las mezclas más viscosas, lo que probablemente generó dificultad para la expansión de los alvéolos. Las migas de los panes sin gluten y con hidrocoloide mostraron en general buenas características sensoriales: esponjosidad y color aceptable, siendo mejores las muestras con CMC.

El tamaño alveolar medio (**Figura 4**) se vio afectado en el pan control (sin goma) después de la congelación; con las gomas este efecto fue menor y además se obtuvo un alveolado más uniforme. Esto se evidenció por la disminución de la cantidad de alvéolos de mayor tamaño.

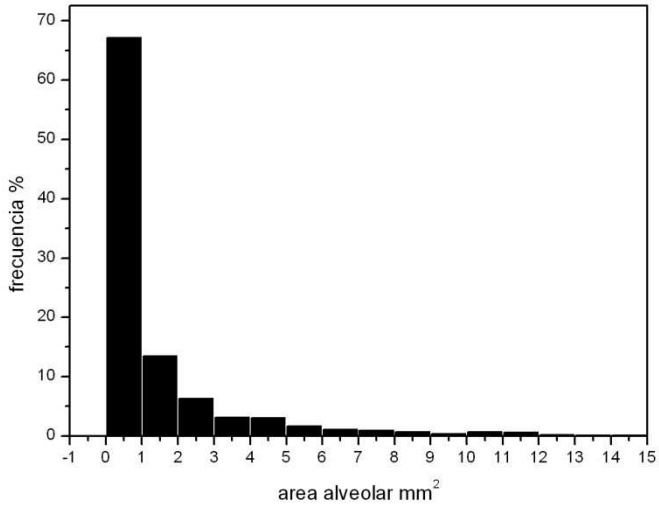


Figura 3. Histograma típico correspondiente a la distribución de área alveolar para muestras sin hidrocoloide.

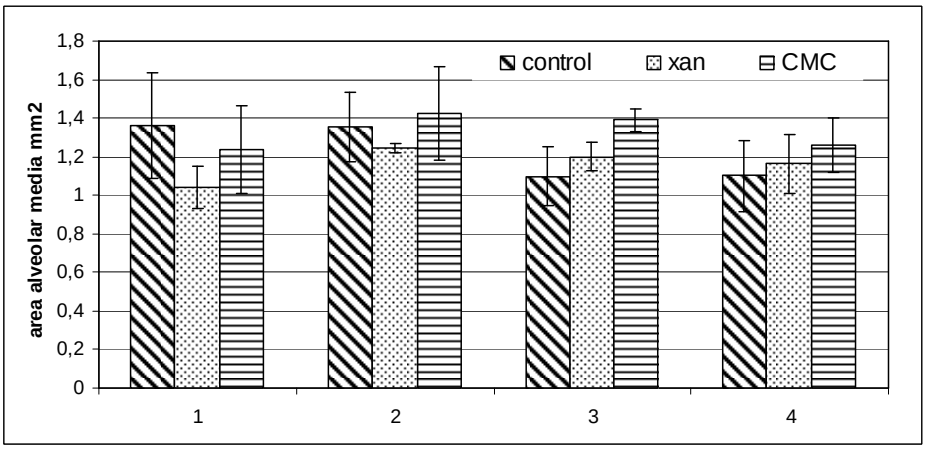


Figura 4. Efecto de los distintos tratamientos sobre el área alveolar media de la miga de pan sin hidrocoloide (control), con goma xántica (xan) y con carboximetilcelulosa (CMC): 1- cocido en un solo paso, 2- parcialmente cocido, 3- parcialmente cocido y congelado, 4- parcialmente cocido, congelado y terminado de cocer después de descongelar

La dureza de miga (**Figura 5a**) fue similar en todos los tratamientos y muestras aunque se observó una tendencia a migas más blandas con el uso de gomas en los panes parcialmente cocidos y un efecto contrapuesto de ambas gomas respecto al endurecimiento de la miga. La evaluación tanto de la resiliencia como de la cohesividad de la miga (**Figuras 5b** y **5c**, respectivamente) mostró un efecto negativo significativo de la congelación en el caso de la muestra sin goma y de la muestras con CMC, no así en la muestra con goma xántica. La resiliencia se vincula con la capacidad de un material de recuperarse después de una deformación (elasticidad instantánea) mientras que la cohesividad se relaciona con la capacidad de los componentes de un material de mantenerse unidos. Ambos atributos están por lo tanto relacionados con la integridad de la estructura, que se ve afectada por la formación de hielo.

Retención de humedad de la miga

La humedad de miga de los panes control (sin hidrocoloide) fue del 45% y se mantuvo en ese valor después de cada uno de los tratamientos (cocción en un solo paso, cocción parcial, congelación, terminación de cocción). Después de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente en bolsas plásticas, la humedad alcanzó el 43%. Los panes con hidrocoloide mantuvieron un nivel de humedad del 46,6% tanto para goma xántica como con CMC; y después de 24 h a T ambiente alcanzaron 44% de humedad.

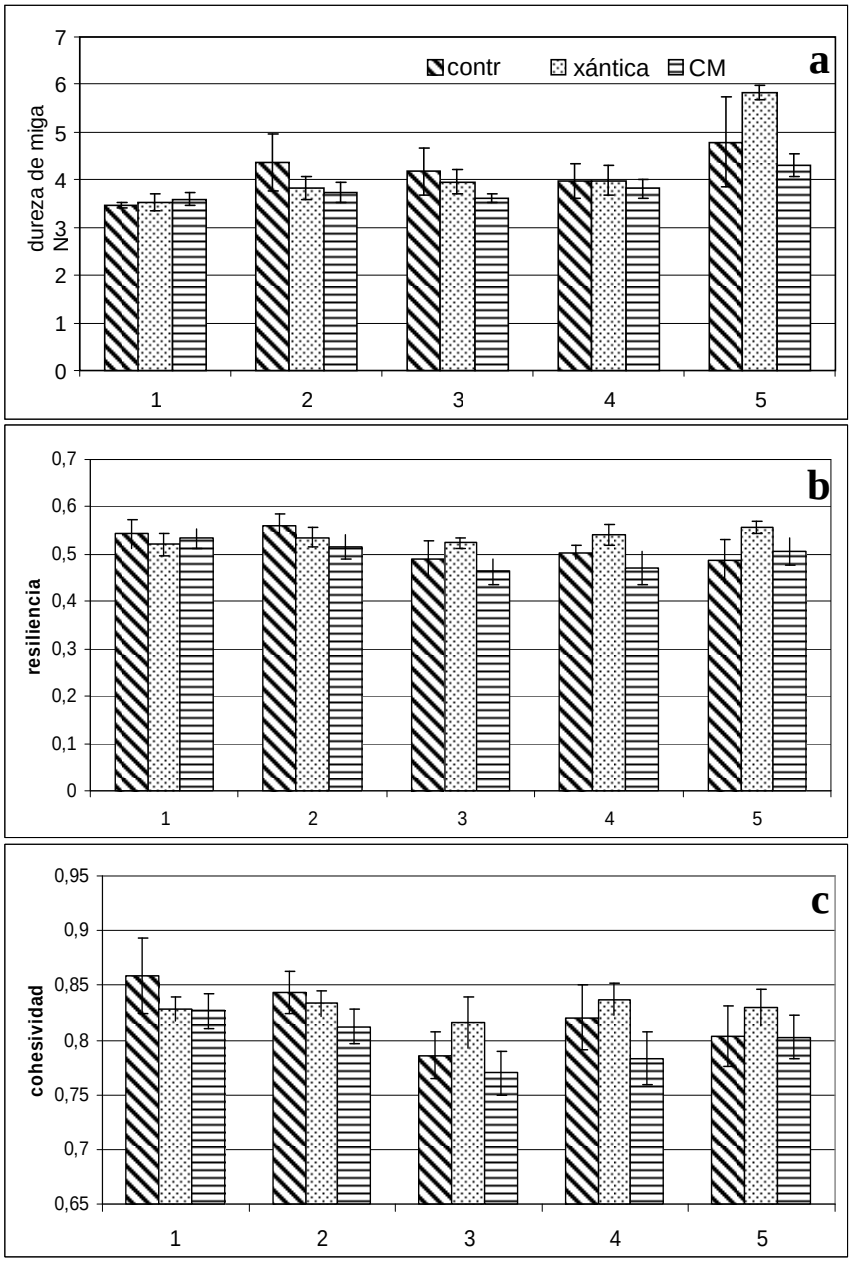


Figura 5. Efecto de los distintos tratamientos sobre la dureza (a), resiliencia (b) y cohesividad (c) de la miga de pan sin hidrocoloide (control), con goma xántica y con carboximetilcelulosa (CMC): 1- cocido en un solo paso, 2- parcialmente cocido, 3- parcialmente cocido y congelado, 4- parcialmente cocido, congelado y terminado de cocer después de descongelar y 5- almacenado 24 h a temperatura ambiente.

Retrogradación de amilopectina

Se observó un pico incipiente en las muestras cocidas después de la congelación y almacenadas 24 h a temperatura ambiente, tanto en panes sin hidrocoloide como en aquellos con goma xántica o CMC, no detectándose diferencias significativas entre las muestras. La temperatura inicial de pico promedio fue de 56,6 °C y el máximo se localizó en 63,1 °C. La entalpía promedio fue de 0,066 ± 0,002 J/g. La retrogradación de amilopectina así como la de amilosa es un fenómeno de cristalización de estos polisacáridos que implica el alineamiento de las cadenas con formación de uniones puentes de hidrogeno. Durante la gelatinización, el granulo de almidón pierde su organización original, aumenta su volumen y sufre ruptura en mayor o menor grado, pero la amilopectina queda dentro del gránulo. La ausencia de efecto de las gomas puede relacionarse con el hecho de que la retrogradación de amilopectina es un fenómeno que ocurre en el interior del gránulo de almidón gelatinizado, al que los

hidrocoloides, que podrían interferir con el alineamiento de las cadenas, no tienen acceso (Ferrero y col., 1994).

CONCLUSIONES

Las gomas, en particular la CMC mostraron ser efectivas en la obtención de una miga de mejor calidad en panes libres de gluten. Se obtuvo miga con alveolado más uniforme, sin colapso en la parte superior. El volumen específico de los panes con CMC fue superior cuando se realizó la cocción en un solo paso pero se vio disminuido por la congelación y posterior cocción. La goma xántica generó panes más estables en volumen especifico y tamaño alveolar pero que se endurecieron excesivamente tras 24 horas de almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a CONICET (Argentina) y CNRS (Francia) el subsidio recibido para realizar este trabajo y el apoyo técnico de Sylvia Chevallier y Sandra Mezaize del ENITIAA, Nantes, Francia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asociación Celiaca Argentina. www.celiaco.org Sitio oficial de la Asociación Celiaca Argentina Ingresado abril 2009.

Barcenas ME, Rosell CM. 2005. Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of par-baked bread. *Food Chemistry* 95(3): 438-445.

Barcenas ME y Rosell CM. 2007. Different approaches for increasing the shelf life of partially baked bread: Low temperatures and hydrocolloid addition *Food Chemistry* 100(4): 1594-1601.

Carr LG, Tadini CC. 2003. Influence of yeast and vegetable shortening on physical and textural parameters of frozen part baked French bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie,* **(**36): 609–614.

Ferrero C, Martino MN, Zaritzky NE. 1994. Corn Starch-Xanthan Gum Interaction and its Effect on the Stability During Storage of Frozen Gelatinized Suspensions. *Starch/Stärke* 46(8): 300-308.

Ribotta PD, Le Bail A. 2007. Thermo-physical and thermo-mechanical assessment of partially baked bread during chilling and freezing process. Impact of selected enzymes on crumb contraction to prevent crust flaking. *Journal of Food Engineering*, 78:913-921.

Películas comestibles obtenidas por extrusión: efecto del contenido de goma xántica y sorbatos en las propiedades físico-químicas y antimicrobianas

Edible films obtained by extrusion: effect of xanthan gum and sorbates content in the physico-chemical and antimicrobial properties

Flores SK (1), Costa D (2), Yamashita F (2), Gerschenson LN (1), Grossmann MV (2)

(1) CONICET - Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
(2) Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.
sflores@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las propiedades físico-químicas y antimicrobianas de películas comestibles obtenidas a partir de almidón de mandioca; y evaluar el efecto sobre dichas propiedades de la presencia de distintos niveles de goma xántica (**GX**) y del antimicrobiano sorbato de potasio (**KS**). Las películas fueron obtenidas por extrusión (técnica de soplado). Se empleó glicerol como plastificante. Las formulaciones estudiadas incluyen dos niveles de **KS** (2 y 4% p/p) y tres niveles de **GX** (0, 5 y 10% p/p).

Los resultados mostraron que el color de las películas, evaluado a través del Índice de Amarillo (**YI**) y la solubilidad en agua (**WS**), se incrementaron a medida que la cantidad de antimicrobiano y/o goma aumentaban. La permeabilidad al vapor de agua (**PVA**) no fue afectada por el contenido de goma y de KS. El contenido de humedad fue afectado, principalmente, por el contenido de KS. La efectividad de las películas como barrera a la contaminación externa fue evaluada utilizando la levadura *Zygosaccharomyces bailii*. El crecimiento microbiano fue menor para las películas con 4% de KS y 0 ó 5% de XG, luego de 48 hs de incubación, mientras que los recuentos se incrementaron en 2 ciclos log para las películas con 2% de KS y 5 ó 10% de GX.

Por lo tanto, el agregado de GX a la formulación incrementa el color y la WS de las películas, no afectando la PVA ni la humedad. El KS afecta el contenido de humedad, el YI y la WS. Las películas resultaron efectivas en el control del crecimiento microbiano, especialmente, a mayor contenido de KS y menor contenido de GX.

ABSTRACT

Biopolymers based edible films could be used in food preservation as a kind of active packaging.

Extrusion technology (blowing technique) was applied to obtain films. Glycerol was used as plasticizer, being constant the glycerol:tapioca starch ratio used (1:4.5). Studied formulations included different levels of potassium sorbate (**KS**) and xanthan gum (**GX**). Results showed that film color, expressed as Yellow Index (**YI**), and solubility in water (**WS**) increased with antimicrobial and gum concentration. Water vapor permeability (**PVA**) was not affected by KS or XG content. Moisture content was affected mainly by KS level. Antimicrobial assay to evaluate the effectiveness of the films as a barrier against *Zygosaccharomyces bailii,* demonstrated that yeast growth was lower for formulations containing 4% KS and 0 or 5% XG, after 48 hs of incubation. Cell count increased two log cycles for films with 2% KS and 5 or 10% GX.

As a conclusion, it can be said that XG addition to film formulation increased color and water solubility, and did not affect WVP and moisture content. KS content affected moisture value, YI and WS. Films were an effective antimicrobial barrier since they could control yeast growth, suggesting that studied films have a potential application as an active packaging material.

PALABRAS CLAVE: *películas comestibles, extrusión, propiedades físico-químicas, acción antimicrobiana.*

KEYWORDS: *edible films, extrusion, physical-chemical properties, antimicrobial action.*

INTRODUCCIÓN

Las películas comestibles son elaboradas a partir de biopolímeros como almidón (Godbillot *et al.* 2006, Flores *et al.* 2007a), derivados de la celulosa (Ayranci y Tunc 2001, Cheng *et al.* 2008), gomas (León y Rojas 2007), proteínas (Ozdemir y Floros 2001) y más recientemente quitosano (Li *et al.* 2002, Devlieghere *et al.* 2004). Estas películas permiten controlar la migración de la humedad, gases y lípidos y pueden ser portadoras de aditivos y nutrientes, pudiendo así ser aplicadas a la preservación de alimentos (Guilbert y Biquet 1996, Cutter 2006).

La metodología de extrusión es una de las más exitosamente empleadas en la industria del empaquetamiento debido a su versatilidad, alto nivel de productividad con costos reducidos, alta velocidad y automatización de la producción. (Sharma *et al.* 2003). En la actualidad existe escasa literatura acerca de la producción de películas comestibles elaboradas con esta tecnología.

Las películas elaboradas con almidón pueden actuar como material soporte de aditivos alimentarios tales como antimicrobianos (Flores *et al.*, 2007b). Sin embargo sus aplicaciones son limitadas debido a sus reducidas propiedades de barrera al vapor de agua. A fin de mejorar las características físicas y funcionales de las películas, se ha propuesto el empleo de mezclas de biopolímeros en su elaboración (Bangyekan *et al.* 2006). En este trabajo se utilizó goma xántica, un importante hidrocoloide de origen microbiano usado en la industria alimenticia como espesante y estabilizante. Se ha reportado que su incorporación a la formulación de películas en base a almidón afecta algunas sus propiedades tales como la absorción de agua (Veiga-Santos *et al.* 2005).

En los últimos años se ha puesto interés en la tecnología de empaquetamiento activo, con particular énfasis su aplicación para controlar la contaminación microbiana de los alimentos (Chen *at el*. 1996, Franssen y Krochta 2003, Suppakul *et al.* 2003). El sorbato de potasio es considerado un aditivo GRAS, siendo uno de los antimcicrobianos más utilizados contra levaduras y hongos (Sofos 1989).

Los objetivos del presente trabajo fueron: estudiar las propiedades físico-químicas y antimicrobianas de películas comestibles obtenidas a partir de almidón de mandioca empleando la técnica de extrusión y evaluar el efecto sobre dichas propiedades de la presencia de distintos niveles de goma xántica y del antimicrobiano sorbato de potasio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las películas fueron preparadas a partir de mezclas de almidón de mandioca (Indemil Indústria e comércio Ltda., PR, Brasil), glicerol (Dinámica, Brasil), goma xántica (Degussa S.A., Argentina) y sorbato de potasio (Sigma, St Louis, Missouri).

Proceso de Extrusión

Las películas fueron obtenidas por extrusión (técnica de soplado) y se empleó glicerol como plastificante, manteniéndose la proporción glicerol:almidón constante (1:4,5). Las formulaciones estudiadas se resumen en la **Tabla 1.**

Tabla 1: Composición de las películas estudiadas**.** Valores expresados en g / 100 g totales de mezcla

Denominación	GX	KS	Almidón de mandioca : Glicerol (4,5:1)
0GX-2KS	0	2	98
0GX-4KS	0	4	96
5GX-2KS	5	2	93
5GX-4KS	5	4	91
10GX-2KS	10	2	88
10GX-4KS	10	4	86

Obtención de los pellets

Se mezclaron manualmente los componentes sólidos (almidón de mandioca, GX y KS) junto al glicerol. En ningún caso se adicionó agua. Se empleó un extrusor de tornillo simple, marca EL-25 BGM (SP, Brasil), de alimentación manual (2kg/h) y provisto de un tornillo de Ø 25 mm y 700 mm de

longitud (28D). La velocidad del tornillo fue de 30 RPM y el perfil de temperatura de las distintas zonas del equipo fue: 120 / 120 / 120 / 115 *ºC*.

Obtención de las películas

Se empleó la técnica de soplado (terminal de soplado: Ø 50 mm). La velocidad del tornillo fue de 35 RPM y el perfil de Tº: 125 / 130 / 120 / 120 / 120 / 115 *ºC*. Una vez obtenidas las películas, las mismas fueron estabilizadas en desecadores a 25 *ºC* y 57% H.R.

Caracterización Físico-Química

Color: se determinó el YI empleando un fotocolorímetro Minolta (Japón), según ASTM E1925 y empleando un fondo blanco patrón.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA): se determinó gravimétricamente, a 25 *ºC* y 70% de H. R., adaptando el procedimiento recomendado por la norma ASTM E96-00 (2000). Se emplearon celdas de acrílico especialmente diseñadas y una cámara de temperatura y humedad controlada. Gennadios *et al.* (1994) propusieron un método de corrección, que tiene en cuenta la alta velocidad de transmisión de vapor de agua de estos materiales hidrofílicos. En este caso, la resistencia a la transferencia de vapor de agua en el espacio de aire estanco puede ser significativa. No tener en cuenta este hecho, puede conducir a subestimaciones importantes de la real PVA.

El espesor (mm) de las películas requerido para el cálculo de la PVA, se medió utilizando un espesímetro digital.

Contenido de Humedad: las películas se sometieron a secado en estufa de vacío a 70 *ºC*, hasta constancia de peso y se expresó como g agua/100 g de masa seca.

Solubilidad en agua (WS): se determinó según la técnica propuesta por Gontard *et al.* (1992) la cual involucra de determinación de la diferencia de masa seca de las películas antes y después del tratamiento en agua durante 24 horas y a 25 *ºC*.

Acción antimicrobiana

Se estudió la efectividad de las películas como barrera a la contaminación por levaduras de productos de alta actividad de agua. La actividad antimicrobiana fue evaluada usando como indicador *Zygosaccharomyces bailii*, levadura deteriorativa de alimentos conocida por su resistencia a los preservadores.

Un inóculo de *Z. bailii* NRRL 7256 fue preparado en caldo Saboureaud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) a 25 °C. El inóculo fue incubado hasta alcanzar la fase estacionaria temprana (24 h).

Con el objeto de estudiar el desempeño de las películas en cuanto a prevenir la contaminación microbiana de un producto de alta actividad de agua, se formuló un agar Saboureaud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) con a_w deprimido a 0,980 por adición de glucosa y pH ajustado a 4,5 mediante el agregado de ácido cítrico, a fin de modelar este tipo de producto. Discos de 1 cm de diámetro fueron asépticamente cortados a partir de las películas y aplicados sobre la superficie del agar. Luego, 10 µL de un inóculo de *Z. bailii* fue sembrado sobre la superficie de los discos. Los sistemas fueron incubados a 25 °C por 48 h. A tiempos seleccionados, los discos fueron suspendidos en sendos tubos de vidrio conteniendo 1 mL de agua peptona (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) estéril y agitados durante 2 minutos a 2500 RPM con un vortex a fin de resuspender la carga de levaduras, previo al recuento de las mismas. El recuento de viables se realizó en superficie sobre agar Saboureaud e incubando las placas a 25 °C por 5 días. Los resultados fueron expresados como la relación entre las unidades formadoras de colonia al tiempo seleccionado por gramo de película y las unidades formadoras de colonia por gramo de película a tiempo cero: (UFCt / g película) / ($UFCt_0$ / g película).

Análisis Estadístico

Las diferencias significativas se establecieron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y un test a posteriori LSD. La significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% (α: 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El parámetro YI es una medida del color de las películas. Este atributo es realmente importante en cuanto a la aceptación del consumidor. Es deseable que el valor de YI no sea demasiado alto a fin de mantener el producto organolépticamente aceptable. Es importante remarcar que el proceso de extrusión generó pellets y películas de color marrón claro, a partir de almidón de mandioca de color

blanco y goma xántica en polvo levemente amarilla. Es evidente que la cocción de los componentes de las películas dentro del extrusor determinó los atributos de color. En la **Figura 1 panel A**, puede apreciarse que el color de las películas, evaluado a través del YI, se incrementó desde 19,5 cuando las concentraciones de KS y XG fueron 2 y 0%, respectivamente, hasta 22,5 a medida que la cantidad de antimicrobiano y goma aumentaban.

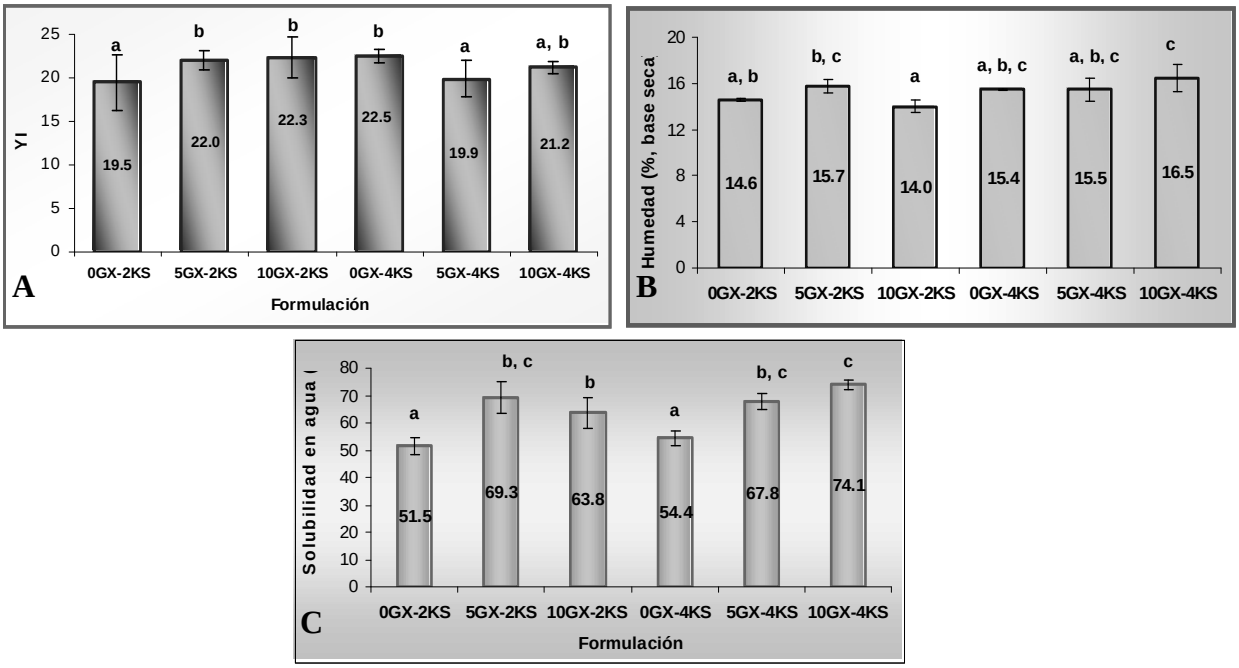


Figura 1: Caracterización de las películas obtenidas por extrusión: A) Atributos de color expresados a través del índice de amarillo (YI); B) Contenido de humedad y C) solubilidad en agua a 25 *ºC*. Valores con igual letra no difieren significativamente (α:0.05).

La permeabilidad al vapor de agua (PVA), medida a 25 *ºC* y a 70% de HR, no fue afectada por el contenido de goma y de antimicrobiano, obteniéndose un valor promedio de PVA de 6,76 x 10^{-10} g/m s Pa para las formulaciones estudiadas.

El contenido de humedad se muestra en la **Figura 1 B**. Los valores oscilaron entre 14,0 y 16,5% (p/p base seca) y fue afectado, principalmente, por el contenido de KS. Este rango de humedad fue levemente mayor que el observado para el almidón de mandioca nativo (13% p/p, base seca). Ha sido previamente reportado (Famá *et al.* 2005) que el KS incrementaba el contenido de humedad de películas en base al almidón de mandioca en comparación con películas elaboradas en ausencia del antimicrobiano. Se ha propuesto que el KS modifica la red tridimensional del biopolímero permitiendo una mayor interacción entre las moléculas de agua y las posiciones HO- en las cadenas de almidón.

La solubilidad en agua es una propiedad sumamente importante ya que puede condicionar el uso efectivo de las películas en algunas situaciones tecnológicas. Los resultados para este estudio se resumen en la **Figura 1 C.** La WS a 25 *ºC* fue menor (51,5% y 54,4% para niveles 2 y 4% de KS respectivamente) en ausencia de GX y fue incrementando su valor en paralelo al aumento en el contenido de goma, obteniéndose el más alto valor de solubilidad (74,1%) para la película conteniendo 4% de KS y 10% de XG. Estos resultados sugieren una posible interferencia de la goma en la constitución de la red de almidón, ya que la goma xántica está presente durante el proceso de gelatinización.

La **Figura 2** muestra la efectividad de las películas como barrera a contaminación externa, la cual fue evaluada utilizando la levadura *Z. bailii*. Se observó un menor crecimiento microbiano para las películas conteniendo 4% de KS y 0 ó 5% de XG, luego de 48 hs de incubación a 25 *ºC*, mientras que los recuentos se incrementaron en 2 ciclos log para las películas con 2% de KS y 5 ó 10% de GX. Este ensayo demostró que el sorbato estaba disponible para actuar como una barrera frente a la contaminación externa por levaduras, cuando la película estaba en contacto con un modelo de

alimento de actividad de agua deprimido a 0,98 por adición de glucosa y pH ajustado a 4,5 con ácido cítrico.

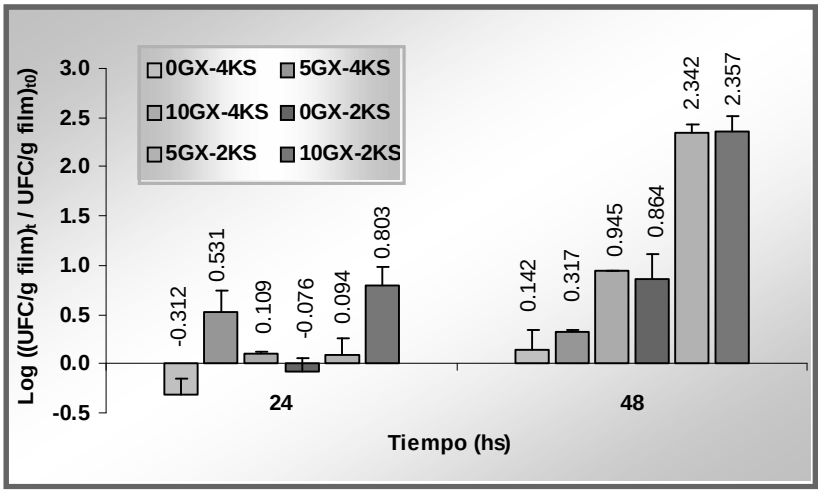


Figura 2: Efectividad de las películas obtenidas por extrusión como barrera a la contaminación externa por *Z. bailii.*

De acuerdo a los resultados obtenidos, las películas estudiadas podrían tener una potencial aplicación como material de empaquetamiento activo en relación con su acción protectora para prevenir el deterioro por microorganismos.

CONCLUSIONES

La tecnología de extrusión permitió obtener películas comestibles a partir de almidón de mandioca y plastificadas con glicerol.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el agregado de goma a la formulación de las películas incrementa el color y la solubilidad de las mismas, no afectando la PVA ni la humedad. El antimicrobiano KS afecta el contenido de humedad, el índice de amarillo y la solubilidad en agua.

Las películas resultaron efectivas en el control del crecimiento microbiano, especialmente, a mayor contenido de KS y menor contenido de GX.

Las películas desarrolladas fueron eficaces como barrera a la contaminación externa, por lo que presentan una potencial aplicación como material de empaquetamiento activo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el financiamiento de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Universidad de Buenos Aires (UBA), Universidade Estadual de Londrina, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET), MINCYT (Argentina) y CAPES (Brasil).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTM E96-00. 2000. Standard Test Method for water vapour transmission of Materials. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.

ASTM E1925. 1988. Standard Test Method for yellowness index of plastics. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.

Ayranci E, Tunc S. 2001. The effect of fatty acid content on water vapour and carbon dioxide transmissions of cellulose-based edible films. Food Chemistry, 72: 231-236.

Bangyekan C, Aht-Ong D, Srikulkit K. 2006. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. Carbohydrate polymers, 63: 61-71.

Chen M-C, Yeh G.H-C, Chiang B-H. 1996. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. Journal of Food Processing and Preservation, 20: 379-390.

Cheng LH, Abd Karim A, Seow CC. 2008. Characterisation of composite films made of konjac glucomannan (KGM), carboxymethyl cellulose (CMC) and lipid. Food Chemistry, 107(1): 411-418.

Cutter CN. 2006. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. Meat Science, 74: 131-142.

Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiology, 21: 703-714.

Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson LN. 2005. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 38: 631-639.

Flores S, Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson L. 2007a. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. Food Research International, 40: 257-265.

Flores S, Haedo AS, Campos C, Gerschenson L. 2007b. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. European Food Research and Technology, 225(3-4): 375-384.

Franssen LR, Krochta, JM. 2003. En: S. Soller editors. Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Florida: CRC Press. pag 306.

Gennadios A, Weller CL, Gooding CH. 1994. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. Journal of Food Engineering, 21: 395-409.

Godbillot L, Dole P, Joly C, Roge B, Mathlouthi M. 2006. Analysis of water binding in starch plasticized films. Food Chemistry, 96(3): 380-386.

Gontard N, Guilbert S, Cuq J-L. 1992. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. Journal of Food Science, 57(1): 190–199.

Guilbert S, Biquet B. 1996. Edible films and coatings. En: Bureau G, Multon JL, editores. Food packaging technology. New York: Wiley-VCH Inc. pag. 315-353.

Leon PG, Rojas AM. 2007. Gellan gum films as carriers of l-(+)-ascorbic acid. Food Research International, 40(5): 565-575.

Li Z, Zhuang XP, Liu XF, Guan YL, De Yao K. 2002. Study on antibacterial O-carboxymethylated chitosa/cellulose blend film from LiCl/N, N-dimethylacetamide solution. Polymer communication, 43: 1541-1547.

Ozdemir M, Floros JD. 2001. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films Journal of Food Engineering, 47: 149-155.

Sharma S, Mulvaney S, Rizvi S. 2003. Ingeniería de Alimentos. Operaciones Unitarias y Prácticas de Laboratorio. 1º ed. México: Limusa Wiley. pag 360.

Sofos JN. 1989. Sorbate Food Preservatives. Florida: CRC Press. pag 248.

Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. 2003. Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. Journal of Food Science, 68(2): 408-420.

Veiga-Santos P, Oliveira LM, Cereda MP, Alves AJ, Scamparini ARP. 2005. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch–gum films: Effect of additives and deacetylated xanthan gum. Food Hydrocolloids, 19: 341-349.

Masas elaboradas con harina de trigo: Efecto del tipo y nivel de emulsificante en las propiedades reológicas

Doughs made from wheat flour: Effect of emulsifier type and level on the rheological properties

Gómez AV[1], Añón MC[1], Puppo MC[1,2]

[1]CIDCA - Fac. Ciencias Exactas - UNLP - CONICET, 47 y 116 (1900) La Plata, Argentina.
[2]Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - UNLP, 60 y 119 (1900) La Plata, Argentina.
agomez@cidca.org.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de los emulsificantes SSL, DATEM y la mezcla de ambos en las propiedades reológicas de masas preparadas con harina de trigo. Las muestras fueron elaboradas en base a la siguiente formulación: harina de trigo (100 g), NaCl (2 g), SSL, DATEM o mezcla de SSL:DATEM 1:1 (1% y 5% base harina). La cantidad de aditivo de 5% se utilizó sólo con fines experimentales. Se empleó como muestra control una masa sin aditivo. La textura (dureza, consistencia, adhesividad, cohesividad y elasticidad) fue analizada mediante un método modificado de TPA (40% deformación) en el equipo TA-XT2i - Stable Micro Systems (Haslemere, Surrey, UK). La reología dinámica (G', G" y tan δ) fue medida en un reómetro Haake RS600 usando un sensor de platos paralelos con un gap de 1,5 mm. La incorporación de 1% de DATEM provocó una disminución en la dureza, consistencia y adhesividad de la masa. Al 5% de aditivo, sólo el SSL produjo un aumento significativo en la dureza y en la consistencia, y una disminución en la cohesividad y la elasticidad. El agregado de 5% de SSL provocó un aumento significativo tanto en el módulo de almacenamiento (G') como en el módulo de pérdida (G"). Sin embargo, la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ = G"/G') a 1 Hz de frecuencia no evidenció diferencias significativas con el tipo ni con el nivel de aditivo. La incorporación a la masa de moléculas hidrofóbicas como DATEM y SSL provoca cambios estructurales en la matriz de gluten que conllevan a la modificación de las propiedades reológicas de dichas masas. Los distintos efectos producidos por cada emulsificante sobre las masas pueden ser atribuidos a las diferentes interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas establecidas con las moléculas de proteínas. El SSL posiblemente, de carácter más hidrofóbico que el DATEM, favorece la formación de masas más duras y un poco más elásticas como consecuencia de la unión a los sitios hidrofóbicos de los polímeros de glutenina.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the influence of SSL and DATEM emulsifiers in the rheological properties of wheat dough. Samples were prepared as follows: wheat flour (100 g), NaCl (2g), SSL, DATEM and a mixture of SSL:DATEM 1:1 (1% and 5% flour base). The quantity of additive of 5% was used only for experimental purposes. A dough without additives was used as a control sample. The texture (hardness, consistency, adhesiveness, cohesiveness and elasticity) was analyzed by a modified TPA method (40% deformation). A TA-XT2i - Stable Micro Systems (Haslemere, Surrey, UK) equipment was used. The dynamic rheology (G', G" and tan δ) was measured in a Haake RS600 rheometer. A parallel plate's sensor with a 1,5 mm gap was used. The incorporation of 1% of DATEM caused a decrease in dough hardness, consistency and adhesiveness. Only 5% of SSL caused a significant increment in hardness and consistency, and a decrease in cohesiveness and elasticity. The incorporation of 5% of SSL caused a significant increment in the storage modulus (G') and in the loss modulus (G"). Nevertheless, the loss tangent (tan δ = G"/G'), evaluated at 1 Hz frequency, did not evidence significant differences between samples. The incorporation of hydrophobic molecules, as DATEM or SSL, to the dough cause structural changes in the gluten matrix. These changes led to the modification of rheological properties of the dough. The different effects produced by each emulsifier could be attributed to the distinct hydrophilic/hydrophobic interactions established with gluten proteins. SSL, possibly more

hydrophobic than DATEM, enhance the formation of harder and more elastic dough, probably due to the attachment to the hydrophobic groups of glutenin polymers.

PALABRAS CLAVE: *emulsificantes, moléculas hidrofóbicas, proteínas de gluten, reología de masa.*

KEYOWORDS: *emulsifiers, hydrophobic molecules, gluten proteins, dough rheology.*

INTRODUCCIÓN

Las harinas obtenidas de los trigos cultivados en Argentina difieren notablemente en calidad industrial, según la zona de procedencia del cereal. Estas diferencias se deben a las diversas razones genéticas y ambientales que se encuentran interrelacionadas. Una harina de trigo de buena calidad panadera no debería necesitar de aditivos para lograr un producto de buen volumen, textura y aspecto. Sin embargo, muchas veces se requiere del uso de aditivos de diversos tipos (oxidantes, emulsionantes, enzimas, hidrocoloides) para mejorar el rendimiento de harinas de calidad inferiores. Por otra parte, la mecanización e industrialización de la panadería ha hecho imprescindible el empleo de estos aditivos, con el objetivo de mejorar la calidad de los productos obtenidos.

Algunos ensayos han demostrado que los emulsificantes ejercen efectos deseados en el proceso de elaboración del pan (Köhler y Grosch 1999, Ravi *et al.* 2000, Ribotta *et al.* 2004, Aamodt *et al.* 2005, Xiujin *et al.* 2007). Durante el período de preparación de las piezas, ayudan a retener más aire en las masas, aumentan la fuerza y la extensibilidad. En la fermentación aumentan la retención de gas y evitan el hundimiento de las masas. En el horneado mejoran la textura y disminuyen la pérdida de agua. Por lo tanto, prolongan la vida útil y las características texturales de los productos terminados. Emulsificantes como el estearoil lactilato de sodio (SSL) y los ésteres de mono y diglicéridos del ácido diacetil tartárico (DATEM) son surfactantes aniónicos ampliamente utilizados en la industria panadera para mejorar la calidad de los productos panificados. Estos aditivos se unen a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de gluten promoviendo la agregación debido a la neutralización de las cargas positivas. Dichos emulsificantes son agregados a la masa de pan principalmente para reforzar la red de gluten, dar un volumen de pan mayor y prolongar la vida útil de los productos panificados (Tenney 1978, Rusch 1981, Staufer 1990, Köler y Grosch 1999).

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

La reometría dinámica es usada para medir las propiedades elásticas y viscoelásticas de los alimentos en escala de pequeñas y de grandes deformaciones (rango lineal y no lineal). Las masas son materiales viscoelásticos y las medidas oscilatorias proveen un método no destructivo para determinar los componentes viscoso y elástico del comportamiento de las mismas. En este tipo de ensayos la muestra

se somete a una deformación de corte oscilatoria en la cual la amplitud del esfuerzo se determina midiendo el torque que se transmite a la muestra por la deformación impuesta. Al aplicar el esfuerzo al material éste puede o no deformarse. El esfuerzo de un material puramente viscoso (fluido newtoniano) sufre un desfasaje delta (δ) de 90° con respecto a la deformación impuesta, mientras que el esfuerzo de un material puramente elástico no se desfasa con respecto a la deformación aplicada. El material viscoelástico por ende tiene un ángulo de desfasaje (δ) que será entre 0 y 90° (Steffe 1996b). Los parámetros fundamentales de importancia son el módulo de almacenamiento o elástico (G') que es la medida de la energía que es elásticamente almacenada por el material, el módulo de pérdida (G") que es la medida de la energía disipada por el flujo y la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ = G"/G') entre el estímulo sinusoidal aplicado y la respuesta sinusoidal obtenida del material. Si estos parámetros se determinan en condiciones de viscoelasticidad lineal para el material en cuestión, sus valores serán propios del material y no dependerán de la historia de deformación del mismo. Los ensayos de reología proveen información esencial sobre cómo la composición de la harina y los demás ingredientes que constituyen la masa influyen en la viscolelasticidad de la masa y consecuentemente en la elaboración de pan y las características de los productos terminados.
Sin embargo, todavía queda mucho por dilucidar acerca del mecanismo de acción de los emulsificantes sobre la estructura del gluten formado. Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de los emulsificantes SSL, DATEM y la mezcla de ambos, en las propiedades reológicas de masas preparadas con harina de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

La harina de trigo utilizada fue una harina tipo 000 (Molino Campodónico S.A.). Los emulsificantes empleados fueron el estearoil lactilato de sodio (SSL) y los ésteres de mono y diglicéridos del ácido diacetil tartárico (DATEM) (DANISCO A/S, Copenhagen, Denmark).
Las muestras fueron elaboradas en base a la siguiente formulación: cada 100 g de harina se utilizaron 2 g de NaCl, 1% y 5% (base harina) de los emulsificantes SSL, DATEM y mezcla de SSL:DATEM 1:1. La cantidad de aditivo de 5% se utilizó sólo con fines experimentales. Se empleó como control una masa sin aditivo. El agua fue agregada de acuerdo a la absorción farinográfica (cantidad óptima según farinograma). Las muestras fueron amasadas durante su tiempo óptimo de desarrollo.

Análisis de Perfil de Textura

Se realizó un ensayo de perfil de textura - TPA (Texture Profile Analysis) a discos de masa de 3,0 cm de diámetro por 1,0 cm de espesor. El análisis de perfil de textura fue determinado mediante un método modificado de TPA (40% deformación) en el equipo TA-XT2i - Stable Micro Systems (Haslemere, Surrey, UK). Se trabajó a temperatura constante de 25 *ºC*. Los parámetros analizados fueron Dureza, Consistencia, Adhesividad, Cohesividad y Elasticidad. La Dureza se calculó como la fuerza máxima registrada durante el primer ciclo de compresión y la Consistencia como la suma de las áreas del primer y segundo pico. La Adhesividad es el área negativa obtenida durante el primer ciclo, mientras que la Cohesividad es el cociente entre el área positiva del segundo pico y el área positiva del primero. La Elasticidad se calculó como la relación d2/d1, donde d2 es la distancia recorrida por la sonda durante la compresión en el segundo ciclo, mientras d1 es dicha distancia recorrida en el primer ciclo.

Análisis por Reología Dinámica

Se efectuaron medidas oscilatorias dinámicas en un reómetro Haake RS600 usando un sensor de platos paralelos con un gap de 1,5 mm. Inicialmente se determinó el rango de viscoelasticidad lineal mediante barridos de deformación (0,5 a 200 Pa) a frecuencia constante (1 Hz). Luego se realizaron barridos de frecuencia (0,005 a 100 Hz) a deformación constante (5 Pa). En ambos casos se trabajó a temperatura constante de 25 *ºC*. Los parámetros determinados fueron el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G") y la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfil de Textura

Al analizar la Dureza y la Consistencia (**Figura 1 a** y **b**) se observó que al 1% de aditivo sólo el DATEM presentó una disminución con respecto al control. Al 5% todos los aditivos mostraron

diferencias significativas entre sí, sin embargo, sólo el SSL provocó un aumento significativo con respecto al control.

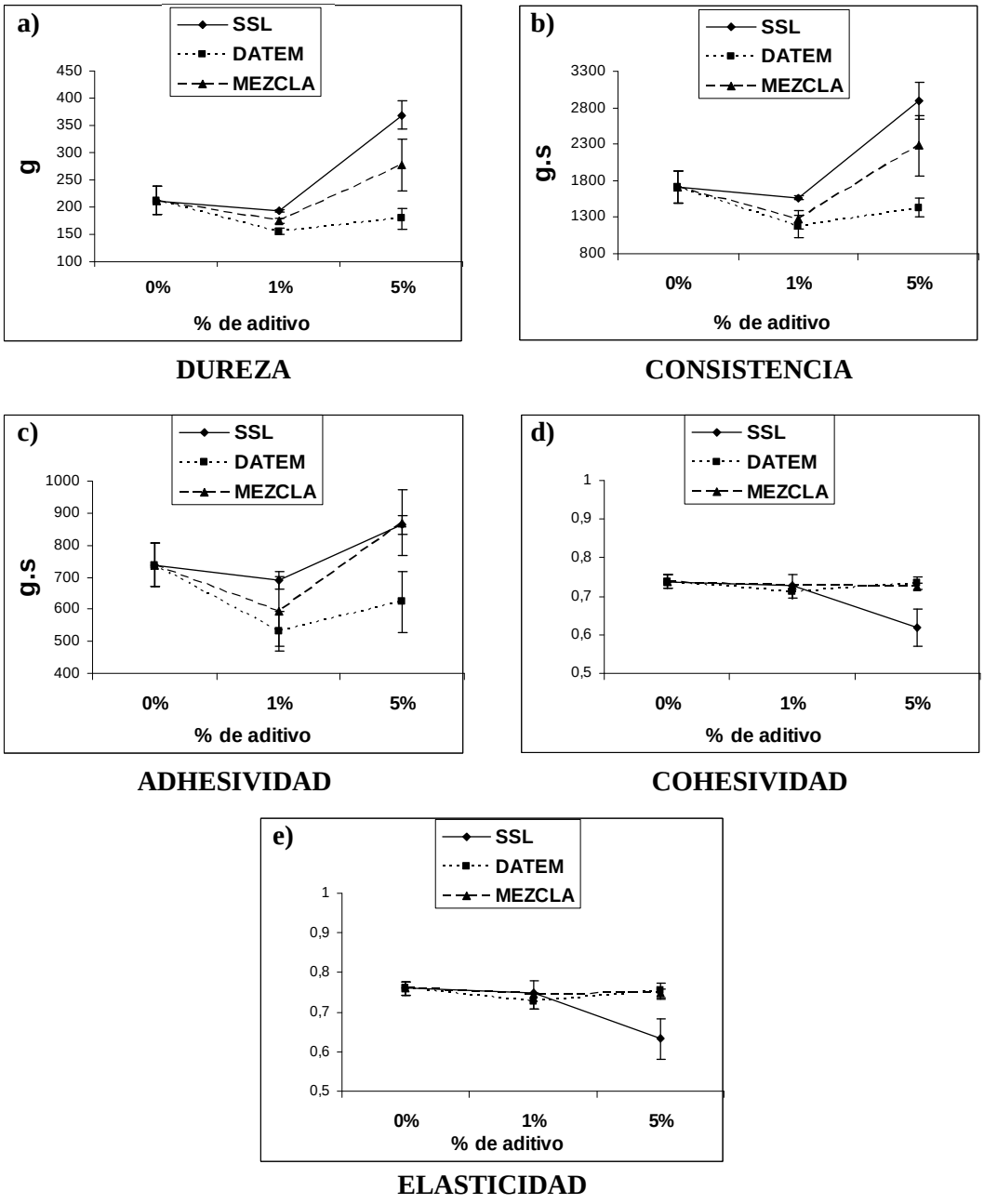


Figura 1. Perfil de textura (TPA) de las masas de harina de trigo.

Los resultados obtenidos para Adhesividad (**Figura 1 c**) evidenciaron que sólo el DATEM al 1% disminuyó este parámetro con respecto a la masa control. Al 5% este aditivo presentó diferencias significativas con respecto al SSL y la MEZCLA, registrando valores menores. Sin embargo, ni los aditivos ni la mezcla presentaron diferencias con el control.

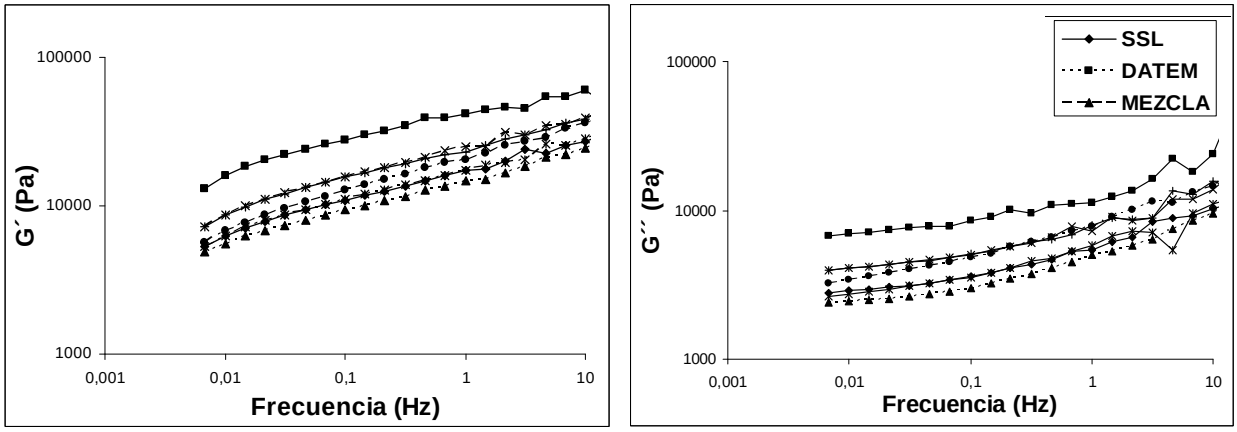
Tanto el SSL como la MEZCLA mostraron a un nivel del 5% valores mayores que al 1% en los parámetros descriptos. Un exceso de aditivo, de la naturaleza del SSL provoca cambios en la textura de la masa que posiblemente resulten desfavorables durante el proceso de panificación. Este hecho será comprobado en un estudio posterior sobre la calidad de panes.

En las **Figuras 1 d** y **1 e** puede observarse que sólo el SSL al 5% presentó una disminución significativa con respecto al control en los parámetros de Cohesividad y Elasticidad.

Resultados similares han sido reportados por Indrani y Rao (2003), en cuyo estudio se prepararon masas elaboradas con harina de trigo, sal, azúcar, huevos, aceite y agua ("parotta"). Se analizaron los parámetros de textura de dichas masas con el agregado de DATEM y SSL al 0,5%, entre otros aditivos. Los resultados obtenidos mostraron que se produjo una disminución en los valores de dureza y adhesividad en presencia de los emulsificantes, aunque con un aumento en la cohesividad.

Reología Dinámica

De los gráficos mostrados en la **Figura 2** puede observarse que para todas las muestras el módulo de almacenamiento (G') es mayor que el módulo de pérdida (G"). Esta relación que se observa entre los módulos (G' > G") indica que predomina el comportamiento elástico del sistema, durante todo el tiempo de medición.



Módulo de almacenamiento (G') **Módulo de pérdida (G")**

Figura 2. Parámetros reológicos de las masas de harina de trigo. ▲ Control, ✱ SSL 1%, ✹ DATEM 1%, ✚ MEZCLA 1%, ■ SSL 5%, ◆ DATEM 5%, ✕ MEZCLA 5%.

Al evaluar G' y G" se observó que todas las muestras presentaron valores superiores a los de la muestra control. Los resultados obtenidos muestran que existe una tendencia a aumentar los valores de G' y G" con el aumento de la concentración de SSL, mostrando al 5% un valor superior al resto de las masas (**Figura 2**). Esta tendencia también fue reportada para masas con harina de trigo y con el agregado de distintos aditivos por Shiau (2004). Los estudios de reometría realizados en el rango de temperatura 30-50 *ºC* en masas preparadas con SSL en niveles entre 0,5-1,5% (base harina) mostraron que a medida que aumentaba la concentración de aditivo aumentaban significativamente los valores de G' y G".

Por otro lado, en nuestro caso, los resultados obtenidos a 1 Hz de frecuencia para la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ = G"/G') no mostraron diferencias significativas en dicho parámetro con el tipo ni con el nivel de aditivo (datos no mostrados).

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

CONCLUSIONES

La incorporación a la masa de moléculas hidrofóbicas como DATEM y SSL provoca cambios estructurales en la matriz de gluten que conllevan a la modificación de las propiedades reológicas de dichas masas. Los distintos efectos producidos por cada emulsificante sobre las masas pueden ser atribuidos a las diferentes interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas establecidas con las moléculas de proteínas. El SSL posiblemente, de carácter más hidrofóbico que el DATEM, favorece la formación de masas más duras y un poco más elásticas como consecuencia de la unión a los sitios hidrofóbicos de los polímeros de glutenina.

AGRADECIMENTOS
Se agradece a la ANPCyT por el subsidio recibido para llevar a cabo este trabajo: PICTR 2003 Nº 286.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Aamodt A, Magnus EM, Færgestad EM. 2005. Hearth bread characteristic: Effect of protein Quality, protein content, whole meal flour, DATEM, proving time, and their interactions. Cereal Chemistry, 82(3): 290-301.

Bourne MC. 2002. Principles of Objective Texture Measurement. En: Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. 2ª ed. New York: Academic Press. Pag 107-188.

Indrani D and Rao GV. 2003. Influence of surfactants on rheological characteristics of dough and quality of parotta. International Journal of Food Science and Technology, 38: 47-54.

Köhler P and Grosch W. 1999. Study of the effect of DATEM. 1. Influence of fatty acid chain length on rheology and baking. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 1863-1869.

Ravi R, Sai Manohar R, Haridas Rao P. 2000. Influence of additives on the rheological characteristics and baking quality of wheat flours. European Food Research and Technology, 210: 202-208.

Ribotta P, Pérez G, León A, Añón MC. 2004. Effect of emulsifier and guar gum on micro structural, rheological and baking performance of frozen bread dough. Food Hydrocolloids, 18: 305-313.

Rusch DT. 1981. Emulsifiers: uses in cereal and bakery foods. Cereal Foods World, 26: 111-115.

Shiau SY. 2004. Effects of emulsifiers on dough rheological properties and the texture of extruded noodles. Journal of Texture Studies, 35: 93-110.

Stauffer CE. 1990. Emulsifiers and Dough Strengtheners. En: Functional Additives for Bakery Foods. New York: AVI-Van Nostrand Reinhold. Pag. 69-124.

Steffe JF. 1996a. Introduction to rheology. En: Rheological methods in food process engineering. 2ª ed. Michigan: Freeman Press. Pag 1-93.

Steffe JF. 1996b. Viscoelasticity. En: Rheological methods in food process engineering. 2ª ed. Michigan: Freeman Press. Pag 294-349.

Tenney R.J. 1978. Dough conditioners/bread softeners-the surfactants used in breadmaking. Bakers´ Dig. 52(4): 24-27.

Xiujin Z, Jinquan S, Zaigui L. 2007. Effects of DATEM on dough rheological characteristics and qualities of CSB and bread. Cereal Chemistry, 84(2): 181-185.

Atributos de calidad en emulsiones cárnicas magras que incluyen hidrocoloides y aceite vegetal de alto oleico

Quality attributes of lean meat emulsions including hydrocolloids and high-oleic vegetable oil

Graiver1 N, Andrés1 S, Zaritzky1, 2 N, Califano1 A.

[1]CIDCA, CONICET-CCT La Plata, Fac. Ciencias Exactas, UNLP, 47 y 116
[2] Dep. Ing.Química, Fac. Ingeniería, UNLP, 47 y 116
La Plata (1900) Argentina.
natalia@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

El consumo de lípidos de origen animal se ha vinculado a diversas enfermedades. Cumplimentar los requerimientos nutricionales e integrar las carnes como un componente saludable en la dieta es un desafío para la industria cárnica. Una opción saludable para las emulsiones cárneas es disminuir la fase grasa (vacuna o porcina) y reemplazarla por aceite vegetal con alto contenido en ácidos grasos insaturados (n3, n6 o n9). Generalmente la grasa se reemplaza parcialmente por agua y se agregan distintos productos (hidrocoloides, proteínas) para incrementar la capacidad de retención de humedad, disminuyendo las pérdidas en la cocción y mejorando la textura y jugosidad del producto.

El objetivo del trabajo fue**:** estudiar la factibilidad del reemplazo de la grasa de origen animal por aceite vegetal de alto oleico en un producto de carne vacuna magra emulsionado, mediante la inclusión de hidrocoloides y proteínas de huevo, y determinar el efecto de la adición de dichos componentes en la textura, color, rendimiento y propiedades microestructurales de emulsiones cárneas.

Se desarrollaron emulsiones cárnicas de bajo contenido lipídico formuladas con aceite de girasol con alto contenido oleico (5%) y utilizando carne vacuna magra. Se variaron las concentraciones de carboximetilcelulosa (CMC, 0-0,50%) y albúmina (0-4%), utilizando un Diseño Central Compuesto con 9 formulaciones y replicados en el centro. Todas las formulaciones incluyeron: NaCl, tripolifosfato de sodio, $NaNO_2$, ácido eritórbico y glutamato de sodio. Las muestras fueron sometidas a pre-cocción hasta que el centro alcanzó 74^{o}C, y posteriormente enfriadas y acondicionadas para los análisis posteriores.

Sobre los productos se determinaron el pH, composición (humedad, cenizas, proteínas y lípidos), rendimiento, análisis de perfil de textura (TPA, Texturómetro TAXT2i), color (colorímetro Minolta CR300) y microestructura (microscopía electrónica de barrido ambiental, ESEM). Los datos se analizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta para explicar aquellas variables que fueron afectadas por la composición utilizada.

Las formulaciones ensayadas presentaron un rendimiento en procesamiento promedio de 98,8 ± 0,4%, evidenciando una buena estabilidad térmica de la emulsión y adecuada capacidad de retención de agua de la matriz cárnea. El pH medio fue de 5,55 ± 0,05. Los parámetros de color promedio obtenidos fueron: L*=61,05±2,06, a*=19,69±1,20, b*=14,94±0,81.

La adhesividad, cohesividad, elasticidad y resiliencia no fueron afectados por la composición del producto, mientras que la dureza, gomosidad y masticabilidad de las muestras ensayadas sí dependieron significativamente de la formulación. La dureza, gomosidad y masticabilidad fueron función de CMC y de la interacción entre la CMC y la albúmina, obteniéndose los valores más altos a bajos contenidos de CMC y altos de albúmina.

Los atributos de color, textura y retención de agua durante la cocción fueron adecuados para este tipo de alimentos cárneos, no existentes en el mercado.

ABSTRACT

Animal lipid consumption has been associated with several diseases. To comply with nutritional requirements and to include meat as a health component of a diet is a challenge to the meat industry. A healthy option for meat emulsions is to limit animal fat content by replacing it with vegetable oils rich

in unsaturated fatty acids (n3, n6, or n9). Generally, fat is partially replaced by water and other components (hydrocolloids, proteins) to increment the water holding capacity, diminishing cooking losses and improving texture and juiciness of the low-fat meat emulsion.
The objective of this work was to study the feasibility of substituting animal fat by high oleic sunflower oil in a low-fat meat emulsion product, including hydrocolloids and egg proteins, and to analyze the effect of these components on texture, color, process yield, and microstructure of meat emulsions.
Low-fat meat emulsions were formulated using high oleic sunflower oil (5%) and lean bovine meat. Concentrations of carboxymethyl cellulose (CMC, 0-0.50%) and egg-albumin (0-4%) were varied according to a Central Composite Design with 9 formulations and replicates of the central point. All the formulations included NaCl, sodium tripolyphosphate, $NaNO_2$, erythorbic acid and sodium glutamate. Samples were pre-cooked until the center reached 74^{o}C, cooled and prepared for further analysis.
Composition (moisture, ash, proteins, and lipid contents), pH, process yield, texture profile analysis (TPA, TAXT2i), color (Minolta CR300) and microstructure (environmental scanning electron microscopy, ESEM) were determined on the products. Experimental results were analyzed using response surface methodology. Mean process yield of all the formulations was 98.8 ± 0.4%, showing a good thermal stability of the emulsion and adequate water holding capacity of the meat matrix. The mean pH was 5.55 ± 0.05. Average color parameters were L*=61.05 ± 2.06, a*=19.69 ± 1.20, b*=14.94 ± 0.81.
Adhesiveness, cohesiveness, springiness and resilience were not affected by composition of the product. Hardness, gumminess, and chewiness of the samples were significantly affected by the formulation. Hardness, gumminess and chewiness were function of CMC, and CMC-albumin interaction, reaching the highest values at low levels of CMC and high levels of albumin.
Color and texture attributes and water retention during cooking were adequate for this type of meat products that do not exist in the market yet.

PALABRAS CLAVE: *emulsión cárnica, carboximetilcelulosa, albúmina, textura, color.*

KEYWORDS: *meat emulsion, carboxymethyl cellulose, albumin, texture, color.*

INTRODUCCIÓN

En la "Estrategia Mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud" de la Organización Mundial de la Salud se recomienda reducir el consumo de grasas saturadas y ácidos grasos trans para disminuir los riesgos de muerte por enfermedades no transmisibles, como las cardiovasculares. Esto ha incrementado la demanda de productos con bajo contenido graso. En la actualidad no existen en el mercado suficientes alternativas saludables a igual costo de las tradicionales, lo que impulsa el desarrollo de nuevas opciones.
Los productos cárneos constituyen una parte significativa de la dieta promedio de la población de nuestro país y tienen un elevado potencial para la reducción de su contenido graso e inclusión de ácidos grasos poli-insaturados, más beneficiosos que los que tradicionalmente contienen. Las emulsiones tipo salchichas representan alimentos preferidos o bien aceptados sobre todo por la población infantil. La posibilidad de elaborar alternativas de estos productos más saludables contribuiría a fomentar una alimentación más sana, desde la niñez.
Los productos tipo emulsiones cárnicas de bajo contenido graso sin un simultáneo agregado de agua resultan más costosos debido al alto contenido en carne magra, y con una textura más firme y menos jugosa. El reemplazo de grasa por agua incrementa las pérdidas durante la cocción (Su *et al.* 2000). Más aún, utilizando menos cloruro de sodio en la formulación se ven afectadas las propiedades de capacidad de retención de agua y emulsificantes de las proteínas de la carne. La incorporación de agentes de liga es un factor que contribuiría fuertemente a evitar o disminuir la pérdida por cocción. Entre los aditivos químicos más usados para este fin se encuentran los almidones y los fosfatos, estos últimos generalmente usados en combinación con cloruro de sodio.
La grasa juega un rol importante en la formación de emulsiones cárneas (Morin *et al.* 2004) ya que ejerce una influencia considerable sobre la habilidad para ligarse de las moléculas de proteínas. Los

reemplazantes de la materia grasa constituyen una gran variedad de sustancias químicas con diversas propiedades funcionales. A las emulsiones alimenticias se les puede incorporar hidrocoloides, que son hidratos de carbono de alto peso molecular que ayudan a estabilizar este tipo de sistemas. Sus propiedades se basan en la capacidad que tienen para estructurar la fase continua del medio, lo cual depende de su solubilidad en agua y/o de la formación de asociaciones intermoleculares (Giboreau *et al.* 1994). Además aumentan la viscosidad de los sistemas, algunos tienen capacidad de gelificación y estabilizan las emulsiones (Wallingford y Labuza 1983). Uno de los hidrocoloides comúnmente utilizados en alimentos es la carboximetilcelulosa, un polímero aniónico soluble en agua derivado de la celulosa, de alto grado de pureza y disponible comercialmente. También se pueden adicionar aislados proteicos para mejorar la capacidad de retención de agua del producto. En particular, las proteínas de huevo además de ser emulsificantes y de brindar textura, tienen alto valor biológico.
El problema de formular salchichas de carne bovina con bajo contenido graso consiste en encontrar la combinación adecuada de aditivos que mantenga una buena estabilidad de los productos, con máximo rendimiento y manteniendo las condiciones de palatablidad y sabor requeridas. Una opción saludable para estas emulsiones cárneas es disminuir la fase grasa (vacuna o porcina) y reemplazarla por aceite vegetal con alto contenido en ácidos grasos insaturados (n3, n6 o n9).
El objetivo del trabajo fue: estudiar la factibilidad del reemplazo de la grasa de origen animal por aceite vegetal de alto oleico en un producto de carne bovina magra emulsionado, mediante la inclusión de hidrocoloides (carboximetilcelulosa) y proteínas de huevo, determinando el efecto de la adición de dichos componentes en la textura, color, rendimiento y propiedades microestructurales de emulsiones cárneas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron emulsiones cárnicas de bajo contenido lipídico formuladas con 5% de aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico (n9) y utilizando carne vacuna magra. Se variaron las concentraciones de carboximetilcelulosa (CMC, 0-0,50%) y albúmina (0-4%), utilizando un Diseño Central Compuesto con 9 formulaciones y replicados en el centro (**Tabla 1**). Todas las formulaciones se prepararon con la siguiente composición porcentual básica: NaCl 2%, tripolifosfato de sodio 0,2%, $NaNO_2$ 0,015%, ácido eritórbico 0,045%, fitoesteroles 0,15% y H_2O 20%; también incluyeron pimienta blanca, nuez moscada, pimentón y glutamato de sodio.

Tabla 1: Codificación de las variables correspondientes al diseño central compuesto para evaluar el efecto de la carboximetilcelulosa (CMC) y de la albúmina.

Variable codificada	-1,414	-1	0	1	1,414
CMC (%)	0	0,07	0,25	0,43	0,5
Albúmina (%)	0	0,59	2	3,41	4

La carne, sin grasa visible, fue picada y luego procesada junto con el NaCl y el tripolifosfato de sodio durante 30 s. El aceite y el agua fueron emulsionados (1 minuto) junto a los otros los ingredientes secos, y luego se agregó esta emulsión a la carne y se homogeneizó la pasta.
Se evaluó el pH de las pastas obtenidas utilizando un electrodo selectivo. Las pastas obtenidas se embutieron manualmente en tripa colágena reconstituida, comestible. Se colocaron en bolsas "cook-in" (Permeabilidad O_2: 35 $cm^3/(m^2.día.bar)$ a 23 *ºC*, CN510, Sealed Air Argentina), se pesaron y fueron sometidas a pre-cocción en baño de agua termostatizado (Haake L, Haake Buchler Instruments, Karlsruhe, Germany) a 80 *ºC* hasta alcanzar 74 °C en el centro de acuerdo a las recomendaciones (FDA-CFSAN 2003) controlando la temperatura con una termocupla de cobre-constantan. Finalizada la pre-cocción, las bolsas conteniendo las salchichas se enfriaron inmediatamente en un baño de agua-hielo, se pesaron nuevamente para calcular la pérdida de peso (el rendimiento en cocción,%) y se acondicionaron las muestras para los análisis posteriores. Para cada una de las 9 formulaciones la mitad de las muestras se cocieron en agua durante 3 minutos a 100 *ºC*.
Se determinó el color interno sobre rodajas de salchichas precocidas y cocidas mediante Colorímetro triestímulo Minolta CR300 por cuadruplicado. Se utilizó la escala de color CIE-L*, a*, b*, mediante la cual el color es descripto por los parámetros de luminosidad L*, y de cromaticidad a* y b*.

El análisis de textura instrumental se realizó sobre muestras pre-cocidas y cocidas a temperatura ambiente. Para cada formulación se evaluaron al menos cuatro muestras. Se realizó un análisis de perfil de textura (TPA) (Bourne 1978, Brennan y Bourne 1994) sobre muestras cilíndricas de 1,5 cm de altura y 1,7 cm de diámetro, las cuales fueron comprimidas un 30% de su altura original en 2 ciclos sucesivos entre platos planos empleando un Texturómetro TAXT2i (Stable Micro Systems, UK) y un software (Texture Expert Technologics Corp.) para analizar los datos. En estos ensayos la velocidad del cabezal fue de 0,5 mm/s. Se determinaron los parámetros: dureza (N), adhesividad (Joule), cohesividad (adimensional), gomosidad (N), elasticidad (adimensional), masticabilidad (N) y resiliencia (adimensional).

Se utilizó un microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM) para observar la microestructura de las distintas formulaciones, sobre muestras frescas de 0,5 cm de lado y 0,3 cm de espesor, con el fin de evaluar los posibles cambios en la matriz debido a las variaciones de la formulación.

Se determinó la composición de las salchichas precocidas por duplicado. La humedad se determinó por el método indirecto en estufa a 105 *ºC* (método AOAC 24.003 1980). El contenido total proteico se determinó utilizando el método de Kjeldahl (métodos 24.009 AOAC, 1980), mientras que para la determinación de cenizas se realizó en mufla a 550 *ºC* siguiendo el método 24.027 (AOAC 1980). El contenido lipídico se midió en muestras previamente secados con Na_2SO_4 anhidro por el método de Soxhlet, utilizando como solvente éter petróleo (pe: 35-60 *ºC*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron cambios significativos en el pH de las pastas resultantes de las distintas formulaciones, obteniéndose un valor promedio de 5,55 ± 0,05.

En la **Tabla 2** se muestra la composición porcentual de las diferentes formulaciones, en la cual se observa el bajo contenido lipídico (aceite agregado + lípidos de la carne) de las muestras y elevado contenido de proteínas de alto valor biológico (proteínas de carne y huevo).

Las formulaciones ensayadas presentaron un rendimiento en procesamiento promedio de 98,8 ± 0,4%, evidenciando una buena estabilidad térmica de la emulsión y adecuada capacidad de retención de agua y lípidos de la matriz cárnea.

Tabla 2. Composición de las distintas formulaciones expresadas como g/ 100g de emulsión cárnea.

CMC (g/100g)	Albúmina (g/100g)	Humedad (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lípidos (g/100g)	Cenizas (g/100g)
0,25	2	70,32	20,17	5,65	3,32
0	2	70,16	20,53	5,79	3,14
0,5	2	70,44	19,72	5,72	3,30
0,25	0	70,91	19,16	5,84	3,32
0,25	4	69,13	22,89	5,75	3,29
0,07	0,59	69,14	20,79	6,09	3,37
0,07	3,41	69,68	22,39	5,85	3,15
0,43	0,59	70,03	20,56	5,88	3,20
0,43	3,41	69,87	22,11	5,96	3,12

No se observaron diferencias significativas entre las formulaciones en los parámetros de color, siendo sus valores medios: L*=61,05 ± 2,06, a*=19,69 ± 1,20, b*=14,94 ± 0,81.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta para explicar aquellas variables que fueron afectadas por la composición utilizada para lo cual se propuso un modelo del tipo:

$$Z_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Donde Zi es la variable predicha, β_0 es el término independiente, β_1 , β_2 , β_{11} ,β_{22} y β_{12} son los parámetros correspondientes para los términos lineales, cuadráticos y la interacción. X_1 y X_2 son los valores codificados de carboximetilcelulosa (CMC) y albúmina respectivamente. Los términos que no

fueron significativos ($p > 0,05$) se eliminaron del modelo inicial y se obtuvo el modelo final con los parámetros significativos ($p < 0,05$).
La adhesividad, cohesividad, elasticidad y resiliencia no fueron afectados por la composición del producto, mientras que la dureza, gomosidad y masticabilidad de las muestras ensayadas sí dependieron significativamente de la formulación.
La dureza, la gomosidad y la masticabilidad fueron función tanto de CMC como de la interacción entre albúmina y CMC (Ecuaciones 2, 3, 4).

$$\text{Dureza} = 10,11-2,51\ \text{CMC}+1,44\ \text{CMC}^2-1,35\ \text{CMC Albúmina} \quad (2)$$

$$\text{Gomosidad} = 6,21-1,94\ \text{CMC}+0,79\ \text{CMC}^2-1,01\ \text{CMC Albúmina} \quad (3)$$

$$\text{Masticabilidad} = 5,61-1,92\ \text{CMC}+0,75\ \text{CMC}^2-0,97\ \text{Albúmina CMC} \quad (4)$$

En la **Figura 1** se observa la dependencia de dichos parámetros en función de la CMC y de la albúmina obteniéndose los valores más altos a contenidos bajos de CMC y altos de albúmina, probablemente debido al límite de la compatibilidad termodinámica de las proteínas y los polisacáridos en medio acuoso (Tolstoguzov 1986).

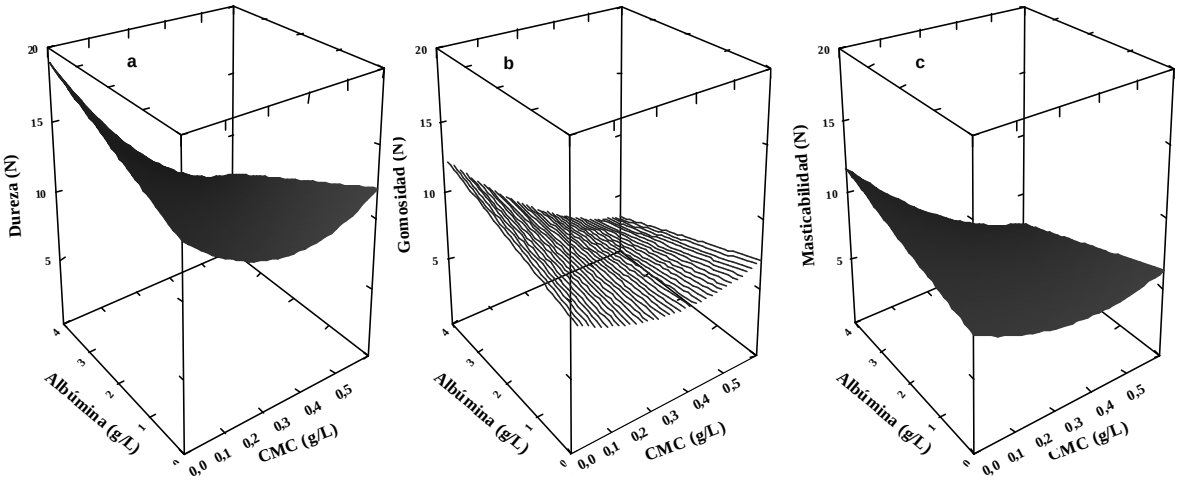


Figura 1: Superficie de respuesta obtenida para: a) dureza (N), b) gomosidad (N) y c) masticabilidad (N) en función de la concentración porcentual de carboximetilcelulosa (CMC) (g/L) y albúmina (g/L).

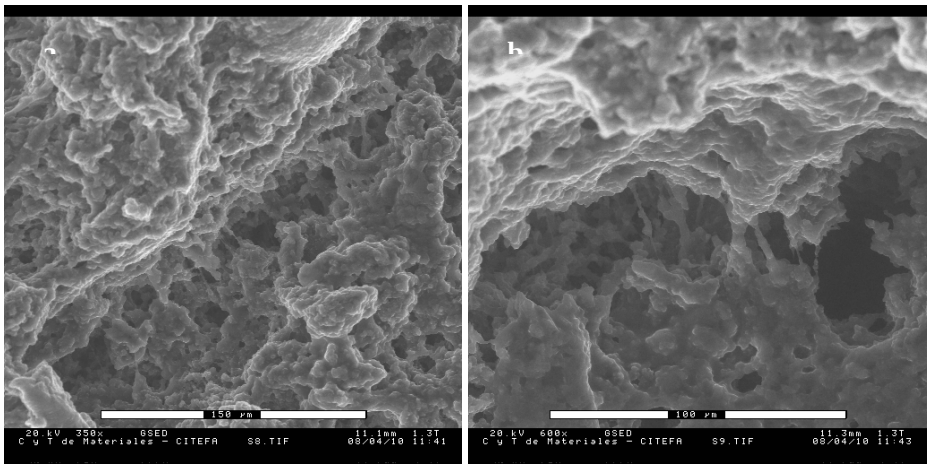


Figura 2: Micrografías obtenidas por ESEM de la emulsión cárnea formulada con el agregado de 0,25% de CMC y 4% de albúmina. a) barra = 150 µm; b) barra = 100µm

Ninguno de los parámetros estudiados se vieron afectados por la cocción (3 min a 100 °C).
En lo observación de las microestructuras de las distintas formulaciones pudo observarse, en todos los casos, una matriz proteica granular, con estructuras tipo gel, formada principalmente por proteínas cárnicas junto con proteínas no cárneas agregadas e hidrocoloides incorporados a la formulación. La **Figura 2** corresponde a las micrografías de muestras de salchichas formuladas con el agregado de 0,25% de CMC y 4% de albúmina.
Los atributos de color, textura y retención de agua y lípidos durante la cocción fueron adecuados para este tipo de alimentos cárneos, no existentes en el mercado.

CONCLUSIONES

Es posible elaborar salchichas de carne vacuna de bajo contenido lipídico y con adecuado balance en sus lípidos por incorporación de aceite vegetal con alto contenido de ácido oleico, logrando buenas propiedades funcionales mediante el agregado de hidrocoloides y proteínas de huevo en la formulación. Asimismo, los productos obtenidos presentaron elevados rendimientos en procesamiento, y adecuados parámetros de calidad (color, textura) siendo así una alternativa saludable para este tipo de alimentos cárneos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero provisto por: Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC 1980. Official methods of analysis. 13th ed. Washington,DC: Association of Official Analytical Chemists. 1018

Bourne, MC. 1978. Texture profile analysis. Food Technology, 32, 62-66, 72.

Brennan JG, Bourne MC. 1994. Effect of lubrication on the compression behavior of cheese and frankfurters. Journal of Texture Studies, 25: 139-150.

FDA-CFSAN. 2003. U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutritions. Cook it safely. Disponible en: http//:www.foodsafety.gov/~acrobat/f99broch.pdf. Acceso: 15 Mayo 2003.

Giboreau A, Cuvelier G, Launay B. 1994. Rheological behaviour of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. J Texture Studies 25, 119.

Morin LA, Temelli F, McMullen L. 2004. Interactions between meat and barley (Hordeum spp.) β-glucan within a reduced-fat breakfast sausage system. Meat Science, 68: 419-430.

Su YK, Bowers JA, Zayas JF .2000 Physical characteristics and microstructure of reduced-fat Frankfurters as affected by salt and emulsified fats stabilized with nonmeat proteins. Journal of Food Science, 65 (1), 123-128.

Tolstoguzov V. 1986. Functional properties of Protein-Polysaccharide Mixtures. En: J. R. Mitchell y D. A. Ledward editores. Functional properties of food macromolecules London y New York: Elsevier Applied Science Publishers. 385-415.

Wallingford L, Labuza TP. 1983. Evaluation of the water binding properties of food hydrocolloids by physical /chemical methods and in a low fat meat emulsion. Journal of food science, 48: 1-5.

Películas biodegradables a partir de almidón de maíz nativo y acetilado

Biodegradable films from native and acetylated corn starch

López OV (1), Zaritzky NE (1,2), García MA (1)

(1) CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos), Facultad de Ciencias Exactas UNLP, CONICET, 47 y 116 S/Nº, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina.
(2) Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, UNLP. La Plata. Pcia. de Buenos Aires. Argentina.
ovlopez75@yahoo.com.ar

RESUMEN

En los últimos años se ha investigado el desarrollo de películas elaboradas con materias primas obtenidas de recursos renovables en reemplazo de derivados del petróleo, debido principalmente a los problemas ambientales que ocasiona el uso de estos polímeros. Los objetivos de este trabajo fueron: desarrollar películas a partir de almidón de maíz nativo, acetilado y una mezcla de ambos; determinar su permeabilidad al vapor de agua (WVP) y sus propiedades mecánicas. Las películas se obtuvieron por moldeo a partir de suspensiones acuosas al 5% p/p de: 100% almidón nativo, 100% almidón acetilado y la mezcla de ambos en iguales proporciones. Además se formularon películas con el agregado de glicerol como plastificante cuya concentración varió de 0-100% p/p. La WVP se determinó según una modificación del método de la ASTM E96. Esta propiedad es crítica en el desarrollo de envases para alimentos ya que una de las principales funciones de los mismos es disminuir la transferencia de humedad entre el alimento y la atmósfera que lo rodea. El agregado de glicerol permitió disminuir la permeabilidad al vapor de agua de las películas, obteniéndose un valor mínimo cuando la concentración del plastificante era de 30% p/p. Mayores concentraciones de glicerol produjeron un incremento significativo de la permeabilidad al vapor de agua de las películas debido al carácter hidrofílico del plastificante. Este comportamiento resultó similar para las películas de almidón nativo, acetilado y la mezcla de ambos. Además se observó que las películas que contenían almidón acetilado presentaron menor permeabilidad al vapor de agua que las de almidón nativo para la mayoría de las concentraciones de glicerol. Las propiedades mecánicas se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Inglaterra) mediante ensayos de tracción. Las películas sin plastificar presentaron patrones típicos de los materiales quebradizos ya que las fuerzas de tensión registradas resultaron elevadas mientras que los porcentajes de elongación fueron muy bajos. El agregado de hasta 30% de glicerol disminuyó la fuerza de tensión y aumentó el porcentaje de elongación pero esta variación no resultó significativa ($p<0.05$). A concentraciones mayores de glicerol el perfil mecánico de las películas cambió correspondiendo al de materiales flexibles ya que las fuerzas de tensión disminuyeron y los porcentajes de elongación aumentaron significativamente. El uso de almidón acetilado en las formulaciones permitió obtener matrices más resistentes ya que las fuerzas a la ruptura aumentaron mientras que la elongación disminuyó, para todas las concentraciones de glicerol ensayadas. A partir de la mezcla de almidón de maíz nativo y acetilado se pueden obtener películas biodegradables homogéneas cuyos espesores oscilaron entre 90 y 110µm. La incorporación de almidón modificado permitió disminuir la permeabilidad al vapor de agua de las películas. El agregado de plastificante fue necesario para mejorar las propiedades mecánicas y contribuyó además a disminuir la permeabilidad del vapor de agua, siendo la concentración óptima de glicerol 30%.

ABSTRACT

In the last years the development of films based on materials of renewable resources in replacement of petroleum derivatives has been investigated, due mainly to the environmental problems causes by the use of these polymers. The objectives of this work were: to develop films from native and acetylated corn starch as well as the mixture of them; to determine its water vapour permeability (WVP) and its mechanical properties. The films were obtained by casting aqueous suspensions at 5% w/w of: 100% native corn starch, 100% acetylated corn starch and its mixture in equal proportions. Furthermore glycerol was added as plasticizer to gelatinized starch suspensions, which concentration varied between 0

to 100% w/w. WVP was determined according to a modification of the ASTM E96 method. For food packages this property is critical since one of the main functions of them is to minimize the humidity transference between the food and the surrounding atmosphere. The glycerol addition allowed to reduce the films water vapour permeability, obtaining a minimum value when the plasticizer concentration was 30% w/w. Glycerol concentrations higher than 30% w/w produced a significant increase of films water vapour permeability due to the plasticizer hydrophilic character. Native, acetylated and the mixture starch films showed similar behavior. For the most glycerol concentrations, the films which contained acetylated starch presented lower WVP than those formulated with native starch. Mechanical properties were determined in a texturometer TA.XT2i – Stable Micro Systems (England) using a tension grip system A/TG. The films without plasticizer addition presented typical fragile materials patterns since the registered tensile strengths were high whereas the elongations at break resulted very low. Glycerol addition at a concentration of 30% w/w diminished the tensile strength and increased the elongation at break but these variations were not significant ($p < 0.05$). Glycerol concentrations higher than 30% w/w modified the mechanical behavior of films showing the stress-strain curves the typical pattern of high flexible materials since tensile strength values decreased and elongations at break increased significantly. The use of acetylated starch in films formulations allowed to obtain more resistant matrixes since the tensile strengths increased whereas the elongations at break diminished, for all the assays glycerol concentrations. Homogenous and biodegradable films can be obtained from mixture of native and acetylated corn starch in equal proportions which films thickness varied between 90 and 110µm.. The incorporation of modified starch allowed to diminish the films water vapor permeability. The plasticizer addition was necessary to improve the mechanical properties and contributed to reduce the water vapor permeability, being the optimal concentration of glicerol 30% p/p.

PALABRAS CLAVE: *películas, almidón de maíz nativo y acetilado, WVP, propiedades mecánicas.*

KEYWORDS: *films, native and acetylated corn starch, WVP, mechanical properties.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha investigado el desarrollo de películas elaboradas con materias primas obtenidas de recursos renovables en reemplazo de derivados del petróleo, debido principalmente a los problemas ambientales que ocasiona el uso de estos polímeros. El almidón, uno de los polisacáridos más abundante en la naturaleza, es un hidrocoloide con capacidad de formar películas pero su naturaleza hidrofílica restringe seriamente su aplicación (Shogren *et al.* 1993). La modificación del almidón permite alterar la estructura y propiedades de los almidones nativos y podría considerarse una manera de solucionar este problema (Lafargue *et al.* 2007). Las modificaciones químicas más comunes son: eterificación, esterificación, entrecruzamiento y descomposición (hidrólisis ácida o enzimática u oxidación) (Wurzburg 1986). En un estudio previo se determinó que no todos los almidones químicamente modificados poseen capacidad formadora de películas, siendo el acetilado el más adecuado para este fin (López *et al.* 2008). Este almidón, ampliamente utilizado en la industria de alimentos, se obtiene generalmente por esterificación del almidón nativo con anhídrido acético en presencia de un catalizador alcalino (Singh *et al.* 2007). Además, se evaluó la necesidad del agregado de plastificantes para mejorar las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos. Generalmente se incorporan polialcoholes, oligosacáridos o lípidos, siendo glicerol el más utilizado ya que es altamente compatible con la matriz en las películas a base de hidrocoloides (Cuq *et al.* 1997, Gontard *et al.* 1993, Park *et al.* 1994, Sothornvit y Krochta 2005). Si bien, las películas obtenidas a partir de almidón acetilado plastificadas con glicerol resultaron homogéneas, compactas, flexibles y con buenas propiedades de barrera el costo de este almidón químicamente modificado podría limitar su utilización. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: desarrollar películas a partir de una mezcla de almidón de maíz nativo y acetilado en iguales proporciones plastificadas con glicerol, determinar su permeabilidad al vapor de agua (WVP) y sus propiedades mecánicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de almidón

Los almidones de maíz nativo y acetilado utilizados en este estudio fueron provistos por Misky, Arcor (Tucumán, la Argentina). El grado de la acetilación del almidón químicamente modificado utilizado es de 2,20±0,04; este valor se encuentra por debajo del límite máximo recomendado por la Food and Drug Administration (FDA) para el uso en alimentos (hasta 2,5%). Además, los almidones acetilados utilizados en la formulación de alimentos contienen entre 0,5-2,5% de grupos acetilos (Rutenberg y Solarek 1984).

Preparación de las películas

Se prepararon suspensiones acuosas al 5% p/p de almidón nativo, acetilado y una mezcla en iguales proporciones de ambos almidones. Las mismas fueron gelatinizadas a 90 *ºC* durante 20 min. Las películas se obtuvieron por moldeo y se secaron en estufa a 37°C durante aproximadamente 40 hs. Una vez secas, las películas se removieron de las placas. Además se formularon películas con agregado de plastificante (glicerol) cuya concentración varió entre 0 y 100% p/p.

Caracterización de las películas

Permeabilidad al vapor de agua (WVP). Se determinó según una modificación del método de la ASTM E96 (Mali *et al.* 2002). Las muestras se colocaron en celdas de acrílico que tenían un área expuesta de 0,00181 m^2 las cuales se almacenaron a 20^{o}C en jarras herméticas. Se mantuvo un gradiente de 75% de humedad relativa (RH) a través de las películas el que correspondía a una fuerza impulsora de 1753,55 Pa. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y de la pendiente se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) teniendo en cuenta el área expuesta en (g s^{-1} m^{-2}). Luego se calculó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) en (g Pa^{-1} s^{-1} m^{-1}) multiplicando la WVTR por el espesor de la película y dividiéndolo por la fuerza impulsora. El espesor de las películas se determinó utilizando un medidor electrónico de espesores Elcometer A 300 FNP 23 (England) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Propiedades mecánicas. Se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Inglaterra) mediante ensayos de tracción con un sistema de pinzas de tensión A/TG. Para los ensayos se utilizaron probetas de 7 cm de longitud y 0.7 cm de ancho obtenidas de las películas; los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas automáticamente por el software Texture Expert Exceed instalado en una PC conectada al equipo. A partir de las mismas se obtuvo la fuerza a la ruptura (N) y la deformación de las películas a la ruptura (mm), según la norma ASTM D882-91 (1996). Para todas las muestras analizadas se obtuvieron los perfiles mecánicos (esfuerzo vs. porcentaje de deformación)

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa Systat® Software (Version 10.0). Se realizaron los análisis de varianzas (ANOVA) y los ensayos de comparación de medias mediante el test de Fisher's least significant difference (LSD) con un nivel de significación del 0,05. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que todas las suspensiones filmogénicas utilizadas fueron capaces de formar películas homogéneas que se removieron fácilmente de los moldes. La **Figura 1** corresponde a las películas obtenidas a partir de almidón nativo, acetilado y la mezcla, sin plastificante y con el agregado de 30% p/p de glicerol. Los espesores de los materiales obtenidos oscilaron entre 90 y 110 µm, dependiendo de la relación masa de la suspensión filmogénica/área de la placa.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La **Figura 2** muestra el efecto de la concentración de glicerol sobre la WVP de los *films* para las tres matrices estudiadas. El comportamiento observado podría relacionarse con los cambios estructurales que ocurren cuando se adiciona un plastificante como glicerol. Los *films* sin plastificantes presentan matrices rígidas y quebradizas con grietas o poros facilitando la permeación del vapor de agua. Cuando se adiciona glicerol hasta 30 g/100 g de almidón, se obtiene una estructura más densa reduciendo los valores de WVP. Un aumento mayor de la concentración de plastificante produjo un aumento significativo ($p<0.05$) en la WVP debido al carácter hidrofílico del glicerol. Resultados

similares fue observados por Sothornvit *et al.* (2002) en películas de diferentes hidrocoloides y plastificantes Además se observó que para la mayoría de las concentraciones de glicerol, las películas que contienen almidón acetilado presentaron menores valores de WVP que las formuladas a partir de almidón de maíz nativo solamente.

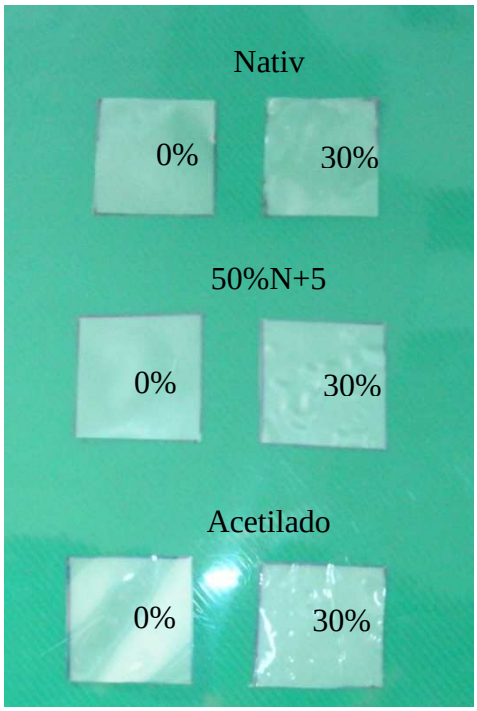


Figura 1. Fotos de películas de almidón de maíz nativo, acetilado y una mezcla en iguales proporciones de ambos almidones, sin agregado de glicerol y con 30% p/p de glicerol.

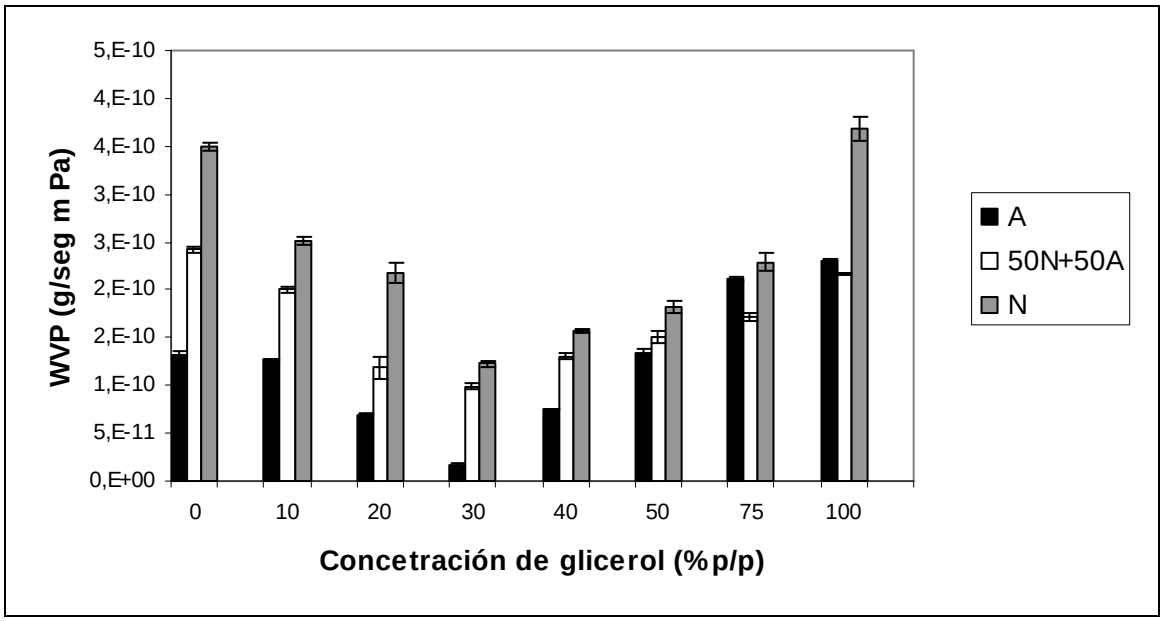


Figura 2. Efecto de la concentración de glicerol sobre la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de almidón de maíz nativo, acetilado y una mezcla de ambos en iguales proporciones.

Propiedades mecánicas

El comportamiento mecánico de las películas se evaluó a través de las curvas de esfuerzo en función de la deformación porcentual. La **Figura 3** muestra el efecto del agregado de glicerol en los perfiles mecánicos de los tres sistemas estudiados. Las películas sin plastificar resultaron rígidas presentando

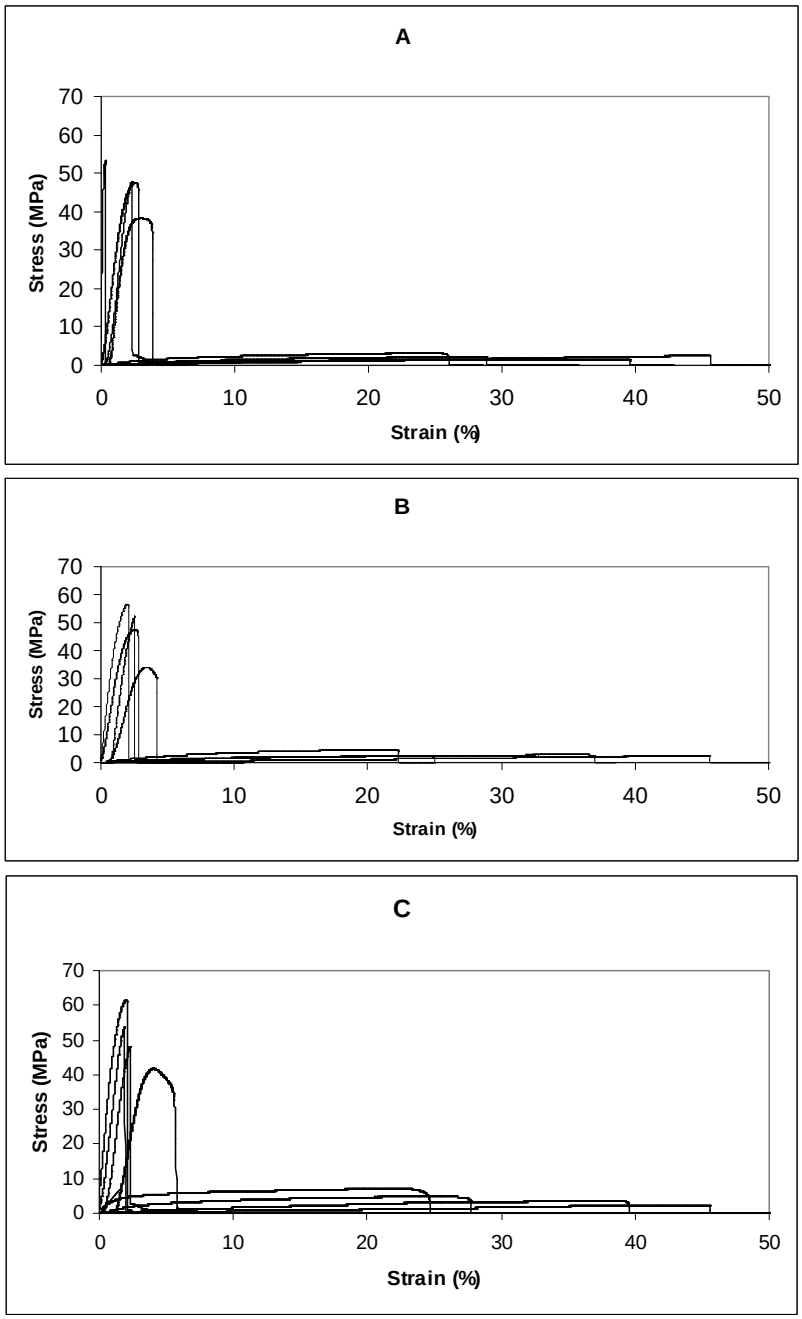


Figura 3. Efecto de la concentración de glicerol sobre los perfiles mecánicos de tracción de películas de: A) almidón nativo, B) mezcla de almidón nativo y acetilado en iguales proporciones y C) almidón acetilado.

patrones típicos de materiales quebradizos. El agregado de glicerol mejoró la flexibilidad de las películas de almidón disminuyendo las fuerzas a la ruptura y aumentando la deformación de las mismas. El aumento en la flexibilidad se debe a que los plastificantes interfieren en la asociación de las cadenas poliméricas facilitando su deslizamiento. El agregado de hasta 30% de glicerol disminuyó la fuerza de tensión y aumentó el porcentaje de elongación pero esta variación no resultó significativa ($p<0.05$). A partir de 30% p/p de glicerol, el patrón mecánico de las películas cambió correspondiendo ahora a materiales flexibles ya que las fuerzas de tensión disminuyeron y los porcentajes de elongación aumentaron significativamente. Esta variación de las propiedades mecánicas (disminución de la fuerza de tensión e incremento de la elongación a la ruptura) en función de la concentración de glicerol resultó no lineal. Esta tendencia también fue reportada por otros autores para películas de almidón de distintos orígenes (Lourdin *et al.* 1997, Gaudin *et al.* 1999, Chang *et al.* 2000, Myllarinen *et al.* 2002). Además, el uso de almidón acetilado en las formulaciones permitió obtener matrices más

resistentes ya que las fuerzas a la ruptura aumentaron mientras que la elongación disminuyó, para todas las concentraciones de glicerol ensayadas. Estos resultados podrían atribuirse a que la incorporación de los grupos acetilos en la modificación del almidón permitiría el desarrollo de una matriz más resistente debido al refuerzo de las interacciones puente de hidrógeno entre las cadenas poliméricas alineadas.

CONCLUSIONES

A partir de la mezcla de almidón de maíz nativo y acetilado se pueden obtener películas biodegradables homogéneas. La incorporación de almidón modificado permitió disminuir la permeabilidad al vapor de agua de las películas. El agregado de plastificante fue necesario para mejorar las propiedades mecánicas y contribuyó además a disminuir la permeabilidad del vapor de agua, siendo la concentración óptima de glicerol 30% p/p. Así, el reemplazo del 50% de almidón acetilado por almidón nativo en la formulación de películas permite desarrollar materiales con propiedades de barrera adecuadas y alta resistencia mecánica, aptos para el envasado de alimentos, con el beneficio adicional de un bajo costo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al CONICET por el financiamiento recibido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTM. 1996. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882 - 91. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA : American Society for Testing and Materials.

Chang YP, Cheah PB, Seow CC. 2000. Plasticizing-antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state. Journal of Food Science, 65: 445-451.

Cuq B, Gontard N, Cuq JL, Guilbert S. 1997. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45(3): 622-626.

Gaudin S, Lourdin D, Le Botlan D, Ilari JL, Colonna I. 1999. Plasticisation and mobility in starch-sorbitol films. Journal of Cereal Science, 29: 273-284.

Gontard N, Guilbert S, Cuq, JL. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of and edible wheat gluten film. Journal of Food Science, 58(1): 206-211.

Lafargue D, Lourdin D, Doublier JL. 2007. Film-forming properties of a modified starch/κ-carrageenan mixture in relation to its rheological behaviour. Carbohydrate Polymers, 70(1): 101-111.

López, OV, García MA, Zaritzky NE. 2008. Film forming capacity of chemically modified corn starches. Carbohydrate Polymers, 73: 573–581.

Lourdin D, Bizot H, Colonna P. 1997. “Antiplasticization” in starch-glycerol films. Journal of Applied Polymer Science, 63: 1047-1053.

Mali S, Grossman MV, García MA, Martino MN, Zaritzky NE. 2002. Microstructural characterization of yam starch films. Carbohydrate Polymers, 50 (4): 379-386.

Myllarinen P, Partanen R, Seppala J, Forssell P. 2002. Effect of glycerol on behaviour of amylose and amylopectin films. Carbohydrate Polymers, 50: 355-361.

Park HJ, Bunn, JM, Weller, CL, Vergano, PJ, Testin, RF. 1994. Water vapour permeability and mechanical properties of grain protein-based films as affected by mixtures of polyethylene glycol and glycerin plasticizers. Trans. ASAE, 37(4): 1281-1285.

Rutenberg, MW, Solarek D. 1984. Starch derivatives: Production and uses. En: Whistler RL, BeMiller JN, Paschall EF, editors. Starch: Chemistry and Technology. 2º ed. Academic Press, New York.

Shogren RL, Fanta GF, Doane, WM. 1993. Development of Starch Based Plastics - A Reexamination of Selected Polymer Systems in Historical Perspective. Starch/Stärke, 45: 276-280.

Singh J, Kaur L, McCarthy, OJ. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-A review. Food Hydrocolloids, 21: 1-22.

Sothornvit R, Krochta JM. 2005. Plasticizers in edible films and coatings, in Innovations. En: Jung H. Han, editor. Innovations in food packagings. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pag. 403-428

Sothornvit R, Reid DS, Krochta, JM. 2002. Plasticizer effect on the glass transition temperature of beta-lactoglobulin (P-Lg) films. Trans. ASAE, 45(5): 1479-1484.

Wurzburg OB. 1986. Modified starches: Properties and uses. Boca Raton, FL: CRC Press.

Propiedades de bloqueo de radicales libres de fracciones de hidrolizados de gluten de trigo

Blocking properties of free radicals of wheat gluten hydrolyzate fractions

Luggren PJ (1), Drago SR (1, 2) y González RJ (1).

(1) Instituto de Tecnología de Alimentos, Fac. Ingeniería Química - U.N.L., 1º de Mayo 3250 (3000) Santa Fe, Argentina.
(2) CONICET.
E-mail: sdrago@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

Los antioxidantes son adicionados durante el procesamiento de los alimento para mejorar su estabilidad y calidad. Estos pueden actuar a través de diferentes mecanismos: deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas mediadas por radicales libres, eliminando el oxígeno disuelto en el producto o complejando metales traza que facilitan la oxidación. Los hidrolizados proteicos pueden presentar actividad antioxidante y ser usados en sistemas de alimentos como aditivos o como ingredientes nutracéuticos. El objetivo del trabajo fue obtener extractos de hidrolizados proteicos por medio de fraccionamientos por pH y evaluar la presencia de propiedades antioxidantes.

Se trabajó sobre hidrolizados de gluten de trigo con índices de tricloroacético (ITCA) de 14%, 22% y 32,6% y con gluten tratado térmicamente (GTT), previamente producidos en condiciones definidas de pH, temperatura y tiempo de hidrólisis. Las distintas fracciones proteicas fueron obtenidas por solubilización a pH 4, 6,5 y 9 y liofilizadas. Para evaluar las propiedades antioxidantes (AO) se utilizó el método que utiliza el radical $ABTS^{*+}$, que se basa en su decoloración por los péptidos antioxidantes y el resultado se expresó como mmol Trolox/g proteína del extracto (TEAC).

Los extractos de los hidrolizados presentaron mayor actividad AO que los extractos de GTT. El ANOVA multifactor mostró diferencias significativas con el grado de hidrólisis, siendo la muestra de ITCA de 14% la de mayor actividad. También se observó que el extracto de pH 4 de la muestra de ITCA de 22% presentó un valor de actividad AO, semejante a los extractos del hidrolizado de 14%. Si bien algunos extractos de pH presentaron más actividad que otros, el ANOVA multifactor no mostró un efecto significativo del pH. Sin embargo, para las muestras de mayor ITCA (22 y 32,6%), los extractos de pH 4 presentaron mayor actividad que a los otros pH. La AO (expresada en mM de Trolox), aumentó con la concentración de proteínas, llegando a una saturación luego de los 6 g/l. Asimismo, al considerar la concentración de aminos libres, se satura a 4,7 mEq/l de serina. Una hidrólisis suave permitió obtener muestras con buenas propiedades AO, sin embargo, si la hidrólisis continúa las propiedades antioxidantes disminuyen. El fraccionamiento por pH no permitió concentrar la actividad en la muestra de bajo grado de hidrólisis (14%), pero fue efectiva en los hidrolizados de mayor ITCA, obteniéndose mayor actividad en las fracciones de pH 4. Estos ensayos ponen en evidencia propiedades antioxidantes de compuestos que podrían ser utilizados como aditivos en la conservación de alimentos. Sería necesario realizar estudios *in vivo* para confirmar su efectividad como antioxidantes a ser empleados en alimentos funcionales.

ABSTRACT

Antioxidant compounds are incorporated during the food processing to improve food stability and quality. They can act through different mechanisms: scavenging free radicals from fat oxidation, removing the dissolved oxygen in the product or forming complex with trace metal that promote the oxidation. Antioxidant activity of protein hydrolyzates may be used in food systems such as additives or nutraceutical ingredients. The aim of this work was to obtain extracts from protein hydrolyzates by pH fractionation and to evaluate their antioxidant properties.

The assayed samples were gluten hydrolyzates of 14, 22 and 32.6% trichloroacetic acid index (ITCA) and thermally treated wheat gluten (GTT), previously produced under defined conditions of pH, temperature and time of hydrolysis. The protein fractions were obtained solubilizing the samples at pH

4, 6.5 and 9, and then were lyophilized. The antioxidant activity (AO) was evaluated by $ABTS^{*+}$ radical scavenging method, which is based on radical decoloration by antioxidant peptides. The result was expressed as mmol Trolox /g of protein extract (TEAC).
Hydrolyzates extracts showed higher antioxidant activity than GTT extracts. The multifactor ANOVA showed significant differences with the degree of hydrolysis, and the sample of 14% ITCA was the most active. It was also noted that pH 4 extract from 22% ITCA sample showed an AO activity similar to the ones of the 14% sample. Although some pH extracts showed more activity than others, the multifactor ANOVA showed no significant effect of pH. However, for ITCA samples of 22 and 32.6%, pH 4 extracts showed higher activity than the other pHs. The AO, expressed in mM Trolox, increased with protein concentration, reaching saturation at 6 g / l. Also, taking into account the concentration of free amines, AO activity expressed in mM Trolox is saturated at 4.7 mEq / l serine. A mild hydrolysis allowed obtaining samples with good AO properties. However, if the hydrolysis goes on, the AO will decrease. The fractionation by pH did not allow to concentrate the activity in the sample with low hydrolysis degree (14%), but it was effective in the hydrolyzates with higher TCAI, where the pH 4 extracts showed the highest activities. The results show the presence of AO properties from peptides, which could be used as additives in food conservation. However, in vivo studies will be necessary to confirm its effectiveness as antioxidant to be used in functionally food.

PALABRAS CLAVE: *hidrolizados, gluten, capacidad antioxidante.*

KEYWORDS: *hydrolyzates, gluten, antioxidant capacity.*

INTRODUCCIÓN

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen actividades biológicas al liberarse por procesos de hidrólisis enzimática o química *in vitro*, digestivos o fermentativos. Son parcialmente resistentes a la hidrólisis y capaces de ejercer un efecto a nivel local en el tubo digestivo, o bien a distancia en el organismo, una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Fox *et al.* 1992, Tirelli *et al.*1997). Estos péptidos tienen varios tipos de efectos, entre los cuales cabe señalar: efectos en el sistema digestivo, antitrombóticos, antihipertensivos, inmunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes y opiáceos. Las cantidades de péptidos funcionales que se forman son reducidas, pero los resultados disponibles demuestran que basta un número pequeño de determinados péptidos para obtener los efectos correspondientes (Wolfschoon-Pombo *et al.* 1981). Por otra parte, pueden provenir tanto de proteínas de origen vegetal (proteínas de cereales, soja, etc.) como animal (proteínas de carne, pescado, leche, huevo, etc.).
El uso de los péptidos bioactivos no se limita sólo a los alimentos funcionales, sino que también pueden ser utilizados como aditivos en la conservación de alimentos, en productos de cosmética, etc. como lo es el caso de los péptidos antioxidantes.
La auto-oxidación de lípidos (especialmente los que contienen ácidos grasos poli-insaturados) puede ser inducida por luz, temperatura, oxigeno y otros factores, y resulta en un deterioro significativo de la calidad y acortamiento de la vida útil de productos alimenticios (Pukalskas *et al.* 2002, Wang *et al.* 2007). Con la oxidación, aparecen olores y sabores rancios, se altera el color y la textura y desciende el valor nutritivo, al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos poli-insaturados. Además, los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud. Es por esto que se convierte en la forma de deterioro de los alimentos más importante después de las alteraciones producidas por microorganismos (de la Coba Luque *et al.* 2007). Debido a su capacidad de detener o retardar procesos oxidativos, que pueden afectar la preservación de productos, los compuestos con actividad antioxidante tienen una gran aplicación en el campo de los alimentos, la industria, la medicina y la cosmética, entre otros (Aubad López *et al.* 2007). Son sustancias antioxidantes aquellas moléculas que a bajas concentraciones, respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen su oxidación. Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos: deteniendo la reacción en cadena de oxidación de los lípidos mediada por radicales libres; eliminando el oxígeno disuelto en el producto, o el presente en el espacio que queda sin llenar en los envases; complejando ciertos metales traza, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación. Los que actúan por los dos primeros mecanismos son los antioxidantes propiamente dichos, mientras que los que actúan de la

tercera forma se agrupan en la denominación de agentes quelantes (Calvo Rebollar *et al.* 1991). Los antioxidantes retrasan la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva (Yahuaca-Mendoza *et al.* 2001).
Recientemente, la demanda por antioxidantes naturales se ha incrementado debido a los cuestionamientos acerca de la seguridad a largo plazo y la percepción negativa por parte del consumidor a la utilización de antioxidantes sintéticos.
En este trabajo se utilizó como fuente de péptidos bioactivos hidrolizados de gluten de trigo. El gluten es una proteína que se encuentra en la semilla de muchos cereales, representando un 80% de las proteínas del trigo. Es uno de los componentes imprescindibles en la panificación, pues crea la red que retiene el dióxido de carbono resultante de la fermentación de la levadura, lo que permite que el pan crezca y tenga volumen (García Martín 2003). El gluten es un subproducto económicamente importante de la molienda del trigo, fácilmente aprovechable en gran cantidad y a bajo costo (Wang *et al.* 2007). Actualmente, es usado como mejorador en productos de panificación y en alimentos de mascotas. Los hidrolizados de proteínas pueden ser usados en sistemas de alimentos como aditivos, como mejoradores de textura o como ingredientes nutracéuticos (Zheng *et al.* 2006), por lo que la producción de hidrolizados de gluten con propiedades bio-funcionales permitiría incrementar su uso.
El objetivo de este trabajo fue obtener extractos de hidrolizados proteicos de gluten de trigo por medio de fraccionamientos por pH y evaluar la presencia de propiedades bioactivas antioxidantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizó gluten de trigo provisto por Molinos Semino S.A. Carcarañá - Santa Fe, siendo su composición en base seca: humedad: 5.95%, proteínas: 77.20% (factor de conversión proteína / N total = 5.7), almidón: 13.15%, lípidos: 0.71% y cenizas: 0.834%.
Gluten de trigo tratado térmicamente (GTT): el gluten vital fue tratado térmicamente según el protocolo de Drago *et al.* (2008).
Hidrolizados de gluten de trigo: se evaluaron hidrolizados de índices de tricloroacético (ITCA): 14%, 22% y 32.6%, previamente producidos en condiciones definidas de pH, temperatura y tiempo de hidrólisis (Drago *et al.* 2008). El ITCA se determinó midiendo el N soluble en ácido TCA al 20% y se calculó según:

$$\text{ITCA: } \frac{100 \times \text{N soluble TCA 20\%}}{\text{N total}}$$

Fraccionamiento por pH

Las fracciones proteicas fueron obtenidas por solubilización a pHs: 4, 6.5 y 9, según Drago y González (2001). Se prepararon soluciones al 2% (p/p) de los diferentes hidrolizados y de GGT. El pH se obtuvo por adición de HCl 0.4 mol/L o NaOH 0.1-3.0 mol/L. Las muestras fueron agitadas durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente centrifugadas por 15 min a 8000*xg* a temperatura ambiente. Los sobrenadantes (los extractos a cada pH) fueron liofilizados en un equipo Flexi-Dry™ MP FTS systems.
Las muestras liofilizadas fueron dispersadas en buffer fosfato (PBS) al 1%, centrifugadas y evaluadas con respecto a su concentración de proteínas, contenido de aminos libres y actividad antioxidante.

Determinación del contenido de proteínas y de aminos libres

La concentración de proteínas fue evaluada por el método de Lowry *et al.* (1951) usando como estándar albúmina bovina. Para determinar el contenido de aminos libres se utilizo la técnica o-phthaldialdehydo (OPA) descripta por Nielsen *et al.* (2001) usando como estándar L-serina.

Evaluación de actividad antioxidante (AO)

Se utilizó el método propuesto por Pukalskas *et al.* (2002), que utiliza el radical ABTS*+, para medios acuosos. Este ensayo se basa en la reducción del radical catión ABTS+• de color azul-verdoso, al Ácido 2,2´-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS, incoloro). El radical mono-catión es generado previamente con persulfato de potasio y su decoloración se produce en este caso, por acción de los péptidos antioxidantes. Se utilizó como estándar Trolox. Las determinaciones se realizaron a

734 nm, entre 0 y 6 min de agregado el radical. Se calculó el% de inhibición (%I) y el resultado se expresó como mmol Trolox/g proteína del extracto (TEAC).

Estudios Estadísticos

Se realizó el test de ANOVA (*Analysis Of Variance*) para determinar diferencias significativas entre muestras ($p<0,05$) y test de LSD (*Least Significant Difference*) para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Plus 5.1. El ANOVA multifactor se realizó para evaluar el efecto del grado de hidrólisis y del pH de extracción, en la actividad antioxidante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que las muestras (extractos liofilizados de los hidrolizados a los 3 pHs seleccionados: 4, 6,5 y 9) no se solubilizaron totalmente en el buffer PBS, para la determinación de la actividad antioxidante se preparó una dispersión en PBS, y a la fracción soluble se le determinó el contenido de aminos libres, de proteínas y la actividad antioxidante.

En la **Figura 1** se muestran los resultados de actividad antioxidante (AO) de los distintos extractos.

Los extractos de los hidrolizados presentaron mayor actividad AO que los extractos de GTT. El ANOVA multifactor (**Tabla 1**) mostró diferencias significativas con el grado de hidrólisis, siendo la muestra de ITCA de 14% la de mayor actividad. También se observó que el extracto de pH 4 de la muestra de ITCA de 22% presentó un valor de actividad AO, semejante a los extractos del hidrolizado de 14%.

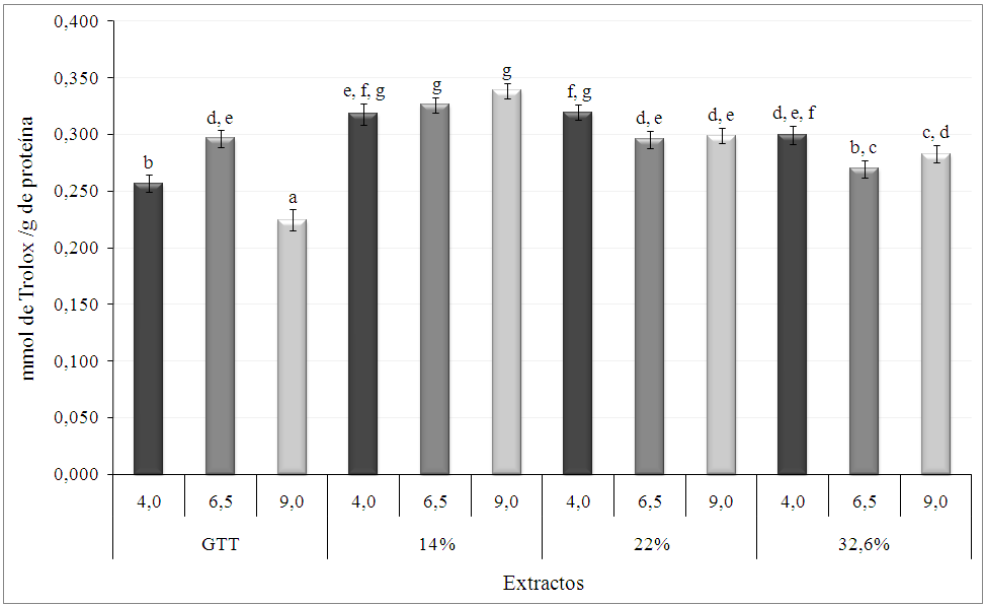


Figura 1: Actividad antioxidante de los extractos de los hidrolizados de ITCA: 14, 22 y 32,6% y del gluten sin hidrolizar tratado térmicamente (GTT). Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Tabla 1: ANOVA Multifactor para la actividad AO según grado de hidrólisis.

Grado de hidrólisis (ITCA)	**Actividad AO** (mmol de Trolox /g de proteína)	**Grupos homogéneos**
0	0,264	a
32,6	0,284	b
22	0,306	c
14	0,328	d

Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Si bien algunos extractos de pH presentaron más actividad que otros, el ANOVA multifactor no mostró un efecto significativo del pH. Sin embargo, para las muestras de mayor ITCA (22 y 32,6%), los extractos de pH 4 presentaron mayor actividad que a los otros pH.
Por otra parte, cuanto mayor fue el grado de hidrólisis mayor fue la solubilidad en PBS de los extractos liofilizados. Por este motivo, los resultados se expresaron considerando el contenido de proteínas de la dispersión en PBS.
Cuando se considera la actividad antioxidante en mM de Trolox, se puede observar que la misma aumenta con la concentración de proteínas, llegando a una saturación luego de los 6 g/l (**Figura 2**).

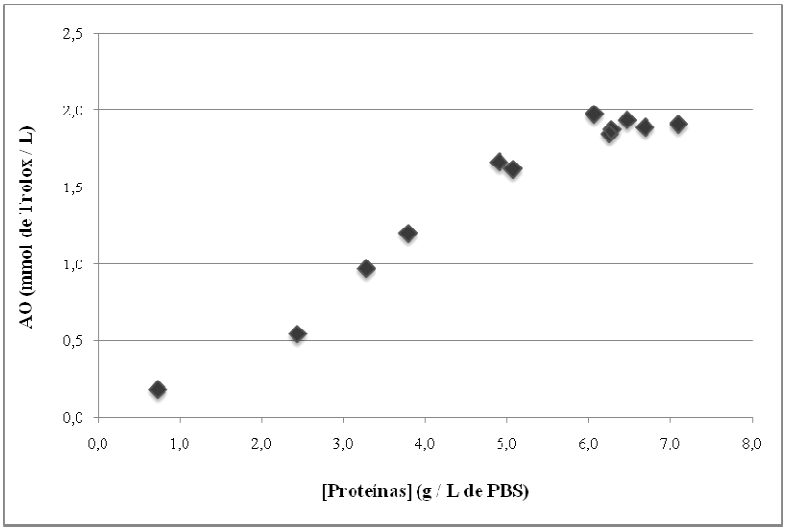


Figura 2: Actividad antioxidante expresada en mM de Trolox vs. Concentración de proteínas en buffer PBS.

La misma tendencia fue observada cuando se graficó la actividad antioxidante en función de la concentración de aminos libres, obteniéndose la saturación en 4,7 mEq/l de serina (**Figura 3**). Estos datos podrían servir para futuras determinaciones de la concentración de la IC50 (concentración que bloquea el 50% del radical).

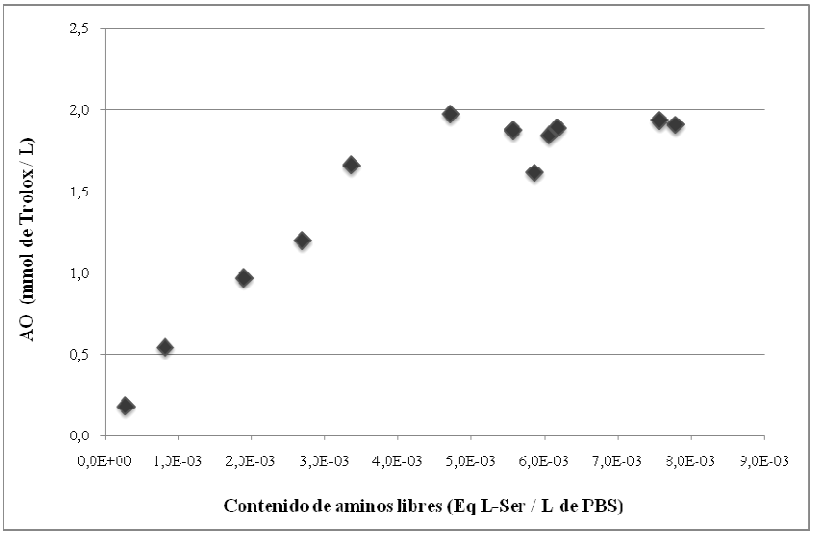


Figura 3: Actividad antioxidante expresada en mM de Trolox vs. Concentración de aminos libres en buffer PBS.

En la **Tabla 2** se muestra la solubilidad a los distintos pH de los hidrolizados (Drago *et al.* 2008). Debido a que la muestra de ITCA 14% tiene menor solubilidad que las otras muestras hidrolizadas, podría considerarse interesante como fuente de péptidos antioxidantes, el extracto de pH 4 de la muestra de ITCA 22%, ya que permitiría mayores rendimientos en lo que respecta a su producción.

Tabla 2: Solubilidad del gluten sin hidrolizar tratado térmicamente (GTT) y de los hidrolizados de ITCA (índice de tricloroacético): 14, 22 y 32,6%. (Drago *et al.* 2008).

Muestra	pH	Solubilidad
GTT	4,0	58,04 ± 0,41^{d}
	6,5	5,88 ± 0,13^{h}
	9,0	25,58 ± 0,88^{g}
ITCA14%	4,0	80,47 ± 0,28$^{a, b}$
	6,5	35,87 ± 0,06^{f}
	9,0	57,77 ± 0,37^{d}
ITCA 22%	4,0	81,01 ± 0,50^{a}
	6,5	53,74 ± 0,32^{e}
	9,0	73,88 ± 0,63^{c}
ITCA 32.6%	4,0	77,58 ± 0,16^{a,b}
	6,5	67,54 ± 0,59$^{b, c}$
	9,0	79,94 ± 0,06^{a}

Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

La hidrólisis enzimática permitió obtener productos hidrolizados que presentaron mayor actividad antioxidante que la proteína de origen.

Una hidrólisis suave permitió obtener muestras con buenas propiedades AO, sin embargo, si la hidrólisis continúa, las propiedades antioxidantes disminuyen

El fraccionamiento por pH no permitió concentrar la actividad en la muestra de bajo grado de hidrólisis (14%), pero fue efectiva en los hidrolizados de mayor ITCA, obteniéndose mayor actividad en las fracciones de pH 4.

Si bien el hidrolizado de ITCA 14% presentó mejores propiedades antioxidantes que el resto de los hidrolizados, el hidrolizado de ITCA 22% es más soluble en el rango de pH evaluado, por lo que sería más apropiado para la producción de péptidos bioactivos.

Estos ensayos ponen en evidencia propiedades antioxidantes de compuestos que podrían ser utilizados como aditivos en la conservación de alimentos. Sería necesario realizar estudios *in vivo* para confirmar su efectividad como antioxidantes a ser empleados en alimentos funcionales.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por CAID+D 2005-005-25 y CAI+D 2009 Tipo II PI -54-258.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aubad López P, Rojano BA, Lobo Echeverri T. 2007. Actividad antioxidante en musgos. Scientia Et Technica. XIII (033).

Calvo Rebollar M. 1991. Aditivos Alimentarios. Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud. Mira Editores, Zaragoza.

de la Coba Luque F, Aguilera Arjona J, López Figueroa F. 2007. Aminoácido tipo micosporina (asterine 330 + palythine) como antioxidante. World Intellectual Property Organization. WO/026037.

Drago SR, González RJ, Añon MC. 2008. Application of surface response methodology to optimize hydrolysis of wheat gluten and characterization of selected hydrolysate fractions. J Sci Food Agric. 88:1415-1422.

Drago SR, González RJ. 2001. Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 1:269-273.

Fox PF, Flynn A. 1992. Biological properties of milkprotein. In Advanced Dairy Chemistry. Ed. Fox P.F. London: Elsevier Applied Science. 1(Proteins):255-84.

García Martín M. 2003. La enfermedad celíaca hoy. Vox Paediatrica. 11(1):37-42.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1):265-75.

Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci. 66(5).

Pukalskas A, van Beek TA, Venskutonis RP, Linssen JP, van Veldhuizen A, de Groot A. 2002. Identification of radical scavengers in sweet grass (Hierochloe odorata). J Agric Food Chem. 50(10):2914-9.

Tirelli A, De Noni I, Resmini P. 1997. Bioactive peptides in milk products. Ital. J. Food Sci. 2, 91-8.

Wang JS, Zhao MM, Zhao QZ, Bao Y, Jiang YM. 2007. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. J Food Sci. 72(2):C103-7.

Wolfschoon-Pombo H, Klostermeyer H. 1981. Non-protein N fraction in cow's milk. I. Amount and composition. Milchwiss. 36:598-600.

Yahuaca-Mendoza P, Gutiérrez-Hernández R, Alvarado-Acosta JL. 2001. Actividad anti-lipoperoxidante de diversos compuestos antioxidantes. Su participación en el daño hepático. BIO/UMH-04/019.

Zheng XQ, Li LT, Liu XL, Wang XJ, Lin J, Li D. 2006. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. Appl Microbiol Biotechnol. 73(4):763-70.

Influencia del tipo de proteína empleado en la elaboración de una cobertura instantánea para salchichas

Influence of protein type on the development of instantaneous coating for sausages

Martínez Albino, N (1), Martínez Gutiérrez, R I (1), Ramírez Escobar, I A (1), Torres Robledo, K (1), López García, V (1), Muñoz Aguilar, P (1), Ramírez Ortiz, M E (1), Corzo Ríos, L J (2)

1. Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México.
2. Instituto Politécnico Nacional, UPIBI, Av. Acueducto s/n, Barrio La Laguna, Col. Ticomán,, México, D.F., México. lcorzo@ipn.mx

RESUMEN

Se evaluaron las propiedades funcionales de tres proteínas (albúmina de huevo, proteína aislada de soya y dos tipos diferentes de caseína) en el proceso de elaboración de una cobertura instantánea para salchichas. El proceso de elaboración consistió en mezclar todos los ingredientes en polvo, después incorporar los líquidos por medio de un batido y por último freír la masa obtenida. La determinación de las propiedades reológicas de la masa fueron realizadas en un viscosímetro Rheomat RM 180 y las propiedades texturales fueron evaluadas en un texturómetro Lloyd TA500 tanto para la masa como para la cobertura frita obteniéndose los siguientes resultados; en cuanto al comportamiento reológico se observó que las masas mostraron un comportamiento al flujo del tipo plástico en casi todos los casos, con una tendencia a incrementar la consistencia con el incremento de la concentración de proteína mientras que en el comportamiento textural la adhesividad de la masa fue influenciada significativamente por el cambio de concentración de las proteínas (P= 0.008) impartiendo en mayor medida esta propiedad la proteína aislada de soya. En cuanto a la dureza y la masticabilidad (P= 0.02 y 0.03 respectivamente) del producto frito se observó también que es la albúmina la que influye en mayor medida estos parámetros. Concluyendo que para obtener un producto instantáneo para cobertura de salchichas con características similares al producto tradicional; la proteína aislada de soya fue la que mejores rendimientos presentó y que impartió características idóneas al producto, además en concentraciones competitivas con la albúmina de huevo.

ABSTRACT

Functional properties of three proteins (White egg albumin, isolated soy protein and two types of casein) in the elaboration process of an instantaneous covering for sausages were evaluated. The elaboration process consisted on mixing all the powdered ingredients, later to incorporate the liquids by means of a milk shake and lastly to fry the obtained dough. The determination of the properties of dough was carried out in a viscosymeter Rheomat RM 180 and the textural properties were evaluated in a Texturometer Lloyd TA500 as much for the dough as for the fried covering being obtained the following results; as for rheological behavior dough showed a behavior to the flow of the plastic type in almost all the cases, with a tendency to increase the consistency with the protein increment while in the textural behavior dough adhesiveness was influenced significantly by the change of proteins concentration (P= 0.008) imparting in more measure this property the isolated soy protein to have an influence on these parameters. To obtain an instantaneous covering for sausages with similar characteristics to the traditional product; the isolated soy protein was the better yields presented and that showed suitable characteristics to the final product, and in competitive concentrations with egg albumin.

PALABRAS CLAVE: *Proteína aislada de soya, albumina de huevo, caseína, reología, textura.*

KEYWORDS: *Isolated soy protein, White egg albumen, casein, rheology, texture.*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los alimentos fritos gozan de una popularidad cada vez mayor en el mundo y son aceptados por personas de todas las edades. La preparación de estos productos fácil y rápida y su aspecto y sabor se corresponden con los deseados por el consumidor. Dentro de los diferentes tipos de coberturas para alimentos fritos se encuentran:

Empanizado: Los alimentos se envuelven en una capa de huevo y pan rallado que, al freír, resulta una cobertura crujiente y preserva la jugosidad del alimento.

Enharinado: Se recubren las porciones con una fina capa de harina, que enjuga el exceso de humedad e impide que los alimentos frágiles se rompan durante la fritura.

Rebozado: Consiste en envolver en harina y huevo un alimento antes de freír. La cobertura resulta dorada y suave, y el alimento jugoso.

Pastas para rebozar: Son preparaciones más o menos espesas, a base de harina, agua, claras, cerveza o levadura, en las que se sumergen los alimentos antes de freír y que, tras la fritura, se convierten en una cobertura esponjosa y dorada.

Esta última es comúnmente empleada en la elaboración de banderillas (salchichas cubiertas de masa posteriormente frita) en Estados Unidos se conocen como *corndogs*. En Canadá se les llaman *pogos*. Son conocidos igualmente en Australia como *dagwood dogs*. En Japón se conocen como *American hot dogs* o *American dogs*. En Europa son conocidos como *toasty dogs*.

El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades funcionales de tres proteínas en el proceso de elaboración de una cobertura instantánea para salchichas empleando albúmina de huevo, proteína aislada de soya y dos tipos diferentes de caseína.

La proteína de soya tiene como propiedades funcionales la gelificación, emulsificación, capacidad espumante, absorción y retención de agua, absorción de grasa, incremento de la viscosidad, solubilidad, elasticidad y cohesión-adhesión (Utsumi *et al.* 1997). Éstas son empleadas para la elaboración de muchos productos alimenticios. Muchas de estas propiedades están relacionadas directamente con la habilidad de la estructura molecular, en especial las propiedades reológicas que están implicadas en la textura que imparte la proteína (Utsumi *et al.* 1985).

La albúmina es la proteína más abundante dentro de la clara de huevo (58.5%) y es la responsable de la formación de espuma debido a la presencia de 4 grupos sulfhidrilo en su estructura que la hacen muy reactiva y fácilmente desnaturalizable. La forma más estable de la ovoalbúmina es la S-ovoalbúmina, mientras que la ovomucina actúa como agente estabilizador en una espuma y le confiere a la albúmina características espesantes. Los daños térmicos en las proteínas ocasionan una reducción en el espumado, sobre todo si se calienta a más de 60°C, pero la adición de ciertas sales y sacarosa las protege. (Charley 2005)

La caseína o caseínas, son un grupo de proteínas que constituyen aproximadamente el 80% del total de proteínas de la leche. Son proteínas fosforadas que entran dentro de la definición de globulinas, son solubles y poseen una gran capacidad de retención de agua. Las caseínas α, β y ϒ son muy sensibles a la alta concentración de los iones calcio propios de la leche, estas precipitarían si no se contara con la caseína κ que cumple una función protectora y estabilizadora. Contienen regiones cargadas que les permite unirse electroestáticamente y regiones fosoforiladas que facilitan sus interacciones con calcio. (Baduí 2006)

La funcionalidad de las proteínas está íntimamente ligada a su estructura, su punto isoeléctrico, su respuesta ante la presencia de sales y su interacción con otros ingredientes, y se refleja en las características de calidad del producto final (reológicas, texturales, de apariencia, olor y sabor) por ello es muy importante conocer cómo se desarrollan estas propiedades funcionales cuando se trata de sustituir un ingrediente en formulaciones que pueden ser mejoradas desde el punto de vista: nutricional, de rendimiento, de apariencia, de durabilidad y por supuesto de costo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la siguiente formulación para la preparación de la masa empleada como control: Leche 38% Harina de trigo 37%, Agua 16%, Albúmina nativa 6%, Polvo para hornear 2%, y Sal 1%.

Se variaron las concentraciones de albúmina nativa (9%, 6% y 3%) provista por Ovoplus del Centro (México), caseína líquida (54%, 38% y 19%) caseína en polvo (6%, 4%, y 2%) proporcionadas por Industrias Ragar, S.A. de C.V. (México) y proteína aislada de soya (4.5%, 3% y 1.5%) Supro-590 de

Química Aldich (México) Las cuales fueron agregadas a la masa control en las concentraciones antes mencionadas de acuerdo a un diseño factorial 2^3.
El proceso de elaboración consistió en mezclar todos los ingredientes en polvo, después incorporar los líquidos por medio de un batido durante tres minutos a velocidad media (Kitchen Aid Classic) y por último freír la masa obtenida a una temperatura de 120 *ºC* (± 5°C). En un molde elaborado especialmente para tal efecto de 30 mm de diámetro y 40 mm de altura.
El análisis de los resultados de las pruebas se llevó a cabo con Desing Expert V 5.0 con α=0.05.

Pruebas realizadas a la masa

Consistencia. Se realizó en un consistómetro de Bostwick, midiendo la distancia recorrida en 10 segundos a una temperatura de 24°C.
Prueba global de textura (TPA). Se realizó en un texturómetro TA 500, celda de carga de 10 N, velocidad de penetración de 1.7 mm/s, distancia de penetración de 7 mm, con una geometría de cilindro de1 in de diámetro. La muestra fue colocada en cajas petri de 50 mm de diámetro y 15 mm de altura. Los parámetros evaluados fueron la adhesividad y la cohesividad.
Comportamiento reológico. Se obtuvieron curvas de flujo en un viscosímetro Rheomat RM 180 empleando cilindros concéntricos**,** sistema de medición 33, con un intervalo de velocidades de cizalla de 50 a 1000 s^{-1}. Los datos obtenidos se probaron con diferentes modelos y con los valores de r^2 se decidió el modelo a que ajustaban.

Pruebas realizadas a la cobertura frita

Dureza. Realizada en un Dinamómetro digital Gauge (2.5 lb_f) en muestras con 30 mm de diámetro y 25 mm de altura, utilizando como dispositivo de prueba la punta de cono, penetrando 5 mm y tomando lectura de la fuerza de compresión ejercida por un tiempo de 10 segundos.
Prueba global de textura (TPA). Se realizó en un Texturómetro TA 500, celda de carga de 10 N, velocidad de penetración de 2.0 mm/s, distancia de penetración de 7 mm, con una geometría de cono de acrílico de 15°. Las dimensiones de la muestra de acuerdo al molde para freído fueron de 30 mm de diámetro y 25 mm de altura. Los parámetros que se evaluaron fueron; dureza y masticabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento reológico de la masa

En la **Figura 1** se muestran los resultados obtenidos del comportamiento reológico de la masa, como se puede observar mostraron un comportamiento al flujo de tipo plástico en casi todos los casos, con una tendencia a incrementar la consistencia con el incremento de la concentración de proteína.

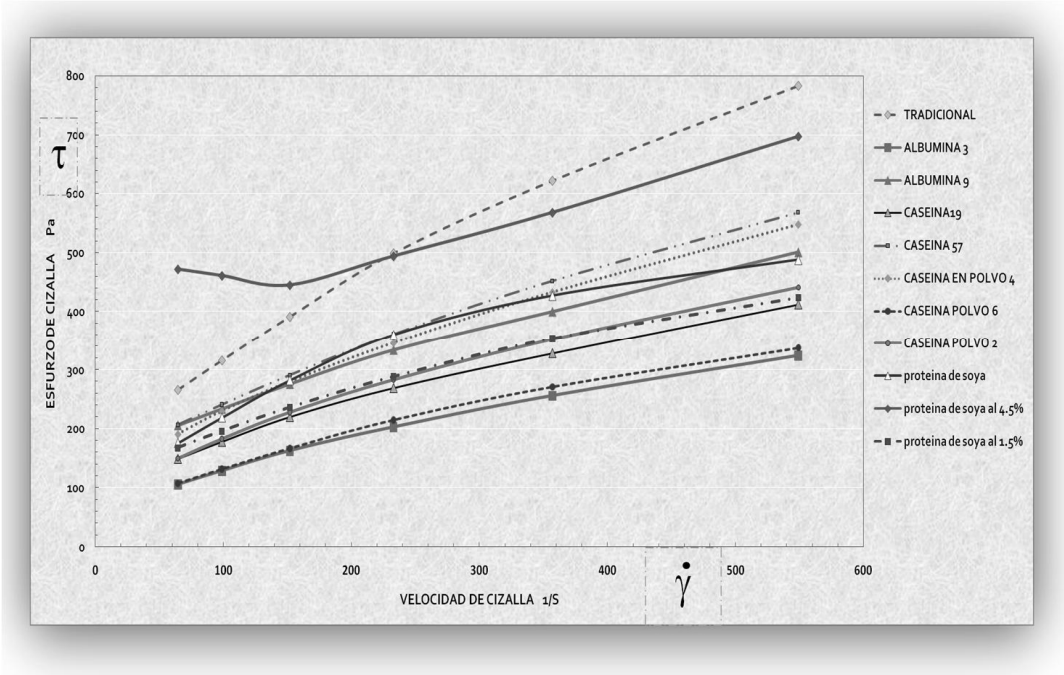


Figura 1. Curvas de flujo de la masa con diferentes proteínas y diferentes concentraciones

Las masas elaboradas con albúmina nativa y caseína tanto líquida como en polvo se ajustan al modelo de la potencia, mientras que las que contienen proteína aislada de soya presentan un comportamiento que se ajusta al modelo de Herschel Bulkley debido probablemente a que esta proteína es más soluble en pH ligerametne alcalinos y esto favorece la exposición de grupos hidrofílicos que absorben y retienen agua en mayor medida que las otras proteínas estudiadas (Ayala González *et al.* 2008) y por lo tanto una cobertura frita con mejores características texturales respecto a las otras dos proteínas.

Comportamiento textural de la masa

En cuanto al comportamiento textural de la masa, la **Figura 2** presenta los resultados obtenidos de la prueba de consistencia, en este caso se observó que las formulaciones con proteína de soya presentan mayor resistencia a fluir (consistencia); comparadas con las elaboradas con albúmina y caseína, siendo la concentración de proteína de soya al 1.5%, la que presenta consistencia similar a la masa control.

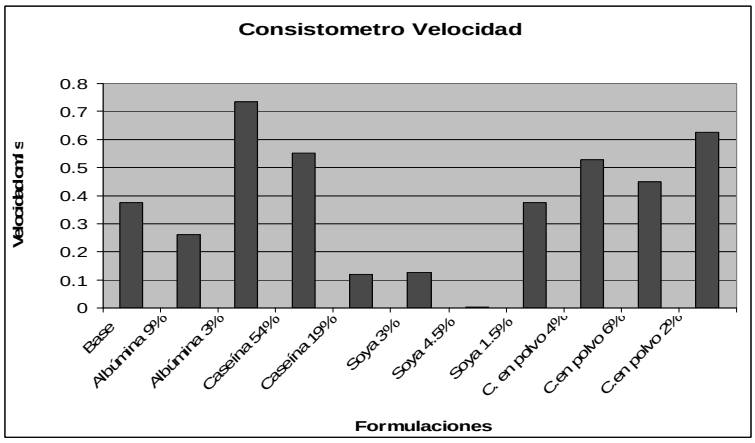
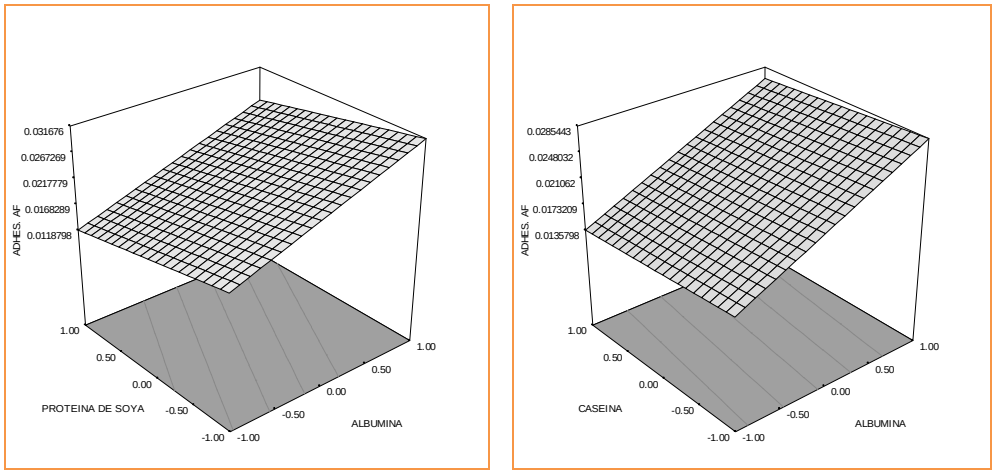


Figura 2. Consistencia de la masa a diferentes concentraciones de proteínas



(a) (b)

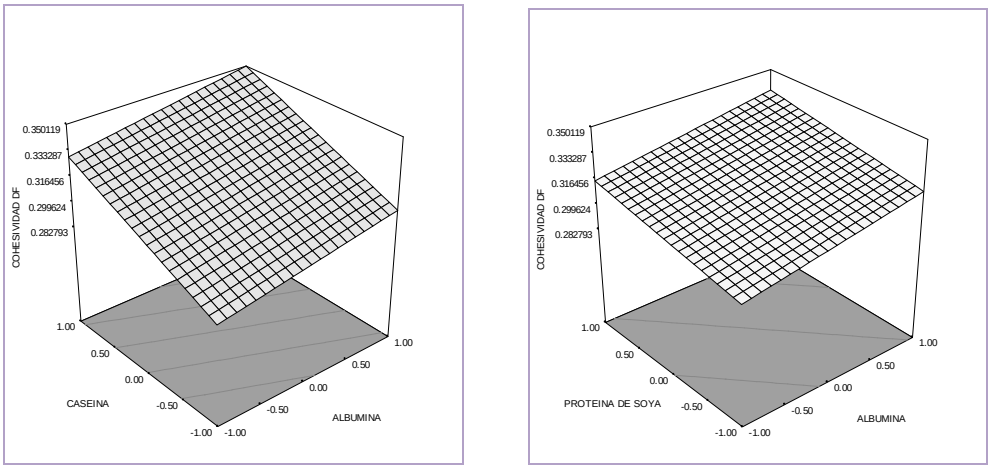
Figura 3. Variación de la adhesividad respecto a la concentración de: a) proteína de soya - albúmina y b) caseína – albúmina.

En la **Figuras 3(a)** y **3(b)** se muestra el efecto de la variación de la concentración de proteína de soya - albúmina, y caseína - albúmina respectivamente en la adhesividad de la masa, este parámetro indica el trabajo necesario para vencer las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de los otros materiales con los que el alimento entra en contacto. Se observa que al aumentar la concentración de proteína de soya, aumenta la adhesividad, mientras que los valores de caseína se mantienen casi constantes. En la **Tabla 1**, se corrobora que la proteína aislada de soya es quien imparte en mayor medida esta propiedad

Tabla 1. Valores de probabilidad calculada (P) y términos de la ecuación de predicción para Adhesividad (β)

Factores	**P**	**(β) Adhesividad (+0.022)**
A = Albúmina	10,0E-03	6,652E-03
B = Caseína	5,89E-03	-8,301E-04
C = Proteína aislada de soya	8,47E-03	-3,246E-03

Las **Figuras 4(a)** y **4(b)** presentan el efecto de la concentración de albúmina, caseína y proteína aislada de soya en la variación de la cohesividad de la masa, este parámetro sirve para conocer qué tanto puede deformarse un material antes de romperse.



(a) (b)

Figura 4. Variación de la cohesividad respecto a la concentración de: a) caseína - albúmina y b) proteína aislada de soya – albúmina.

En este caso los valores de cohesividad para la masa no varían significativamente al cambiar las concentraciones de las proteínas, como se muestra en la **Tabla 2**, de tal manera que al utilizar tanto albúmina, como caseína o proteína de soya, no presenta gran diferencia.

Tabla 2. Valores de probabilidad calculada (P) y términos de la ecuación de predicción para Cohesividad (β)

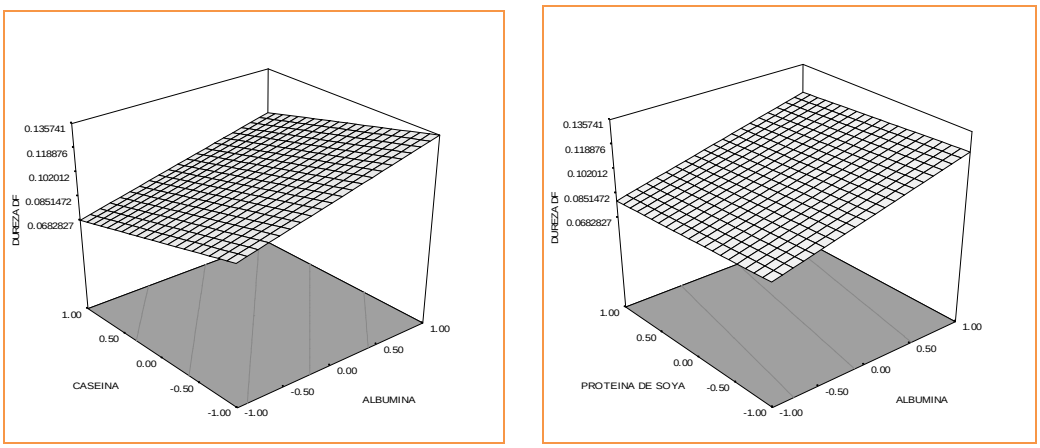
Factores	**P**	**(β) Cohesividad (+0.31)**
A = Albúmina	2,5E-02	1,0E-02
B = Caseína	4,1E-02	2,3E-02
C = Proteína aislada de soya	3,4E-02	9,49E-03

Estos resultados indican que los cambios en la estructura interna de la masa son ocasionados por la variación de la concentración de las proteínas y tienen como consecuencia influencia en el comportamiento textural de la cobertura frita.

Comportamiento textural de la cobertura

Los valores de dureza para la cobertura frita se encuentran en las **Figuras 5(a)** y **5(b)**, este parámetro sirve para conocer la fuerza que necesita un material para una deformación dada. En este caso el cambio en la concentración de las proteínas influye significativamente en los valores obtenidos de dureza, es decir, si se aumenta o se disminuye las concentraciones de éstas, la dureza de la cobertura frita cambiará su comportamiento; los datos estadísticos que apoyan esta afirmación se pueden observar en la **Tabla 3**.

La masticabilidad entendida como la energía requerida para masticar un alimento hasta que esté listo para ser deglutido, presentó diferencia significativa al cambiar la concentración y tipo de proteína, como se puede observar en las **Figuras 6(a)** y **6(b)** y en la **Tabla 4**.

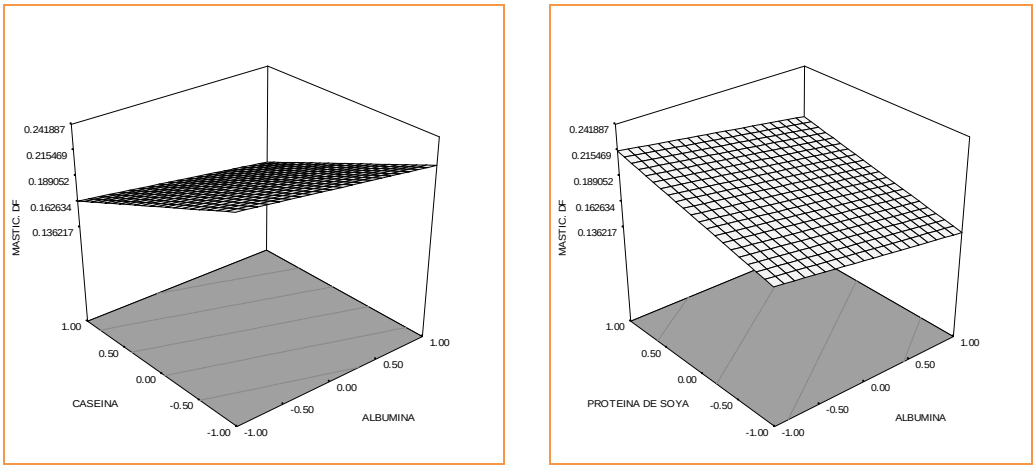


(a) (b)

Figura 5. Variación de la dureza respecto a la concentración de: a) caseína - albúmina y b) proteína aislada de soya – albúmina.

Tabla 3. Valores de probabilidad calculada (P) y términos de la ecuación de predicción para Dureza **(**β)

Factores	**P**	(β) **Dureza (+0.10)**
A = Albumina	3,5E-02	1,8E-02
B = Caseina	2,0E-02	-1,6E-02
C = Proteína aislada de soya	2,9E-02	-3,37E-03



(a) (b)

Figura 6. Variación de la masticabilidad respecto a la concentración de: a) caseína - albúmina y b) proteína aislada de soya – albúmina.

Tabla 4. Valores de probabilidad calculada (P) y términos de la ecuación de predicción para Masticabilidad **(**β)

Factores	**P**	(β) **Masticabilidad (+0.18)**
A = Albumina	3,6E-02	-1,4E-02
B = Caseina	4,9E-02	-3,9E-02
C = Proteína aislada de soya	3,4E-02	2,1E-02

CONCLUSIONES

En el comportamiento reológico las masas mostraron un comportamiento al flujo del tipo plástico en casi todos los casos, con una tendencia a incrementar la consistencia con el incremento de la concentración de proteína

En el comportamiento textural la adhesividad de la masa fue influenciada significativamente por el cambio de concentración de las proteínas impartiendo en mayor medida esta propiedad la proteína aislada de soya, sin embargo la albúmina es la que influye en mayor medida en el producto frito sobre la dureza y la masticabilidad (P= 0,035 y 0,036 respectivamente).
Para obtener un producto instantáneo para cobertura de salchichas con características similares al producto tradicional; la proteína aislada de soya es la que mejores rendimientos presentó y que impartió características idóneas al producto, además en concentraciones competitivas con la albúmina de huevo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió apoyo económico por parte de la Comisión de Fomento de Actividades Económicas (COFAA) del Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayala González GB, Barbosa Rodríguez EC, Jiménez Galicia M, Martínez Valles LA, Santana Pérez DE, Ramírez Ortiz ME y Romero Arreola V. 2008. Replacing Egg White Ovalbumin In Aerated Product. Memorias IN EXTENSO del 3er International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Queretaro, México pag.150-153.

Baduí S. 2006. Química de los alimentos. 4ª ed. México. Ed. Pearson. pag. 716

Charley H. 2005. Tecnología de los alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de los alimentos. 1ª ed. México. Ed. Limusa. pag. 767

Mohsenin NN. 1986. Physical Properties of Plant and Animal Materials. Londres.Gordon Breach Science Publishers. pag. 495.

Steffe JF. 1996. “Rheological Methods in Food Process Engineering”. 2a Edición. Londres. Freeman Press. pag 615.

Utsumi S y Kinsella JE. 1985. Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of /s, 11S and soy isolate proteins. J. Agric. Food Chem. 33: 297-303.

Zhang J, Mungara P, Jane J. 2001. Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. Polymer. 42: 2569-2578.

Pastas Elaboradas con Harina de Trigo Pan Sustituidas con Harina de Soja

Pasta Made from Wheat Bread Flour Fortified with Soy Flour

Martínez CS (1,2), Ribotta PD (2), León AE (2), Añón MC (3)

(1) Fundación YPF
(2) CONICET-Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
(3) CIDCA, Universidad Nacional de La Plata-CONICET
Laboratorio de Química Biológica. Av. Valparaíso s/n, Ciudad Universitaria. CC509.
cmartinez@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

La soja es una interesante alternativa para suplementar las pastas, debido no solo a su alto contenido proteico y su perfil aminoacídico complementario al trigo, sino también, porque aporta nutrientes con efectos beneficiosos para reducir riesgos de enfermedades coronarias y de algunos tipos de cáncer. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del agregado de harina de soja en la elaboración de pastas secas, laminadas, con la intención de obtener productos de mejor calidad nutricional y con una calidad tecnológica aceptable. Los materiales empleados fueron harina de trigo pan comercial (HTp) y harina de soja desgrasada, micronizada e inactivada (HSo). Se elaboraron pastas sustituidas con harina de soja en un 15%, 30%, 40% y 50% (S15, S30, S40 y S50, respectivamente), más una muestra control, elaborada sólo con harina de trigo (Co). Los ensayos realizados sobre las harinas fueron: humedad, cenizas, proteínas, fibra cruda, fibra dietaria y materia grasa. Para evaluar la calidad tecnológica de las pastas se determinó: tiempo óptimo de cocción (TOC), residuo de cocción, absorción de agua, índice de hinchamiento, color y textura. Para evaluar la calidad nutricional y funcional se midió proteínas, fibra dietaria e isoflavonas. La HSo presentó mayores valores de proteínas (45,5% vs. 12,2%) y de fibra dietaria (23,7% vs. 3,7%) que HTp. El agregado de HSo afectó los TOC, resultando mayor para S15 y menor para S40 y S50 respecto a Co, al tiempo que produjo mayores residuos de cocción para todas las muestras. Las pastas sustituidas con soja mostraron menores valores de L* y mayores valores de a* y de b* que Co. Mientras que la firmeza, la masticabilidad y la adhesividad aumentaron con los crecientes niveles de sustitución, la cohesividad, la elasticidad y la resilencia no mostraron mayores cambios. La adición de harina de soja no afectó demasiado la resistencia a la fractura de la pasta seca, incluso hasta un 30% de adición, se obtuvieron mayores valores que Co. Respecto a la calidad nutricional, los contenidos de proteínas y de fibra dietaria fueron significativamente mayores que Co para todos los niveles de sustitución. Además se logró un enriquecimiento con isoflavonas del tipo daidzin y genistin y de sus formas malonil, acetil y aglucona. En consecuencia, la adición de harina de soja mejoró la calidad nutricional de las pastas en relación a un mayor contenido de proteínas y fibra dietaria y le agregó propiedades funcionales a través de la incorporación de las isoflavonas. Si bien se observó un debilitamiento del retículo proteico responsable de la estructura de la pasta con la creciente incorporación de la harina de soja, probablemente la capacidad de gelificar de sus proteínas, atenuaron la disrupción de la red de gluten, resultando en pastas de calidad aceptable al menos hasta el 40% de sustitución.

ABSTRACT

Nutritionally enhanced pasta was prepared from bread wheat flour substituted at 15, 30, 40, and 50% with defatted, inactive, soy flour. This study examined the technological quality of the 2 mm wide and 15 cm long, laminated dry pasta, including cooking properties (cooking loss, water absorption, swelling index), texture of raw (fracturability) and cooked (firmness, stickiness, resilience, cohesiveness, springiness) pasta, and color. Protein, dietary fiber and isoflavones contents of cooked pasta were evaluated as a measure of nutritional and functional quality improvement. Whereas cooking loss values were significantly greater than control sample, Co, (entire bread wheat flour pasta), water absorption and swelling index values did not show many differences respect to Co. Lower L* and higher a* and b* color values, were observed in substituted pasta. Higher firmness, chewiness and stickiness values were found as substitution level increased, although cohesiveness,

springiness and resilience did not show major changes. Slight effect on fracture resistance on dry pasta due to soy flour addition was found, even more, higher values were found until 30% of substitution level. Furthermore, protein and dietary fiber values increased significantly in respect to Co and the enrichment of genistein and daidzein isoflavones families were attained. Consequently, soy flour addition improved nutritional quality of pasta and adds functional properties through isoflavones inclusion; even so, higher substitution levels negative affected technological pasta quality, since protein reticule, responsible for pasta structure, become weaker with soy flour substitution. Nevertheless, the ability of soy protein to form gels during heating, reduce the overall texture damage, thus, pastas with 40% of soy flour added, resulted with an acceptable technological quality, with significant enhancement of their nutritional and functional quality.

PALABRAS CLAVES: *pastas, harina de soja, proteínas, fibra dietaria, isoflavonas.*

KEYWORDS: *pasta, soy flour, protein, dietary fiber, isoflavones.*

INTRODUCCIÓN

Las pastas se caracterizan por ser productos de simple preparación, bajo precio, larga vida útil y rápida cocción (Park y Baik 2002). Sin embargo el contenido de proteínas de estos alimentos es pobre (<15%) y son relativamente deficientes en lisina, siendo éste un aminoácido esencial. Considerando que los panes y las pastas preparados a partir de granos relativamente pobres en proteínas, suelen constituir una parte importante de las dietas de poblaciones con deficiencias nutricionales, se han realizado numerosos estudios a fin de suplementar las pastas con proteínas ricas en lisinas como lo es la proteína de soja (Shogren *et al.* 2006).

La harina de soja, en base seca, contiene aproximadamente un 40% de proteínas y si bien es un valor promedio que puede variar según el genotipo y el medio ambiente, en cualquier caso, la soja tiene un contenido mucho más alto de proteínas que otros granos de leguminosas cuyo promedio es de entre 20 y 30% y que los cereales, cuyo contenido de proteínas está comprendido entre 8 y 15%. La proteína de soja es particularmente valiosa debido a que su composición de aminoácidos complementa la de los cereales, si bien es limitante en aminoácidos azufrados, cistina y metionina, contiene suficiente lisina para superar la deficiencia de este aminoácido de los cereales. Además, la harina de soja es una interesante alternativa por su bajo costo y su alta disponibilidad.

Asimismo, son reconocidos los efectos beneficiosos sobre la salud de la harina de soja, relacionados a reducir riesgos de enfermedades coronarias y de algunos tipos de cáncer. (Shogren *et al.* 2006, Dillard y German 2000). La soja es una fuente de isoflavonas incluyendo genisteina y daidzeina. Las isoflavonas de soja han recibido especial atención desde que se descubrió que podían unirse a receptores del tipo estrogénicos, por los que se les ha dado en llamar fitoestrógenos. La estructura química de la isoflavonas y de los estrógenos mamarios 17 β-estradiol, comparten características similares, específicamente debido a la presencia de un anillo fenólico. Se ha sugerido que las isoflavonas derivadas de la soja pueden ciertamente actuar como moduladores del receptor selectivo de los estrógenos de forma natural (Harland 2001). Además, han sido reconocidas como compuestos con propiedades preventivas y terapéuticas de enfermedades cardiovasculares (Rimbach *et al.* 2008), de cáncer de mama (Steiner *et al.* 2007), de cáncer de próstata (Nagata *et al.* 2007), de cáncer de colon (MacDonald *et al.* 2005) y de la osteoporosis. En 1999 la FDA autorizó una alegación de salud (*health claim*) para la rotulación de alimentos que contengan proteínas de soja, referida al rol de estas proteínas en la reducción del riesgo de enfermedades coronarias (FDA *Talk Paper* 1999).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la incorporación de harina de soja en la elaboración de pastas, elaboradas a partir de harina de trigo, con la intención de obtener productos de mejor calidad nutricional y con una calidad tecnológica aceptable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias Primas

Los materiales empleados fueron harina de trigo pan, (Molino Tiranti campaña 2007, Argentina) y harina de soja desgrasada, micronizada (100 μm) e inactivada (Complementos Proteicos SA, Argentina).

Preparación de las Pastas

Muestras: las muestras fueron preparadas a partir de la sustitución de la harina de trigo por harina de soja en un 15%, 30%, 40% y 50%, resultando S15, S30, S40 y S50 respectivamente. Además se preparó una muestra solo con harina de trigo, a la que se consideró como muestra control (Co). Tanto para cada nivel de sustitución como para la muestra control se elaboraron tres lotes diferentes.

Formulación: las pastas fueron preparadas a partir de 50 g de la mezcla de las harinas con agua en cantidad óptima, determinada experimentalmente, a la que se le agregaron 500 mg de NaCl.

Preparación: sobre los ingredientes secos tamizados (harina de trigo y mezcla de harina de trigo y harina de soja), se agregó el agua con la sal e inmediatamente se amasó con una amasadora manual Philips 190W HR 1495, máxima velocidad, durante 3 minutos. Se tomó la masa con las manos, conformando un bollo, al que se dejó descansar 13 min. Para el laminado se utilizó una laminadora de pastas Pastalinda® (Argentina), 20 cm de ancho de lámina, con apertura regulable de los rodillos del 1 al 9, de mayor a menor grado. Antes de comenzar el laminado, se estiró el bollo con un palote y se pasó por la laminadora en el punto nº 1, se plegó por la mitad y se volvió a pasar por el nº1, repitiendo esta operación seis veces y de igual modo se fue reduciendo el espesor de la lámina a través de los puntos nº2, nº3, nº4, nº5, nº6, nº7 y nº8. Para finalizar el laminado se pasó una vez más por el punto nº8, sin hacer ningún doblez previo. Los fideos se cortaron de ≈ 2 mm de espesor e inmediatamente se colgaron en un secadero diseñado para tal fin.

Secado: las pastas fueron secadas hasta 10 ± 1% de humedad, por medio de dos ciclos; primero un presecado a 30 °C, durante 30 min, con una humedad relativa ambiente, HR, entre 30 y 40%, seguido de un ciclo de secado a 30 °C, durante 17 h, con una HR: 65% (**Figura 1**)

Figura 1. Pastas secas sustituidas con harina de soja

Cocción: para la cocción se utilizó agua destilada a ebullición, en una relación mínima de una parte de pasta en diez partes de agua. Las pastas se cocinaron hasta alcanzar sus TOC, luego se retiraron, se enjuagaron con 50 mL de agua destilada y dejaron escurrir durante 40 s antes de ser analizadas.

Métodos de ensayo

Evaluación de la Calidad Tecnológica

Humedad de las harinas: el contenido de humedad se determinó de acuerdo a AACC 44-19 (AACC 1995), 2 g de harina, secados en estufa a 130 *ºC*, 2,5 h a presión normal.

Proteínas: el contenido de nitrógeno en las harinas se determinó de acuerdo a AACC 46-13 (AACC 1995), realizando una mineralización de 100 mg de harina con H_2SO_4 a 400 *ºC*; destilando el amonio resultante por medio de un destilador Velp UDK 126, recogiendo el NH_3 en exceso de ácido bórico y valorando por retroceso con HCl. Los porcentajes de proteína total se calcularon como N x 5,7 (trigo) ó N x 6,25 (soja).

Cenizas: el contenido de cenizas se determinó de acuerdo a AACC 08-01 (AACC 1995) por diferencia, calcinando 2 g de harina a 550 *ºC*, mufla Indef®, Argentina, durante 8 horas.

Fibra Cruda: se determinó de acuerdo a AACC 32-10 (AACC 1995), por medio de una digestión ácida (H_2SO4 1,25%) seguida de una digestión alcalina (NaOH 1,25%).

Materia Grasa: se determinó de acuerdo AACC 30-26 *Crude Fat in Soy Flour* (AACC 1995), por medio de una extracción con hexano durante 8 horas.
Humedad de los fideos secos: de acuerdo a AOAC 926.07 B (AOAC 1998), 2 -3 g de fideos secos, se colocaron en una cápsula de Petri previamente secada y tarada, a 130 *ºC*, 2,5 h a presión normal.
Tiempo Óptimo de Cocción (TOC): el tiempo óptimo de cocción se determinó de acuerdo a AACC 16-50 *Cooking Time* (AACC 1995). La muestra se colocó en agua destilada a ebullición, a partir de la cual se tomaron sucesivas porciones, cada 1 minuto, a las que se les observó la desaparición del centro blanco al realizarle una ligera presión entre dos portaobjetos.
Residuo de Cocción: el residuo de cocción se determinó de acuerdo a AACC 16-50 *Cooking Loss* (AACC 1995), sobre 4 g de muestra colocados en 150 mL de agua destilada a ebullición, hasta su TOC. El agua de cocción se evaporó a 100 *ºC* hasta peso constante, expresando los sólidos como*%* p/p de muestra.
Absorción de Agua: cinco gramos de muestra, cortada en segmentos de 5 cm de longitud, se cocinaron hasta su TOC en 200 mL de agua destilada a ebullición, se enjuagaron con 50 mL de agua destilada, se escurrieron durante 40 s y se colocaron en un envase de cierre hermético previamente tarado hasta alcanzar temperatura ambiente. Se tomó entonces el peso de la pasta escurrida y se calculó la absorción de agua de acuerdo a Dick y Young (1988), como [Peso de la muestra cocida/ peso de muestra cruda].
Índice de Hinchamiento *(Swelling Index)*: el índice de hinchamiento se determinó de acuerdo a Tudoricâ *et al.* (2002), de manera semejante a la absorción de agua pero calculado como: [(Peso de la pasta cocida-peso de muestra cocida secada) / (peso de muestra cocida secada)].
Análisis de Textura: se realizó con un texturómetro TA-XT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems), equipado con una celda de carga de 25 kg y software Texture Expert 1.22. Se realizó un TPA (dos ciclos de 70% de deformación); a partir del cual se calcularon los siguientes parámetros: firmeza, adhesividad, cohesividad, elasticidad, masticabilidad *(chewiness)* y resiliencia. Para ello se empleó la sonda HDP/PFS Pasta Firmness /Stickiness Rig; modo de ensayo: medida de fuerza de compresión, repite 2 veces; distancia: 70%; velocidad pre-ensayo: 1,0 mm/s, velocidad de ensayo: 0,50 mm/s, velocidad post-ensayo: 2,0 mm/s, trigger: 20 g. Tres segmentos de 5 cm de fideo laminado se cocinaron hasta su TOC, y se les eliminó el excedente de agua de su superficie con un papel absorbente. La muestra se colocó sobre la base del texturómetro, perpendicular a la sonda. Se realizaron 5 mediciones para cada uno de los tres lotes elaborados, para cada nivel de sustitución (15 mediciones por nivel de sustitución).
Determinación de Color de la Pasta Cocida: el color de los fideos se determinó de acuerdo a la técnica AACC 14-22 (AACC 1995) con un espectrofotómetro de reflectancia Minolta 508d de 8 mm de apertura (Ramsey, NJ), sobre 4 segmentos de fideos cocidos, colocados en paralelo, cubiertos con un vidrio de baja reflectancia. Las mediciones se realizaron en tres puntos diferentes (ubicando el espectrofotómetro en tres zonas diferentes de la superficie de los fideos a medir), repitiendo este procedimiento tres veces por lote, por nivel de sustitución (27 mediciones por nivel de sustitución). Las condiciones de medición empleadas fueron: ángulo del observador 10º, iluminante D65, componente especular incluido y se utilizó la escala CIE-Lab (L*: luminosidad, a*: rojo-verde y b*: amarillo – azul).

Evaluación de la Calidad Nutricional y de Compuestos con Propiedades Funcionales

Proteínas: el contenido de proteínas de las pastas se determinó de acuerdo a AACC 46-13 (AACC 1995), sobre las muestras cocidas, secadas y molidas, calculando el porcentaje de proteínas como N x 6,25
Fibra Dietaria Total: de acuerdo AACC 32-05 (AACC 1995), se determinó sobre las pastas cocidas, secadas y molidas: Se consideró fibra dietaria al residuo obtenido luego de someter un gramo de muestra seca y desgrasada, a sucesivas digestiones enzimáticas (una α-amilasa termoestable, una proteasa y finalmente una amiloglucosidasa).
Determinación de Isoflavonas: se realizó sobre 50-60 mg de pastas cocidas, secas y molidas una extracción hidro-alcohólica (etanol absoluto: agua, 60:40), durante 2 horas, seguida de dos etapas de centrifugación de 10 min a 13.000 rpm. El sobrenadante resultante se analizó por HPLC, empleando para ello una columna C8 Sephasil Peptide, 12µ, ST 4,6/250, Pharmacia Biotech® y un gradiente no lineal generado con una fase móvil A: agua milli Q con ácido acético 0,1% y fase móvil B: agua con

ácido acético 0,1%: acetonitrilo, 50:50. Las isoflavonas determinadas fueron daidzina, malonil-daidzina, daidzeina, genistina, malonil-genistina, acetil genistina y genisteína.

Análisis Estadístico

Los ensayos fueron realizados al menos por duplicado y los resultados han sido expresados como la media de los replicados ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el software InfoStat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las herramientas estadísticas empleadas fueron ANOVA y comparación de LSD Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la Calidad Tecnológica

Composición de las harinas utilizadas: la harina de soja presentó mayores valores de proteínas, cenizas, fibra cruda y fibra dietaria que la harina de trigo pan (**Tabla 1**). En base al bajo contenido de hidratos de carbono que presenta la harina de soja, y que de éstos, aproximadamente el 50% corresponde a fibra dietaria, se puede considerar que el principal aporte que realiza esta harina es de proteínas, ya que la cantidad de almidón que puede sumar al sistema no sería significativa.

Tabla 1. Composición de las harinas utilizadas (%, bs[1]).

Harina	Proteínas	Cenizas	Materia Grasa	Hidratos de Carbono[2]	Fibra Cruda	Fibra Dietaria
Trigo pan	12,2 ± 0,1	0,76 ± 0,03	0,9 ± 0,2	86,1 ± 0,3	0,3 ± 0,0	3,7 ± 0,1
Soja	45,5 ± 0,6	7,00 ± 0,00	0,7 ± 0,0	47,0 ± 0,4	4,3 ± 0,1	23,7 ± 0,3
[1]bs: base seca; [2]Hidratos de Carbono= 100-(Proteínas + Cenizas + Materia Grasa)						

Tabla 2. Comportamiento de las pastas durante la cocción.

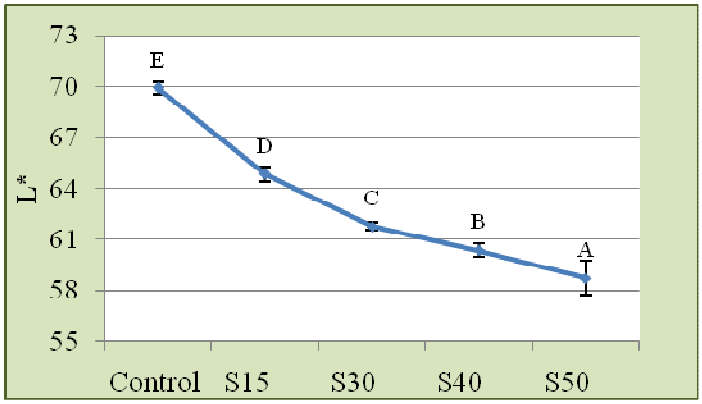
Muestras	TOC, min	Residuo de Cocción,%	Absorción de Agua,%	Índice de Hinchamiento
Co	8 ± 1 **b**	6,1 ± 0,1 **a**	2,9 ± 0,1 **bc**	2,1 ± 0,1 **a**
S15	9 ± 1 **c**	8,4 ± 0,4 **b**	2,9 ± 0,1 **bc**	2,2 ± 0,0 **a**
S30	8 ± 0 **b**	10,4 ± 0,4 **c**	2,8 ± 0,0 **b**	2,2 ± 0,0 **a**
S40	7 ± 0 **a**	11,7 ± 0,4 **d**	2,7 ± 0,1 **a**	2,2 ± 0,1 **a**
S50	7 ± 0 **a**	14,0 ± 0,2 **e**	3,0 ± 0,0 **c**	2,6 ± 0,0 **b**

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Comportamiento durante la cocción: en la **Tabla 2** se muestran el TOC, el residuo de cocción, la absorción de agua y el índice de hinchamiento de las muestras. El agregado de harina de soja tuvo un efecto significativo sobre los TOC de las pastas sustituidas respecto a Co, resultando necesario 1 min más para S15 y 1 min menos para S40 y S50. Además, los valores de residuo de cocción fueron afectados significativamente, resultando mayores al de la muestra control para todos los porcentajes de sustitución y superando el límite sugerido por Dick y Youngs (1988) de 7-8%. La determinación de absorción de agua mostró sólo diferencias significativas para las muestras S40 y S50, aunque en todos los casos los resultados estuvieron acorde a Dick y Youngs (1988), quienes sugieren un valor cercano a 3. Con respecto al índice de hinchamiento, solo S50 mostró un valor mayor al resto de las muestras, resultado que acompaña a la mayor absorción de agua encontrada para esta muestra. A partir de los datos obtenidos, se puede estimar que a medida que el gluten proveniente de la harina de trigo se va "diluyendo" por la sustitución con la harina de soja, el retículo proteico se vuelve más débil, facilitando una mayor difusión del agua hacia el interior de la pasta, disminuyendo los tiempos óptimos y aumentando el residuo de cocción.

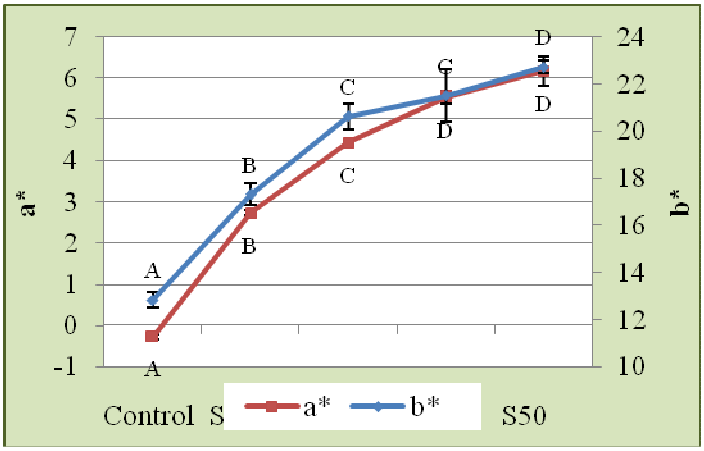
Color de las pastas cocidas: el color más oscuro de la harina de soja respecto a la harina de trigo, afectó el color de las pastas obtenidas, siendo éste más acentuado en los niveles más altos de sustitución; sin embargo, la apariencia de la pastas resultó poco afectada (**Figura 2**). A partir de los valores de reflectancia medidos en las pastas cocidas, se pudo observar que el agregado de la harina de soja disminuyó el valor L* y aumentó los valores a* y b* (**Figura 3 y Figura 4**).

Figura 2. Pastas cocidas sustituidas con harina de soja.



Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Figura 3. Color de las pastas cocidas sustituidas con harina de soja, L*



Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Figura 4. Color de las pastas cocidas sustituidas con harina de soja, a* y b*

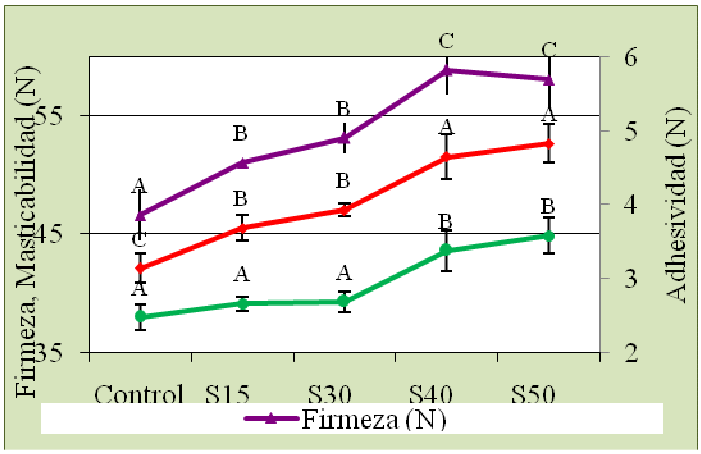
En la **Tabla 3** se muestran las diferencias de color encontradas en las pastas sustituidas, respecto de la muestra control, en términos de ΔL*, Δa*, Δb*, y ΔE, calculado como $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$. A partir de los resultados obtenidos se puede observar que a medida que aumentan los porcentajes de sustitución con harina de soja, la pasta pierde claridad, se vuelve más rojiza y más amarillenta. Además, a partir los valores ΔE obtenidos, utilizando la escala de National Bureau Standard, se calificaron las diferencias obtenidas, con lo cual S30, S40 y S50 quedaron comprendidas dentro del rango máximo de la escala.

Tabla 3. Diferencias de color observadas en las pastas cocidas.

Muestras	**L***	**ΔL***	**a***	**Δa***	**b***	**Δb***	**ΔE***	**NBS, ΔE[1]**
Control	70,0	---	-0,2	---	12,9	---	---	---
S15	64,9	**-5,1**	2,7	**2,9**	17,3	**4,4**	**7,3**	Much
S30	61,7	**-8,3**	4,5	**4,7**	20,8	**7,9**	**12,3**	Very Much
S40	60,4	**-9,6**	5,5	**5,7**	21,5	**8,6**	**14,1**	Very Much
S50	58,7	**-11,2**	6,2	**6,4**	22,9	**10,0**	**16,4**	Very Much

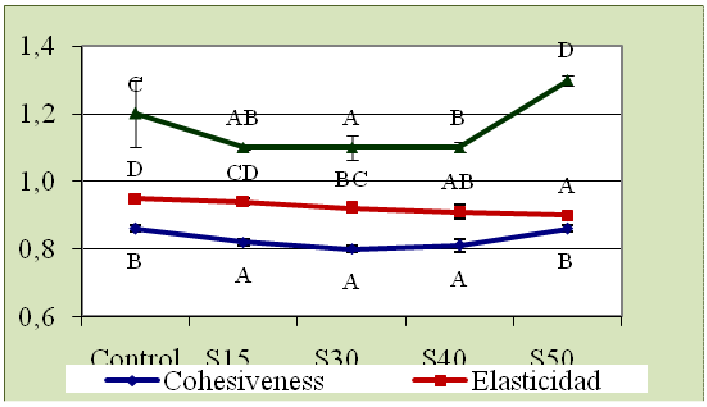
NBS, ΔE[1]: Trace: 0-0,5; Slight: 0,5-1,5; Noticeable: 1,5-3,0; Appreciable: 3,0-6,0; Much: 6,0-12,0; Very Much: >12

Textura de las pastas cocidas: los valores obtenidos para firmeza y masticabilidad de las pastas con harina de soja aumentaron con los crecientes porcentajes de sustitución (**Figura 5**). La firmeza de S15 yde S30 resultaron significativamente mayores a Co, en tanto que S40 y S50 resultaron aún mayores a S15 y S30; valores coincidentes con Shogren *et al.* (2006), donde se afirma que las pastas adicionadas con harina de soja muestran mayor firmeza que la pasta control. Respecto a la adhesividad, se encontraron valores significativamente mayores, con los crecientes niveles de sustitución, a partir de S15 (**Figura 5**). Los resultados de cohesividad, resiliencia y elasticidad no mostraron una tendencia clara para los diferentes porcentajes de sustitución (**Figura 6**). Los valores de resiliencia y cohesividad diferenciaron las muestras Co y S50 del resto de las pastas, mientras que la elasticidad de S50 fue significativamente menor. Si bien la adición de harina de soja debilita la estructura de la pasta, probablemente la capacidad de gelificar de sus proteínas atenúe la disrupción de la red de gluten, pudiendo explicar así los mayores valores de firmeza encontrados para estas pastas.



Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Figura 5. Firmeza, masticabilidad y adhesividad de las pastas cocidas.



Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Figura 6. Cohesividad, elasticidad y resilencia de las pastas cocidas.

Textura de la pasta cruda seca: la textura de la pasta cruda se evaluó en términos de fracturabilidad; parámetro que indica la resistencia de la pasta a fracturarse por ejemplo, durante una operación de envasado. Para ello se empleó una sonda de tres puntos (**Figura 7**) y se midió la fuerza necesaria para quebrar un segmento de fideo, de modo que, a mayor fuerza medida, menor tendencia a fracturarse. La **Figura 8** muestra el perfil de fracturabilidad obtenido para las pastas sustituidas con harina de soja. Se puede observar que la incorporación de harina de soja no afectó demasiado la resistencia a la fractura, incluso hasta un 30% de sustitución, se verificó un aumentó respeto a Co. Recién a partir del 40% de sustitución, los valores de fuerza medidos fueron menores que la muestra control.

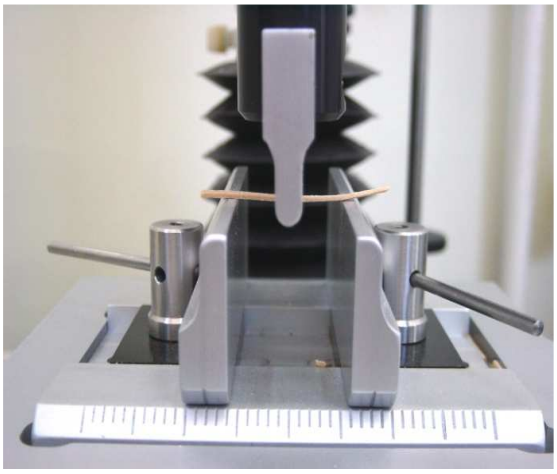
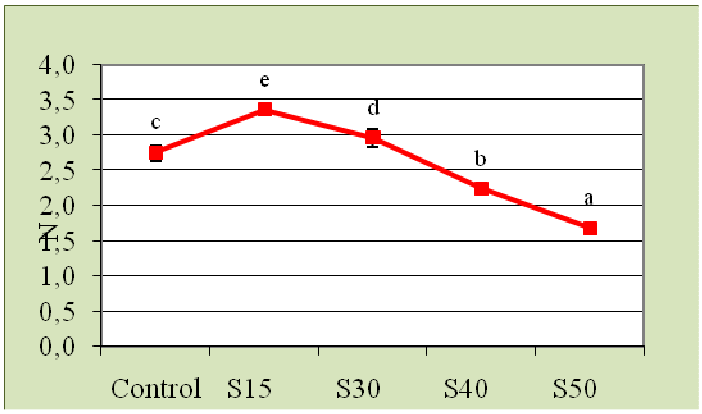


Figura 7. Sonda *HDP/3PB Three Point Bend Rig* usada para medir la fracturabilidad de la pasta seca.



Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Figura 8. Fracturabilidad de las pastas secas sustituidas con harina de soja

Evaluación de la Calidad Nutricional y de Compuestos con Propiedades Funcionales

Determinación del contenido de proteínas y fibra dietaria total: las muestras sustituidas con harina de soja mostraron valores significativamente mayores de proteínas que la muestra control; resultado acorde al mayor contenido de proteínas de esta harina respecto a la harina de trigo pan (**Tabla 4**). En relación a la fibra dietaria, también se obtuvieron valores significativamente mayores al de la muestra control para todos los niveles de sustitución (**Tabla 4**).

Tabla 4. Proteínas y Fibra Dietaria en la Pasta Cocida (%).

Muestras	Proteínas	Fibra Dietaria
Co	4,3 ± 0,0 **a**	1,4 ± 0,0 **a**
S15	6,0 ± 0,1 **b**	2,2 ± 0,1 **b**
S30	7,7 ± 0,1 **c**	3,2 ± 0,1 **c**
S40	8,9 ± 0,0 **d**	3,9 ± 0,1 **d**
S50	9,3 ± 0,1 **e**	4,0 ± 0,0 **e**
Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)		

Determinación de Isoflavonas: la **Figura 9** muestra el perfil cromatográfico obtenido para una muestra sustituida con harina de soja, pudiendo identificarse, de acuerdo al orden de elución: malonil-daidzina, daidzina, genistina, malonil genistina, daidzeína, acetil genistina y genisteína.

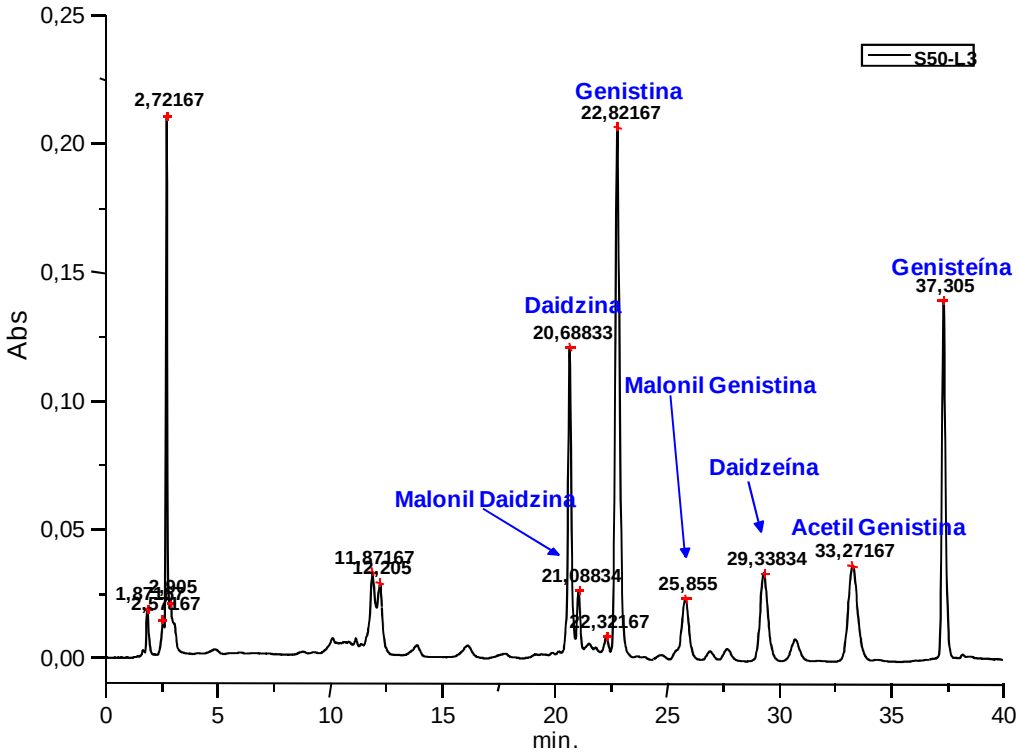
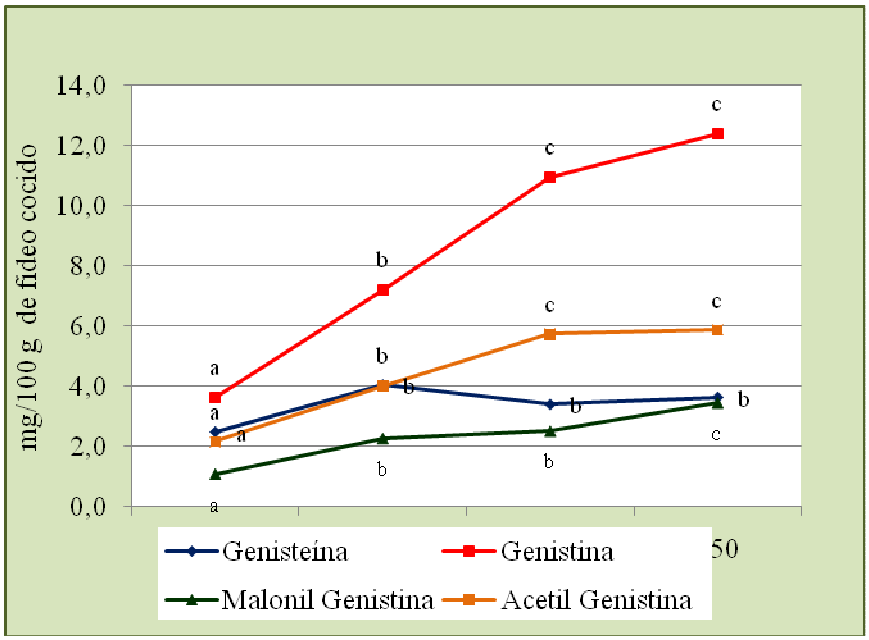


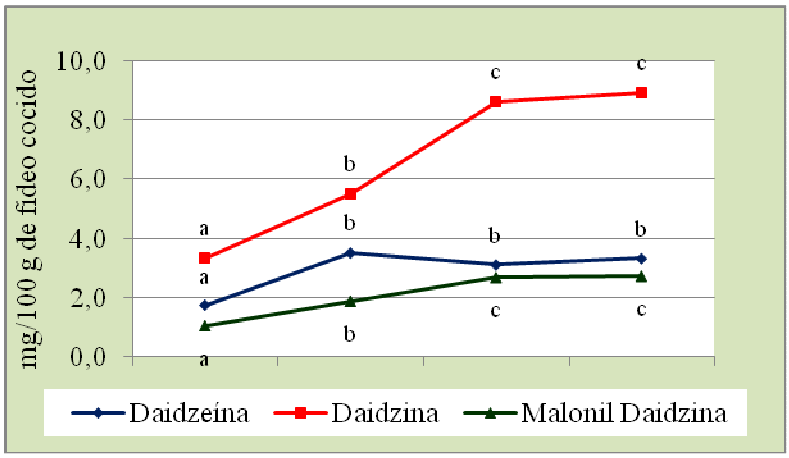
Figura 9. Perfil de isoflavonas encontrado en una muestra sustituida con 50% de harina de soja.

Las isoflavonas aportadas por la harina de soja se muestran en las **Figura 10** y **Figura 11**. Tanto las isoflavonas pertenecientes a la serie genisteína como daidzeína, en general, aumentaron conforme aumentaron los niveles de sustitución. Sin embargo, S40 y S50 no siempre mostraron un mayor enriquecimiento de isoflavonas a pesar de la mayor cantidad de harina de soja agregada. Considerando el debilitamiento de la estructura de la pasta observada para las muestras con altos niveles de adición, es esperable que parte de la muestra quede en el agua de cocción incluyendo las isoflavonas agregadas.



Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Figura 10. Serie Genisteína.



Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Figura 11. Serie Daidzeína.

CONCLUSIONES

La adición de harina de soja mejoró la calidad nutricional de las pastas en relación a un mayor contenido de proteínas y de fibra dietaria y le agregó propiedades funcionales a través de la incorporación de las isoflavonas. Si bien se observó un debilitamiento del retículo proteico responsable de la estructura de la pasta con la creciente incorporación de la harina de soja, probablemente la capacidad de gelificar de sus proteínas, atenuaron los efectos de la disrupción de la red de gluten, resultando en pastas de calidad aceptable al menos hasta el 40% de sustitución.

AGRADECIMIENTOS:

Se agradece a la Fundación YPF, a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) a través del proyecto FONCYT PICT 2005-33882 y a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNC por el apoyo económico para el desarrollo de este trabajo. También se agradece al Dr. Francisco Speroni y al Lic. Aldo Campana del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos de La Plata (CIDCA), por la ayuda recibida para la determinación de las isoflavonas por HPLC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC, American Association of Cereal Chemistry. 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th Ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International 1998. 16th edition, 4th revision. Vol II. Maryland. USA.

Dick JW, Youngs VL.1988. Evaluation of Durum Wheat, Semolina, and Pasta in the United States. En: Fabriani G, Lintas C. Durum Wheat: Chemistry and Technology. Vol 2. 3ra ed. American Association of Cereal Chemistry, Inc. St. Paul Minnesota, USA. Pag. 237-248.

Dillard CJ, German JB. 2000. Review phytochemicals: nutraceuticals and human health. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80:1744-1756.

FDA, Talk Paper. 1999. FDA approves new health claim for soy protein and coronary heart disease. http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/ANS00980.html, consultado en noviembre de 2007.

Harland JI. 2001. Soja calidad nutricional y papel en la prevención y tratamiento de la enfermedad crónica. Proceedings of 4th International symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease, San Diego, California, USA.

MacDonald RS, Guo JY, Copeland J, Browning JD, Sleper D, Rottinghaus GE, Berhow MA. 2005. Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. Journal of Nutrition, 135: 1239–1242.

Nagata Y, Sonoda T, Mori M, Miyanaga N, Okumura K, Goto K, Naito S, Fujimoto K, Hirao Y, Takahashi A, Tsukamoto T, Akaza H. 2007. Dietary isoflavones may protect against prostate cancer in Japanese men. Journal of Nutrition, 137: 1974–1979.

Park CS, Baik BK. 2002. Flour characteristics related to optimum water absorption of noodle dough for making white salted noodles. Cereal Chem., 79: 867–873.

Rimbach G, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Hall WL, Weinberg PD. 2008. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. Food and Chemical Toxicology, 46: 1308–1319.

Shogren RL, Hareland GA, Wu YV. 2006. Sensory evaluation and composition of spaghetti fortified with soy flour. Journal of Food Science, 71: 428-432.

Steiner C, Peters WHM, Gallagher EP, Magee P, Rowland I, Pool-Zobel BL. 2007. Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system. Carcinogenesis, 28: 738–748.

Tudoricâ CM, Kuri V, Brennan CS. 2002. Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. J. Agric. Food Chem., 50: 347-356.

Estudio del efecto combinado de un hidrolizado de proteína de soja y polisacáridos en las propiedades de espumado y reológicas de la fase continua.

Study of combined effect of a hydrolyzed soy protein and polysaccharides on the foaming and rheological properties of continuous phase

Martínez KD , Pilosof AMR

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428) Buenos Aires, Argentina, TE = 541145763377
e-mail=karinadafnem@yahoo.com.ar

RESUMEN

Fue evaluado el efecto de la concentración de tres biopolímeros sobre las propiedades de espumado y de la fase continua en condiciones de calentamiento y enfriamiento mediante Metodología de Superficie de Respuesta.

Fue utilizado un hidrolizado de proteína de soja (llamado H3 debido a su nivel de hidrólisis obtenido), del 4%. La hidrólisis se efectuó mediante métodos enzimáticos. Fueron seleccionados dos polisacáridos: una hidroxipropilmetilcelulosa llamada E4M y κ-carragenano (κC) con el objetivo de mejorar la estabilidad de las espumas generadas a partir del hidrolizado y compensar sus propiedades funcionales a través del carácter gelificante durante el calentamiento o enfriamiento respectivamente. Esto llevaría a obtener un resultado similar a las proteínas de la clara de huevo.

Las concentraciones usadas fueron de 2 a 10% (peso/peso) para H3; 0,2 a 1,8% (peso/peso) para E4M y 0,2 a 1,8% (peso/peso) para κC.

El diseño experimental involucra un total de 15 puntos experimentales (PE) con una replica en el punto central (PE= 1,14 y 15). El pH fue 7.0 en agua destilada en ausencia de sales. Las espumas se produjeron por batido. Se midió la capacidad de espumado y se estudió la estabilidad a través del líquido drenado y el colapso de las espumas (altura de la columna de la espuma) en función del tiempo.

Los resultados obtenidos mostraron que la adición combinada de E4M y κC es una estrategia adecuada para generar espumas de hidrolizados de proteínas de soja con buena estabilidad en condiciones de calentamiento (70 *ºC*) y de enfriamiento (10 *ºC*).

El gran aumento de estabilidad de las espumas en condiciones de calentamiento fue atribuido al efecto combinado de las propiedades gelificantes de E4M y las características de viscosidad impartida por el κC a la fase continua de las espumas. El efecto combinado de los componentes sobre el módulo elástico (G´) y la viscoelasticidad relativa de la fase continua de las espumas (tan δ) mostró que E4M es el componente determinante a 70 *ºC*. Sin embargo, a altas concentraciones de H3 o κC, E4M no gelifica resultando en la reducción de G´ y de tan δ.

Para obtener una alta estabilidad al drenado de líquido en condiciones de almacenamiento en frío (desde 70 *ºC* a 10 *ºC*), la temperatura de fusión de E4M debería estar cerca de la temperatura de gelificación del κC con el objetivo de mantener una estructura gelificada durante el proceso de enfriamiento. Para alcanzar una alta estabilidad al colapso de las espumas (ruptura de burbujas y descenso de la altura) durante el almacenamiento refrigerado se requiere un alto módulo elástico (G´) de la fase continua de las espumas, el cual es impartido por el carácter gelificante del κC.

ABSTRACT

The concentration effect of three biopolymers on foaming and continuous phase properties at heating and cooling conditions were evaluated by Response Surface Methodology. A soy protein hydrolysate (called H3 due to the degree obtained) with 4% degree of hydrolysis by enzymatic method and two polysaccharides (an hydroxypropylmethylcellulose called E4M and κ-carrageenan (κC)) were selected to improve the hydrolysate foaming stability and compensate theirs functional properties by gelling character during heating or cooling conditions of these polysaccharides, performing as egg white

proteins-like functionality. The concentrations used were 2 to10% (wt/wt) for H3; 0,2 to 1,8% (wt/wt) for E4M and 0,2 to 1,8% (wt/wt) for κC. Therefore, the complete design involved a total of 15 experimental data points (EP) with a replica of central point (1, 14 and 15 EP). The pH was 7.0, in distilled water (without salts). The foams were produced by whipping method, overun was measured and stability was studied through liquid drainage and collapse of the foams as a function of time (height of foams).
The obtained results showed that the combined addition of E4M and κC is an adequate strategy to generate hydrolysates of soy proteins with good foam stability at heating and cooling conditions. The huge stability increase of foams at heating conditions was ascribed to combined effect between gelling property of E4M and the viscozieng character imparted by κC to continuous phase of foams. The combined effect of components on elastic module (G´) and the relative viscoelasticity of foams (tan δ), showed that E4M is the determining component at 70 °C. However, a high H3 or κC concentration, prevents the E4M gel formation, giving a reduced G´ value and tan δ.
To obtain a high liquid drainage stability at cooling conditions (from 70 °C to 10 °C), the melting temperature of E4M should be close to the gelling temperature of κC, in order to maintain a gelling structure during the cooling process. To achieve a high stability against collapse of foams (bubbles rupture and decrease of the height) during the cooling storage is required a high elastic module of the continuous phase imparted by the gelling character of κC.

PALABRAS CLAVE: *Hidrolizados, polisacáridos, espumas, propiedades reológicas.*

KEYWORDS: *Hydrolysates; polysaccharides; foam, rheologic properties.*

INTRODUCCIÓN

La clara de huevo es el agente de batido por excelencia debido a que presenta las siguientes propiedades: muy buena capacidad de espumado, una buena estabilidad al drenado de líquido y colapso de la espuma aún a temperaturas de cocción, capacidad de gelificación por calor, lo cual permite fijar la estructura espumada.
Sería de gran utilidad poder usar sustitutos de la clara de huevo en base a hidrolizados de proteína de soja debido a la diferencia en costos. Para ello es de fundamental importancia poder simular las propiedades que posee la clara de huevo.
La proteína de soja hidrolizada podría utilizarse con este fin dado su buena capacidad de espumado, como se ha demostrado recientemente (Martínez *et al.*, 2009). Al hidrolizar la proteína de soja, mejora la capacidad espumante y la estabilidad al drenado de líquido, pero promueve un colapso más rápido de la misma. Por ello la adición de polisacáridos que aumenten la estabilidad de la espuma, constituye una posible alternativa para desarrollar ingredientes que puedan semejar a la clara de huevo. Además la proteína de soja hidrolizada no gelifica por calentamiento por lo cual la espuma se desestabilizaría durante un proceso de cocción. Para compensar estas deficiencias del hidrolizado se decidió utilizar en combinación con él un tipo de HPMC (E4M) y un carragenano (κC). E4M se seleccionó debido a su capacidad de gelificar durante el calentamiento. Esta propiedad podría brindar una estabilidad a la espuma cuando se la somete a procesos de cocción. Por el contrario, el κC debido a su propiedad de gelificar en frío, contribuiría a aumentar la estabilidad a temperatura ambiente y bajo refrigeración. El uso de polisacáridos gelificantes como el κC para la formulación de espumas basadas en proteínas, permite el diseño de productos espumados con temperaturas específicas de fusión y gelificación brindando además características sensoriales específicas de los productos.
La fase continua en una espuma comprende la fase acuosa que contiene los componentes solubles o insolubles; en este estudio esta fase es la solución acuosa de H3, E4M y κC, cuyas concentraciones fueron variando de acuerdo al diseño experimental realizado. Las propiedades reológicas de la fase continua son muy importantes para la estabilidad de la espuma. Una fase continua muy viscosa retardará todos los procesos de desestabilización que requieren de la difusión, como el drenado de líquido y la desproporción de las burbujas (Kinsella 1981).
Si la fase continua presenta umbral de fluencia o bien se encuentra gelificada, estos procesos se verán impedidos (Carp *et al.*, 2004).

En el caso en estudio, debido a que el componente E4M gelifica durante el calentamiento y funde durante el enfriamiento y además el κC gelifica durante el enfriamiento de las espumas, resulta de importancia el conocimiento de las transiciones térmicas de la fase continua ya que afectarán tanto a los fenómenos de desestabilización como a las propiedades sensoriales de las espumas formuladas. En particular, la temperatura de fusión de la fase continua tendría un impacto directo durante el proceso de masticación de una espuma refrigerada en la boca (35-37 *ºC*).

Se trabajó con un hidrolizado de proteína de soja con un grado de hidrólisis (GH) del 4% (H3). Para simular condiciones de horneado de la espuma (70 °C) o enfriado en heladera (10 *ºC*) se estudió la estabilidad de las espumas en esas condiciones de temperatura.

A fin de estudiar el comportamiento combinado de H3, E4M y κC se utilizó un diseño experimental basado en una red de Doehlert (Doehlert 1970). Se utilizó la metodología de superficies de respuesta, que permite analizar el efecto de la concentración de cada componente y sus interacciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó un aislado de proteína de soja comercial desnaturalizado (SP) (90% de proteínas) de Sanbra, Brasil. Se lo hidrolizó con una proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* con actividad endopeptidasa, provista por Quest Internacional. Los polisacáridos (PS) utilizados fueron: una hidroxipropilmetilcelulosa (E4M) de Dow Chemical Co. y κ-carragenano de Sanofi Bioindustries, Argentina.

Hidrólisis enzimática

SP (72 g en 1,200 ml de agua) fue hidrolizado de acuerdo a Zylberman y Pilosof 2002 con la enzima a pH 7, 50 *ºC* durante 1 hora, con relación enzima/sustrato: 2/100. La hidrólisis de detuvo por calentamiento a 80 *ºC* durante 10 minutos. El GH fue determinado por la reacción con *o*-phthaldialdehyde (OPA) (Church *et al.*, 1983). Este resultó ser de 4%.

Propiedades de espumado

Capacidad de espumado. Se usó 20 ml de las soluciones a 60 *ºC* para la obtención de las espumas en tubos graduados de 3 cm de diámetro durante 3 minutos con un Griffin & George stirrer a 2500 rpm.

La capacidad de espumado (CE) fue calculada como:

$$CE(\%) = [(\text{volumen de la espuma} - 20) / 20] \, 100 \qquad (1)$$

Se hicieron al menos 2 duplicados en todos los casos, el error fue menor al 15%

Drenado y colapso de las espumas

Una vez finalizado el batido, se estudió la estabilidad de la espuma a 70 *ºC* manteniéndola en un baño termostatizado. Se evaluó el drenado de líquido como el tiempo que tardan las espumas en comenzar a drenar, (t.lag d.) y el tiempo requerido (t) para que las espumas drenen un 20% del líquido total que pueden drenar. Se calculó la velocidad de drenado como 1/t. El colapso se evaluó como el tiempo requerido para que comience el descenso de la espuma (t.lag c.) y el tiempo necesario para que la columna de espuma descienda 2 ml,(t.col 2 ml).

Estudios reológicos y transiciones térmicas de las soluciones

Las soluciones mixtas a 60 *ºC* fueron evaluadas a través de: módulo elástico (G´), módulo viscoso (G´´) y tan δ ,(relación entre ambos módulos (G´´/G´) a 70 *ºC*. También se analizó la temperatura de fusión de E4M (T.f.E4M) y temperatura de gelificación del κC (T.g.κC).

Se diseñó un programa de tiempo-temperatura a fin de poder evaluar dichas temperaturas mediante la determinación de las componentes elástica y viscosa del módulo complejo utilizando técnicas de reometría dinámica en un reómetro oscilatorio dinámico Phaar Physica MCR 300 con control de esfuerzo. El calentamiento se efectuó a una velocidad de 10 *ºC*/min hasta 70 *ºC*. Se mantuvo así durante 15 min. y luego hasta 10 *ºC* con la misma velocidad.

Se registró la evolución del G´, G´´, y tan δ utilizando una deformación de 0,01% y una frecuencia de 1 Hz. Estas condiciones se evaluaron previamente como la zona de viscoelasticidad lineal de los sistemas.

Se analizó T.f.E4M y T.g.κC como el punto de cruce entre G´ y G´´ o ascenso brusco de G´ y descenso de la tan δ cuando el punto de cruce no quedara claro.

Las determinaciones se realizaron por duplicado siendo las diferencias menores al 10%.

Diseño experimental

El efecto de las concentraciones de los biopolímeros fue evaluado a través de Metodología de Superficie de Respuesta. Fue seleccionado un diseño de red de Dohelert para elaborar el experimento (Doehlert 1970). El experimento involucra 3 factores (H3, E4M y κC) con 7, 5 y 3 niveles de concentraciones respectivamente. Las concentraciones usadas fueron: 2 a10% (peso/peso) para H3, 0,2 a 1,8% (peso/peso) para E4M y 0,2 a 1,8% (peso/peso) para κC. El diseño completo involucró 15 puntos experimentales (PE) (**Tabla 1**) con réplicas en el punto central (1,14 y 15).

Tabla 1. Puntos Experimentales (PE) en donde se muestran las diferentes concentraciones utilizadas determinadas por el diseño experimental.

PE	H3	E4M	κC
1	6	1	1
2	6	1,8	1
3	6	0,2	1
4	10	1,4	1
5	2	0,6	1
6	2	1,4	1
7	10	0,6	1
8	7,33	1,4	1,8
9	4,67	0,6	0,2
10	4,67	1,4	0,2
11	8,67	1	0,2
12	7,33	0,6	1,8
13	3,33	1	1,8
14	6	1	1
15	6	1	1

Las respuestas evaluadas fueron: CE a 60 *ºC*, la estabilidad al drenado, colapso y sus tiempos lag respectivos. También se evaluaron las propiedades reológicas de las soluciones: G´ y tan δ a 70 *ºC*, como también T.f.E4M, T.g.κC.

Cada variable dependiente fue ajustada según el siguiente modelo:

$$Y= bo + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1^2 + b_5x_2^2 + b_6x_3^2 + b_7x_1x_2 + b_8x_1x_3 + b_9x_2x_3$$

Donde x_1= H3; x_2= E4M; x_3= κC son las variables independientes; Y representa la variable dependiente; y b_i son los coeficientes de regresión: constante, lineal, cuadrático y sus interacciones.

Análisis estadístico

La bondad del ajuste al modelo fue evaluado mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el análisis de varianza (ANOVA). La superficie de respuesta y gráficos de contorno desarrollados usando la ecuación polinómica descripta, manteniendo constante una de las variables independientes en el punto central, fueron graficadas con Statgraphics Plus 3.0. software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades de espumado

En la **Figura 1 a-b** se muestran la superficie de respuesta y las líneas de isorespuesta para la CE.

Los resultados indican que los mayores valores se obtienen cuando H3 y κC se encuentran en baja concentración. Las líneas de isorespuesta (**Figura 1 b**) muestran que fijando cualquier valor de H3, al aumentar la concentración de κC se produce una disminución de la CE mucho más marcada que a la inversa, es decir, fijando κC en un valor y analizando la CE con el aumento de la concentración de H3. Esto indica que el aumento del κC es más significativo en la reducción de la CE que el aumento de la concentración de H3. Sin embargo, comparando con el valor de la CE obtenido cuando el hidrolizado se encuentra solo (2% de concentración, CE=200%), puede decirse que las combinaciones de polisacáridos más favorables para no producir una reducción en la CE podrían extenderse hacia altas

concentraciones de H3, pero con concentraciones de κC menores al 1%. Se ha reportado un comportamiento similar para espumas de proteínas de soja sin hidrolizar, en presencia de goma xántica (Carp *et al.*, 2001). Por otro lado, Carp *et al.*,(2004), encontraron resultados similares utilizando este polisacárido sobre espumas preparadas a partir de β-lactoglobulina y proteína de soja nativa y desnaturalizada. Se demostró que la adición de κC redujo la expansión de las espumas a causa de que la incorporación de aire estuvo limitada por el incremento de la viscosidad de las soluciones.

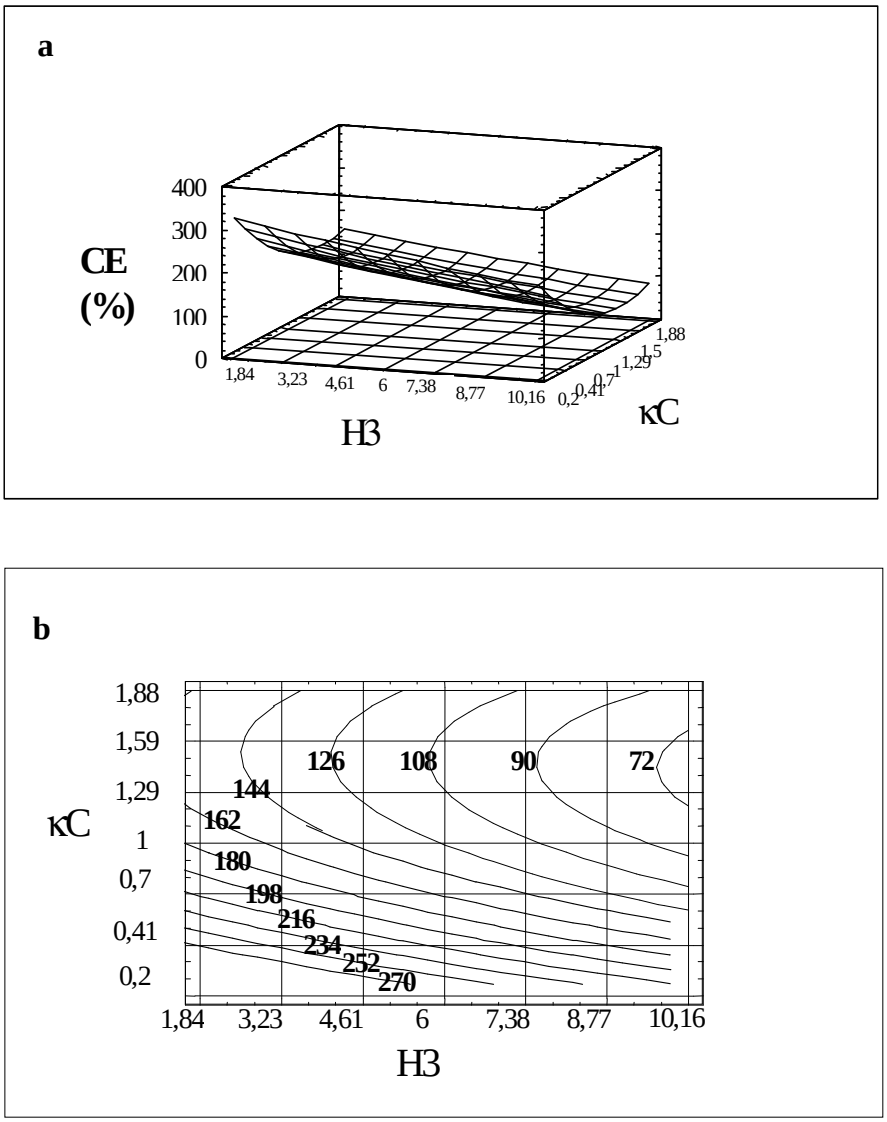


Figura 1. Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para la CE, en función de la concentración de H3 y □C (E4M=1%).

El tiempo lag de drenado que se muestra en la **Figura 2 a-b** (superficie de respuesta y las líneas de isorespuesta respectivamente) está influenciado por el incremento de H3 y κC simultáneamente. Fijando un valor de κC sobre las líneas de isorespuesta, el t.lag de drenado aumenta con el aumento de H3 en mayor proporción que si se fija un valor de H3 y se analiza el aumento de dicho tiempo con el incremento de la concentración del κC. Esto indica que H3 tiene un mayor efecto sobre la respuesta estudiada.

La velocidad de drenado de líquido de las espumas (no se muestra) fue mínima en un amplio rango de combinaciones de H3 y κC. Sin embargo, las diferencias encontradas no son tan significativas comparando con el t.lag d. (**Figura 2 a-b**). El t.lag d. demostró presentar variaciones más marcadas con el aumento de las componentes, siendo por lo tanto un mejor índice de drenado de las espumas a

70 *ºC*, dado que los valores alcanzados de t.lag d. (80 minutos) permitirían eventualmente la cocción de una espuma sin que comience a drenar.

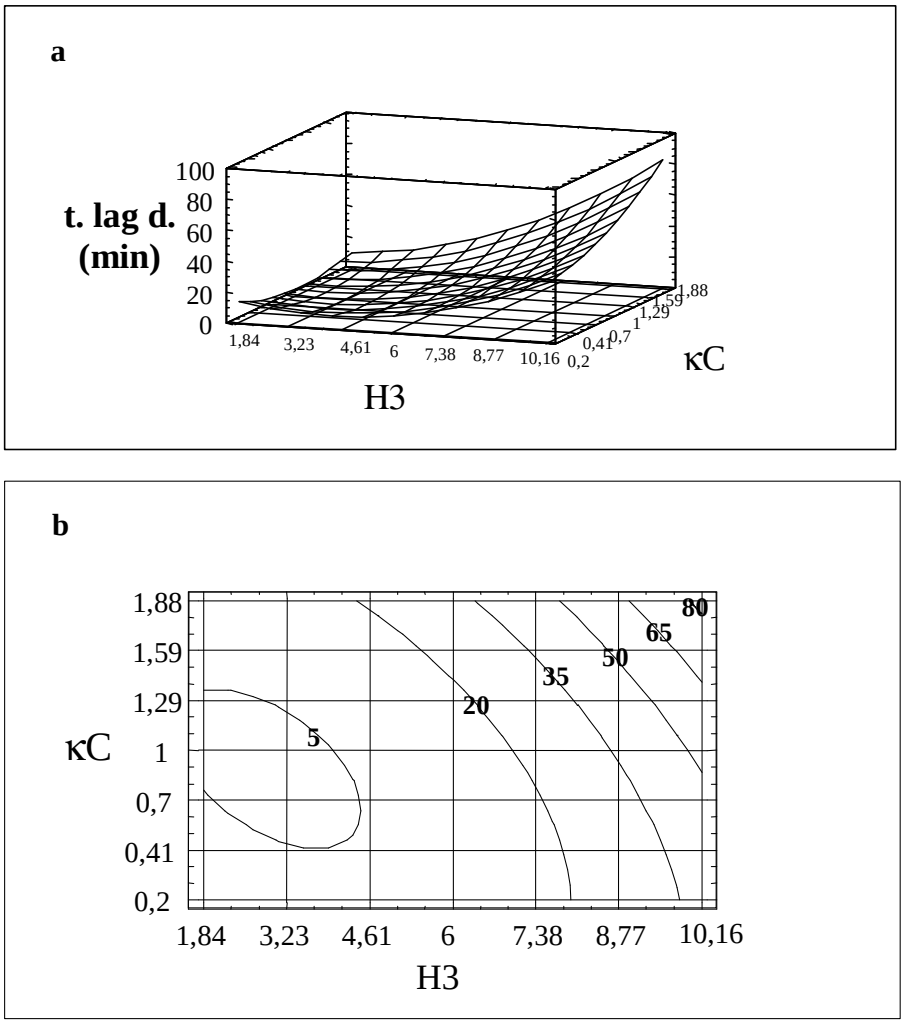


Figura 2. Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para el t.lad d. en función de la concentración de H3 y κC (E4M=1%).

La variable que aumenta en mayor grado el tiempo lag de colapso (**Figura 3 a-b**) es a la concentración de H3, mientras que κC disminuye este tiempo pero en menor magnitud. Esto se observa al fijar un valor de κC y aumentando H3, mientras que fijando la concentración de H3, el aumento de la concentración de κC produce una muy marcada disminución de la respuesta, que se acentúa aún más a altas concentraciones de H3. Además a estas menores concentraciones se aprecia un mínimo en el t.lag c., el cual se aprecia mejor en la **Figura 3 a**, la cual muestra una evidente curvatura.
Teniendo en cuenta que el t.lag c. de H3 solo (2% de concentración) fue de 1,30 minutos, se podría inferir que el agregado de los PSs promueve una mayor estabilidad al inicio del colapso, lo cual es sumamente importante en sistemas que son sometidos a cocción.
Respecto al tiempo colapso (no se muestra) de las espumas, la adición de cada componente depende de la concentración del otro debido a las interacciones. De todas formas, hay que destacar que al igual que en el caso del t.lag d., los valores obtenidos para el t.lag c. son lo suficientemente altos como para alcanzar la cocción sin que la espuma comience a colapsar. Estudios previos han demostrado que el estado estructural de la proteína, en éste caso su hidrólisis, es fundamental en la estabilidad de espumas (Carp *et al.*,2004). Dicho trabajo demostró que la adición de κC influía en las propiedades de espumado dependiendo el estado nativo o desnaturalizado de la proteína de soja. Se encontró que la desnaturalización térmica del aislado indujo un mayor efecto sinérgico sobre las propiedades de espumado cuando este polisacárido estaba presente en la solución.

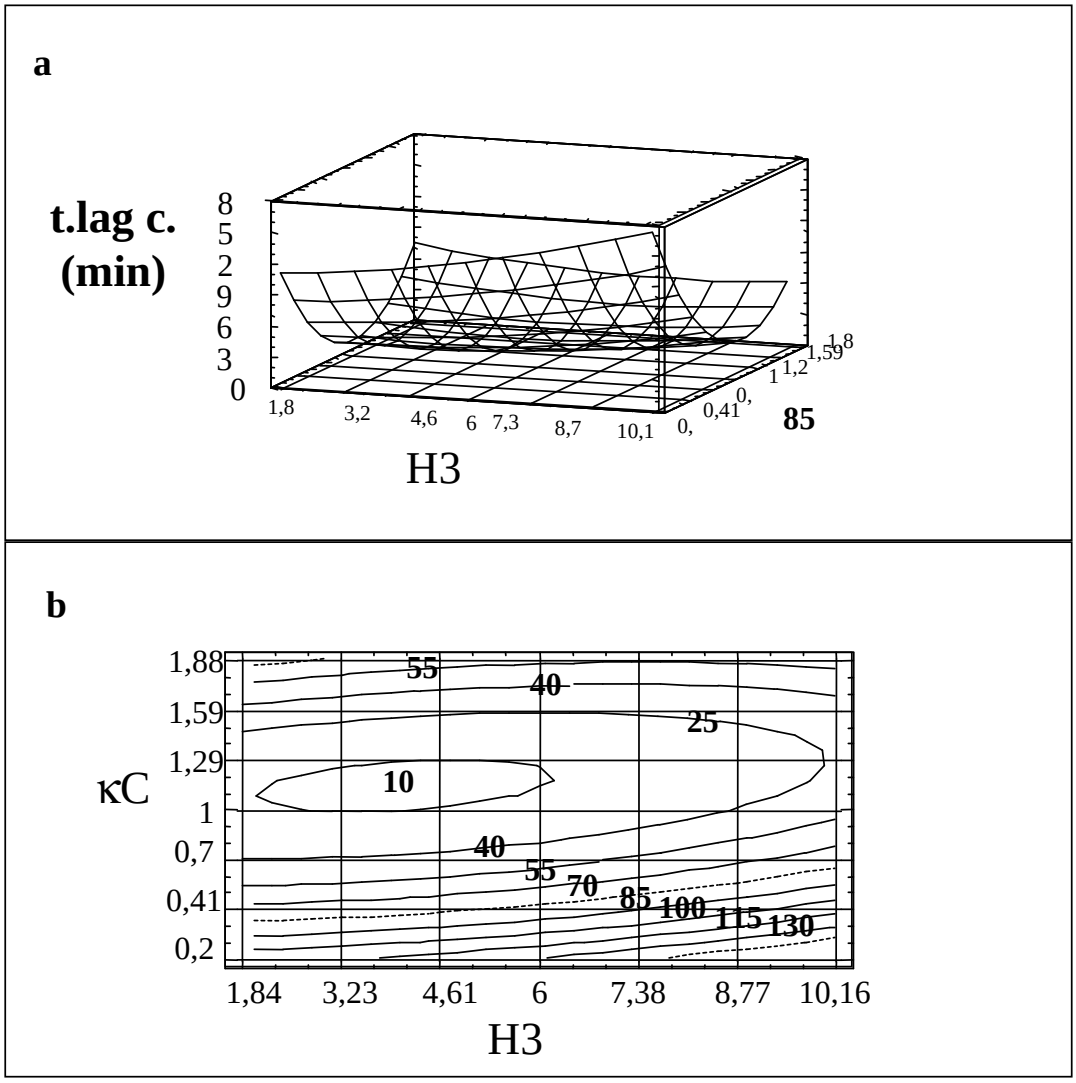


Figura 3. Superficie de respuesta (a) y líneas de isorespuesta (b) para el t.lad c., en función de la concentración de H3 y κC (E4M=1%).

Del análisis comparativo de estas figuras se puede inferir que para obtener una CE no menor al 200% (no menor a la CE de H3 solo) y que las espumas presenten al mismo tiempo un t.lag para el drenado y colapso considerables, de tal forma que resistan un proceso de cocción (70 *ºC*) sin desestabilizarse, la concentración de H3 debe ser alta (>7%) y la de κC inferior al 0,7%. En estas mezclas que además contienen 1% de E4M, se pueden lograr espumas que sometidas a un proceso de cocción a 70 *ºC*, tarden entre 20 y 50 minutos en comenzar a drenar y entre 100 y 130 minutos en comenzar a colapsar.

Propiedades reológicas de las soluciones

Se realizó el análisis de regresión múltiple para las respuestas G´ y tan δ al final de la etapa de calentamiento.

En la **Figura 4 a-c** se muestran los gráficos correspondientes a la respuesta de la componente elástica (G´) en función de los factores que resultaron significativos.

En la **Figura 4 a-b** se muestra que los mayores valores de G´ se obtienen en mezclas que tienen una alta concentración de E4M, siendo escasa la influencia de H3. El efecto del agregado de κC en presencia de E4M que se muestra en la **Figura 4 c** es muy pequeño si la concentración de E4M es alta. Cuando E4M se encuentra en baja concentración el aumento de la concentración de κC produce un aumento de G´. Resultados similares se obtuvieron en estudios reológicos sobre proteína de soja analizando la componente elástica durante el calentamiento en presencia de carragenanos, (principalmente κC) (Molina Ortiz, *et al.*, 2004). Dispersiones en relación 1:1 proteína –polisacárido,

revelaron un aumento de entre 20-40 Pa en el G´correspondiente a la mezcla respecto a la proteína sola. Esto indicaría la existencia de una posible contribución del carragenano al sistema gelificado y además la formación de estructuras de alta elasticidad.

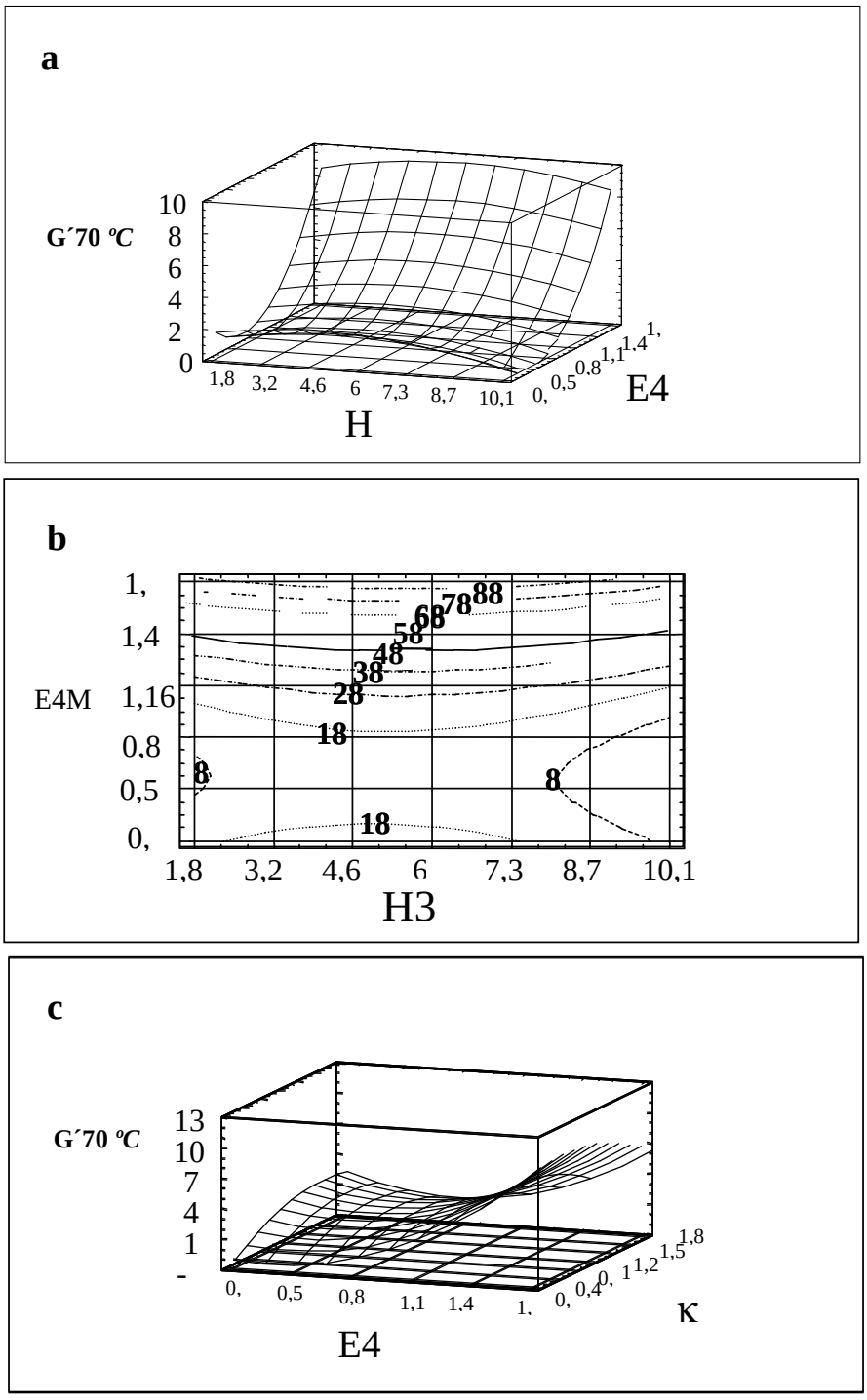


Figura4. Módulo elástico (G´) a 70 ºC; (a) superficie de respuesta en función de la concentración de H3 y E4M (κC =1%); (b) líneas de isorespuesta correspondientes a los mismos componentes y (c) superficie de respuesta en función de la concentración de E4M y de κC (H3 = 6%).

Se concluye que el componente que determina principalmente el carácter elástico de la fase continua es E4M, dado que este PS gelifica durante el calentamiento. H3 presenta un efecto negativo en G´,

mientras que el κC contribuye al carácter sólido básicamente cuando E4M se encuentra en baja concentración.

Los gráficos correspondientes a tan δ (no se muestran) indicaron que los menores valores de tan δ es decir, la máxima viscoelasticidad de la fase continua, se logran a altas concentraciones de E4M y bajas de H3. Por lo tanto, del análisis conjunto del efecto combinado de los componentes en G´ y tan δ se puede concluir que E4M es el componente que determina principalmente las características elásticas y viscoelásticas de la fase continua a 70 *ºC*, debido a que E4M puede gelificar a esta temperatura y además el κC a esta temperatura se encuentra no gelificado.

La presencia de una alta concentración de H3 y/o κC impedirán la gelificación de E4M la cual se manifiesta en muy bajos valores de G´ y altos de tan δ (no mostrado).

Transiciones térmicas de las soluciones

Se realizó el análisis de regresión múltiple para la temperatura de gelificación del κC (T.g.κC) y para la temperatura de fusión de E4M (T.f.E4M).

La T.g.κC se presenta en la **Figura 5 a-b** manteniendo constante la concentración de H3 en su valor central (6%), dado que esta fue una variable no significativa. Se encontró un efecto de interacción entre E4M y κC (**Figura 5 a**). El coeficiente negativo obtenido en la regresión (no mostrado) indica una reducción de la Tgel.κC producto de la mezcla mencionada.

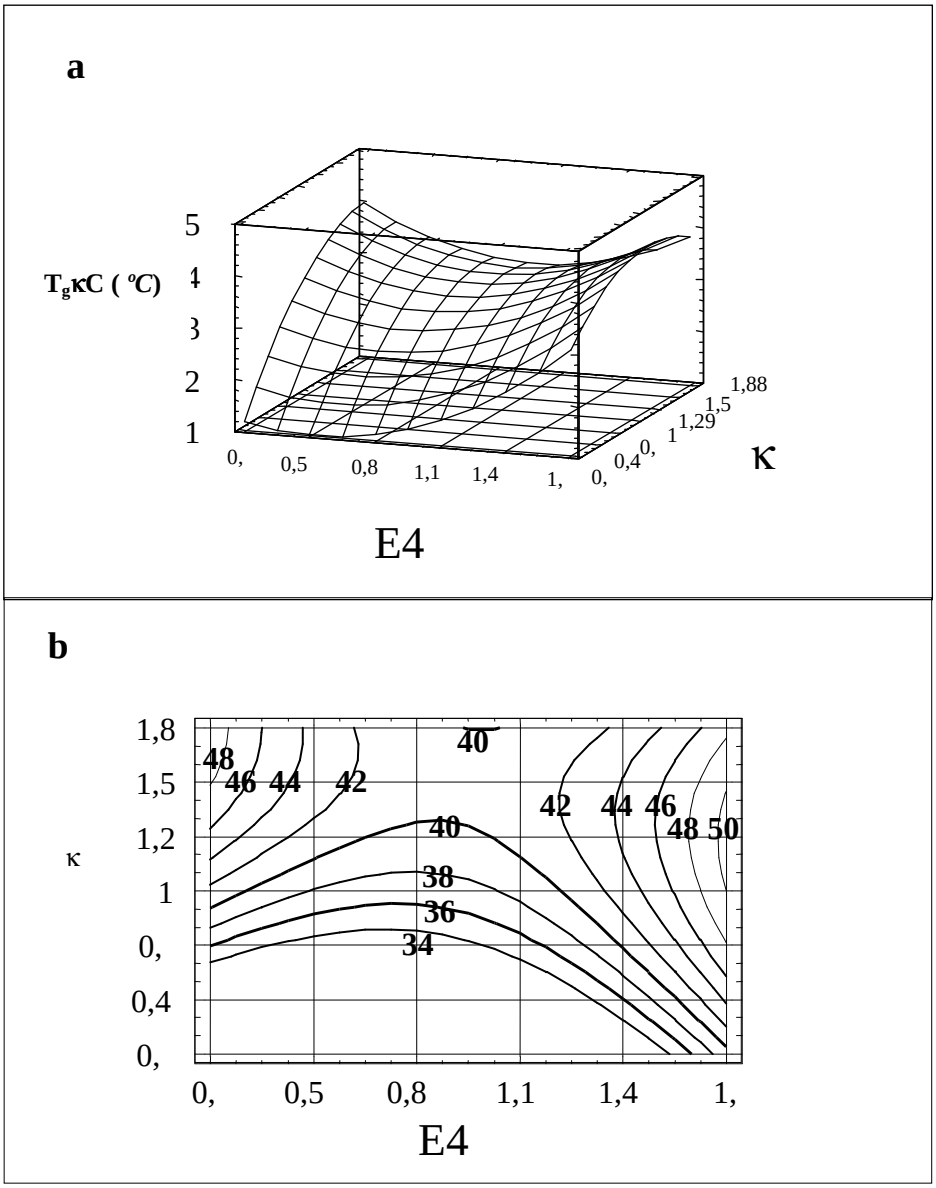


Figura 5. T.g.κC (a) superficie de respuesta, (b) líneas de isorespuesta.

Se observa que las mayores T.g.κC se obtienen cuando los sistemas tienen una concentración de κC alrededor de 1,4%, siendo pequeña la influencia de E4M en estas condiciones. En cambio, cuando la concentración de κC es menor, la presencia de E4M tiene más influencia produciendo un aumento de la T.g.κC. Baeza *et al.*, (2002) estudiaron los procesos de gelificación y fusión del κC a pH neutro en presencia de β-lactoglobulina y proteínas de soja nativa y desnaturalizada mediante técnicas reológicas dinámicas, entre otras. En presencia de proteínas se ha observado un aumento de la temperatura de gelificación del κC y del módulo elástico de los geles mixtos comparando con los geles de κC solo.

Observaciones previas sobre sistemas de κC-proteínas mostraron efectos sinérgicos entre los biopolímeros sobre las propiedades de gelificación a pHs por encima del punto isoeléctrico de las proteínas (Kampf y Nussinovitch, 1997; Mleko *et al.*,1997; Neiser *et al.*,2000; Ould Eleya y Turgeon, 2000; Schorsch *et al.*, 2000). La principal causa de este efecto sinérgico sería la incompatibilidad termodinámica entre los diferentes biopolímeros en solución. Esto conduce a un aumento mutuo de la concentración de ambos biopolímeros en fases separadas que favorece la gelificación del hidrocoloide (Tolstoguzov 1997).

El mismo caso se presenta en el actual trabajo en donde el aumento de la temperatura de gelificación del κC en presencia de E4M puede atribuirse a un fenómeno de incompatibilidad termodinámica a pH neutro que conlleva a un aumento de la concentración efectiva del κC.

Con respecto a la temperatura de fusión de E4M, se puede inferir que existe una fuerte influencia de la interacción entre todos los componentes (Figuras no mostradas). Se apreció que el aporte del κC produce un aumento de la temperatura de fusión de E4M, dado a su coeficiente positivo, obtenido en la regresión (datos no mostrados). Mientras que el aumento de E4M tiende a una reducción de su temperatura de fusión.

Comportamiento térmico de los PS durante el enfriamiento y el almacenamiento refrigerado

Para tener una mayor estabilidad de las espumas durante el enfriamiento (desde 70 *ºC* a 10 *ºC*) sería deseable que la T.f.E4M fuera lo más próxima a la de T.g.κC, de tal forma que se mantenga una estructura gelificada en todo el rango de enfriamiento.

El PE 9 que tiene una diferencia entre T.gel κC y T.f.E4M de aproximadamente 18 *ºC*, (no se muestra) presenta durante el enfriamiento a 10 *ºC* en heladera un drenado de líquido de 20% y un colapso del 38% de la espuma. En los sistemas donde esta diferencia es pequeña (menor a 6-8 *ºC*) no se observó drenado de las espumas durante el enfriamiento (PE 1, 6 y 13). Sin embargo, aún no habiendo drenado, estas espumas colapsaron en algún grado durante el almacenamiento refrigerado (10 *ºC*). Las espumas correspondientes a los PE 1,6 y 13 colapsaron el 15, 28 y 7% respectivamente al cabo de 60 días a 10 *ºC*. El grado de colapso podría estar relacionado a las propiedades reológicas de las espumas enfriadas.

La buena correlación obtenida indica que el colapso de las espumas refrigeradas es atribuible al comportamiento viscoelástico de la fase continua, el cual está determinado a temperaturas de refrigeración, principalmente por el κC.

CONCLUSIONES

El agregado combinado de κC y E4M es una estrategia adecuada para generar espumas en base a hidrolizados proteicos de soja, con una elevada estabilidad al drenado y colapso bajo condiciones de calentamiento, sin reducir la CE. Por otro lado, estas espumas bajo refrigeración presentarían una alta estabilidad debido a la gelificación del κC.

La concentración de κC necesaria para obtener espumas de óptimo volumen (CE no menor al 200%) y con un tiempo lag de drenado y colapso alto (50-130 minutos), que permitiría eventualmente la pasteurización o la cocción de una espuma sin que sufra una desestabilización significativa, resultó ser menor al 0,7% debido principalmente a que una mayor concentración de κC reduce mucho el volumen de espuma por su carácter viscosante. La concentración óptima de E4M en espumas formuladas con una concentración de H3 mayor al 7% fue entre 1 y 1,8%.

El enorme aumento de estabilidad a altas temperaturas es atribuible a un efecto combinado entre la gelificación del E4M a 70 *ºC* y la interacción del mismo con el κC, el cual aportaría efectos viscosantes a la fase continua.

El análisis del efecto combinado de los componentes en el módulo elástico y la viscoelasticidad relativa de la fase continua de las espumas permitió corroborar que E4M es el componente que determina principalmente las características elásticas y viscoelásticas de la fase continua a 70 *ºC*, debido a que E4M puede gelificar a esta temperatura. Sin embargo una alta concentración de H3 y/o κC impedirán la gelificación de E4M lo cual se manifestó en muy bajos valores de G´ y altos de tan δ.
Para tener una mayor estabilidad de las espumas durante el enfriamiento (desde 70 *ºC* a 10 *ºC*) la temperatura de fusión de E4M debe ser suficientemente próxima a la de gelificación de κC, de tal forma que se mantenga una estructura gelificada en todo el rango de enfriamiento.
Finalmente para lograr una alta estabilidad al colapso durante el almacenamiento refrigerado de las espumas se requiere una fase continua con un elevado módulo elástico el cual es aportado principalmente por la gelificación del carragenano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baeza RI, Carp DJ, Pérez O, Pilosof AMR. 2002. □-Carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 35, 741-747.

Carp DJ, Bartholomai GB, Relkin P, Pilosof AMR .2001. Effects of denaturation on soy protein-xanthan interactions: comparision of a whipping-rheological and bubbling method. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 21, 163-171.

Carp DJ, Baeza RI, Bartholomai GB, Pilosof AMR .2004. Impact of protein-k-carrageenan interactions on foam properties. Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie , 37, 573-580.

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL .1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins, Journal Dairy Science, 66, 1219-1227.

Doehlert DH .1970. Uniform shell desing, Appl. Statistics 19, 231.

Kampf N, Nussinovitch A .1997. Rheological characterization of □-carrageenan soy milk gels. Food Hydrocolloids, 11, 261-269.

Kinsella JE .1981. Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams, Food Chemistry, 7, 273-288.

Martínez KD, Carrera Sánchez C, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR .2009. Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. Food Hydrocolloids, FOODHYD-D-08-00116R3.

Molina Ortiz SE, MC Puppo, Wagner JR .2004. Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates-carrageenan systems. Food Hydrocolloids**,** 18(6): 1045-1053.

Mleko S, Li-Chan ECY, Pikus S. 1997. Interactions of κ-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. Food Research International, 30, 427-433.

Neiser S Draget K , Smidsrod O. 2000. Gel formation in heat-treated bovine serum albumin- □-carrageenan systems. Food Hydrocolloids, 14, 95-110.

Ould Eleya MM , Turgeon SL .2000. Rheology of κ-carrageenan and β-lactoglobulin mixed gels. Food Hydrocolloids, 14, 29-40.
Schorsch C Jones M , Norton I. 2000. Phase behaviour of pure micellar casein / □-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. Food Hydrocolloids, 14, 347-358.

Tolstoguzov VB.1997. Protein – Polysaccharide Interactions. En Food Proteins and their Applications, ed. By Damodaran, S. and Paraf, A.; Marcel Dekker, Inc., New York, p. 171 – 198.

ZylbermanV, Pilosof AMR .2002. Relationship between the Glass Transition, Molecular Structure and Functional Stability of Hydrolyzed Soy Proteins. En: Amorphous Food and Pharmaceutical Systems, H Levine (Ed.), Royal Society of Chemistry. pag. 158-168.

Efecto de diferentes tipos de alginatos de propilenglicol en la dinámica de gelificación de ß-lactoglobulina

Effect of different types of propilen glycol alginates on the dynamic of gelation of ß-lactoglobulin

Martinez MJ, Pilosof AMR

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
apilosof@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

El estudio de los fenómenos de interacción entre proteínas y polisacáridos es una herramienta importante para el diseño de diferentes productos alimenticios. Un ejemplo de esto es el estudio de los mecanismos de gelificación de mezclas de proteínas y polisacáridos en condiciones donde estos componentes no gelifican por separado. El objetivo de este trabajo fue estudiar la gelificación de ß-lactoglobulina (ß-lg) en presencia de un polisacárido no gelificante (alginato de propilenglicol (PGA) a 90°C en concentraciones donde la proteína sola no gelifica. Se utilizaron tres variedades comerciales de PGA: Kelcoloid O (KO), Kelocoloid LVF (KLVF) y Manucol (MAN). Se estudiaron las mezclas de ß-lg/PGA en las siguientes concentraciones (% p/p): 9/1,25, 7/1,25 y 5/1,25. Se estudiaron las propiedades reológicas (temperatura (T_{gel}) y tiempo (t_{gel}) de gelificación, módulo elástico (*G'*) y módulo viscoso (*G"*) de los sistemas durante y después del calentamiento en un reómetro dinámico (Phaar Physica). En soluciones de ß-lg 5, 7 y 9% p/p sin agregado de PGA no se observó gelificación. En las mezclas con 5% de proteína sólo se observó gelificación en presencia de KLVF, aunque los valores de *G'* obtenidos fueron muy bajos. En las mezclas con 7 y 9% p/p se observó el cruce del *G'* y *G''* en presencia de los tres polisacáridos, indicando la gelificación de las mezclas. Sin embargo, los mayores valores de *G'* se obtuvieron en presencia de KLVF. La presencia de los tres PGA promueve la gelificación de ß-lg a concentraciones donde la proteína sola no gelifica. Además, KLVF induce la gelificación de ß-lg a concentraciones menores que MAN y KO lo que podría atribuirse a su mayor viscosidad y menor grado de esterificación, que promueven una mayor incompatibilidad termodinámica con la proteína.

ABSTRACT

Interactions phenomena between proteins and polysaccharides are an important tool to design different food products. An example is the study of the dynamics of gelation of proteins and polysaccharides mixtures in conditions where each biopolymer does not gel. The aim of this work was study the dynamics of gelation of ß-lactoglobulin (ß-lg) in the presence of a non gelling polysaccharide (propylen glycol alginate (PGA)) at 90 *ºC* under concentrations where the protein alone does not gel. Three commercial varieties of PGA were used: Kelcoloid O (KO), Kelocoloid LVF (KLVF) y Manucol (MAN). ß-lg/PGA mixed systems were studied at the following concentrations (% w/w): 9/1.25, 7/1.25 y 5/1.25. Rheological properties were determined: gelation temperature (T_{gel}) and time (t_{gel}), storage modulus (*G'*) and viscous modulus (*G''*) for each system before and after the heat treatment in a dynamic rheometer (Phaar Physica). In ß-lg solutions 5, 7 and 9% w/w without PGA, gelation was not observed. In mixed systems with 5% w/w protein concentration gelation was observed only with KLVF, but G' values were very low. Mixed systems with 7 and 9% w/w presented the cross of G' and G'' in the presence of the three polysaccharides indicating the gelation of the mixtures. However, the higher values of *G'* were obtained in the presence of KLVF. The presence of these polysaccharides promotes the gelation of ß-lg at concentrations where the protein does not gel by its own. Additionally, KLVF induced the gelation of ß-lg at lower concentration than MAN and KO, which could be attributed to its higher viscosity and lower degree of esterification that promotes a higher thermodynamic incompatibility with the protein.

PALABRAS CLAVE: *β-lactoglobulina, alginato de propilenglicol, gelificación, limitada compatibilidad termodinámica.*

KEYWORDS: *β-lactoglobulin, propilen glycol alginates, gelation, limited thermodynamic compatibility.*

INTRODUCCIÓN

β-lactoglobulina es la proteína más abundante en el suero de leche de rumiantes y comprende hasta un 50% del total de proteínas del suero de la leche bovina (Mulvihill y Donovan 1987). Estructuralmente, es una proteína globular compacta (peso molecular: 18,3 KDa) y contiene 162 amino ácidos con un grupo tiol y dos uniones disulfuro (Harnsilawat *et al.* 2006). El comportamiento térmico de la β-lg ha sido ampliamente estudiado (Donovan y Mulvihill 1987, Mc Swiney *et al.* 1994, Relkin 1994; Hoffmann *et al.* 1995; Hoffmann *et al.* 1997b, Relkin 1998; Verheul *et al.* 1998, Le Bon *et al.* 1999, Manderson *et al.* 1999a, de Wit 2008) por diferentes técnicas, y varía con la temperatura, el pH, el tiempo de calentamiento y la concentración de proteína.

Los alginatos son sales del ácido algínico. Es el polisacárido estructural más importante de las algas marinas marrones (*Phaeophyceae*) y también es parte de secreciones extracelulares de cierta especie de bacteria (Morris 1998). Son polisacáridos lineales de alto peso molecular formados por ácido 1,4 D-manurónico y ácido L-gulurónico (Dziezak, 1991). Los alginatos de propilenglicol (PGA) son productos de la reacción del ácido algínico con óxido de propileno que producen un éster parcial con 50 – 85% de grupos carboxilos esterificados. Las soluciones de PGA son mucho menos sensibles a pH bajos y a cationes polivalentes, incluyendo iones calcios y proteínas. Debido a esta tolerancia a los iones calcios, PGA puede ser usado en productos lácteos (BeMiller y Whistler, 1996). De hecho, Sarker y Wilde (1999) informaron una mejora significativa en las propiedades espumantes de albúmina de suero bovina en presencia de bajas concentraciones de PGA.

El estudio de los fenómenos de interacción entre proteínas y polisacáridos es una herramienta importante para el diseño de diferentes productos alimenticios. Un ejemplo de esto es el estudio de los mecanismos de gelificación de mezclas de proteínas y polisacáridos en condiciones donde estos componentes por separado no gelifican pero que en mezclas generan un efecto sinérgico que ofrece la posibilidad de controlar y mejorar las propiedades de los geles. El fenómeno conocido como incompatibilidad termodinámica se observa comúnmente en mezclas de proteínas y polisacáridos semi-diluidas o concentradas y es la principal causa del efecto sinérgico. La incompatibilidad ocurre principalmente a pHs más altos que el punto isoeléctrico de la proteína y/o a altas fuerzas iónicas (Grinberg y Tolstoguzov 1997).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la gelificación de ß-lg en presencia de un polisacárido no gelificante (PGA) a 90°C y pH 7 en concentraciones donde la proteína sola no gelifica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó una muestra de β-lactoglobulina (β-lg) bovina, que contiene las variantes genéticas A y B, suministrada por Besnier y Bridel (Francia). El contenido de β-lg en el polvo seco fue de 95% de masa seca. Las concentraciones utilizadas fueron: 5, 7 y 9% p/p.

Las muestras de alginato de propilenglicol fueron provistas por ISP Alginates Inc. (San Diego, USA). Se utilizaron tres variedades comerciales de PGA: Kelcoloid O (KO), Kelocoloid LVF (KLVF) y Manucol (MAN). Los tres polisacáridos se utilizaron a una concentración constante de 1,25% p/p. En la **Tabla 1** se presentan los valores de viscosidad y grado de esterificación de estos tres polisacáridos.

Las muestras de β-lg y PGA en polvo fueron disueltas separadamente en agua destilada a temperatura ambiente bajo agitación y luego fueron almacenadas durante la noche para lograr la completa hidratación de los biopolímeros. El pH se ajustó a 7 con 0,1 M de NaOH o HCl. Para evitar crecimiento bacteriano se agregó 0,02% p/p de NaN_3. Los sistemas mixtos β-lg - KO se prepararon mezclando el volumen apropiado de cada solución de biopolímero al doble de la concentración para alcanzar la concentración final requerida.

Tabla 1. Grado de esterificación y viscosidad de alginatos de propilenglicol.

PGA	Grado de esterificación	Viscosidad[a]
Kelcoloid LVF (KLVF)	Medio (48 – 62%)	Alto
Manucol éster (MAN)	Alto (78 – 85%)	Alto
Kelcoloid O (KO)	Alto (78 – 85%)	Bajo

[a] Viscosidad (60 s^{-1}) de soluciones al 0,5% p/p.

Reología Dinámica

Las determinaciones reológicas se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico Phaar Physica MCR 300 con esfuerzo de corte controlado. Se utilizó un sistema de platos paralelos (PP30/S) separados por un espacio ("gap") de 1 mm, entre los cuales se colocó aproximadamente 0,7 ml de muestra, lo que permitió llenar completamente el espacio entre ellos. La temperatura del plato inferior fue contralada mediante un sistema Peltier y un baño termostatizado (Viscotherm VT2, Phaar Physica).
Luego de colocada la muestra se aplicó silicona líquida con el objetivo de prevenir la evaporación de agua de la muestra y evitar la adherencia de la muestra al sistema de platos.
Las condiciones de medición fueron evaluadas en la región viscoelástica lineal y se definieron las siguientes: frecuencia: 1 Hz, deformación: 0,01%.
La rampa de temperatura utilizada fue un aumento desde una temperatura inicial de 25 °C hasta 90 °C a una velocidad de 5 °C/min, se mantuvo a 90 °C durante 10 minutos, se disminuyó la temperatura de 90 °C a 25 °C a una velocidad de 25 °C/min y por último se mantuvo otros 10 minutos a 25 °C.
Durante las mediciones se registró la evolución del módulo elástico (*G'*), el viscoso (*G''*). El punto de gelificación de los sistemas estudiados se determinó como el punto de cruce entre *G'* y *G''*, luego del cual *G'* asciende notoriamente. En algunos casos se observó que la gelificación ocurría durante la etapa de calentamiento entonces pudo obtenerse la temperatura de gelificación (T_{gel}), sin embargo hubo casos en los que el cruce de *G'* y *G''* ocurrió en la etapa de temperatura constante, entonces el parámetro obtenido fue el tiempo de gelificación (t_{gel}) a la temperatura de calentamiento.
Los valores informados son el promedio de dos determinaciones con una diferencia menor al 10%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las soluciones de ß-lg 5, 7 y 9% p/p, sin agregado de PGA, no se observó cruce entre el módulo elástico y el módulo viscoso, indicando que no se produjo gelificación en estos tres sistemas.
Los resultados obtenidos con los sistemas mixtos ß-lg 9% p/p – KLVF 1,25% p/p (**Figura 1A**), ß-lg 9% p/p – KO 1,25% p/p (**Figura 1B**) y ß-lg 9% p/p – MAN 1,25% p/p **(Figura 1C**) revelaron en los tres sistemas cruce de *G'* y *G''*, indicando la gelificación de las mezclas. Para los sistemas mixtos ß-lg 7% p/p – KLVF 1,25% p/p (**Figura 2A**), ß-lg 7% p/p – KO 1,25% p/p (**Figura 2B**) y ß-lg 7% p/p – MAN 1,25% p/p (**Figura 2C**) también se observó gelificación en presencia de los tres polisacáridos. En cambio, para los sistemas mixtos ß-lg - PGA con 5% p/p de proteína sólo se observó gelificación en presencia de KLVF (**Figura 3**).
En la **Figura 4** se muestran los valores máximos de *G'* y *G''* obtenidos al final del enfriamiento para todos los sistemas mixtos gelificados. Los mayores valores de *G'* máxima de enfriamiento (**Figura 4A**) para los sistemas mixtos con la mayor concentración de proteína (9% p/p) se obtuvieron en presencia de KLVF, luego le siguen los geles obtenidos en presencia de MAN y por último los sistemas mixtos con KO. Este orden se corresponde con los valores de grado de esterificación y viscosidad mostrados en la **Tabla 1**, donde KLVF presentó el menor grado de esterificación entre los tres polisacáridos lo que se relaciona con una mayor cantidad de cargas disponibles para repeler a la proteína aumentando la incompatibilidad entre ambos biopolímeros. Además, este PGA es el que presenta la mayor viscosidad, relacionado con un mayor peso molecular. En los sistemas mixtos con 7% p/p de proteína no se observaron grandes diferencias entre los valores finales de *G'* y *G''*, mostrando el siguiente orden: MAN > KO > KLVF. Por último, en los sistemas mixtos ß-lg - PGA con 5% p/p de proteína sólo se observó gelificación en presencia de KLVF como se mencionó anteriormente (**Figura 3**), aunque los valores de *G'* obtenidos fueron muy bajos.

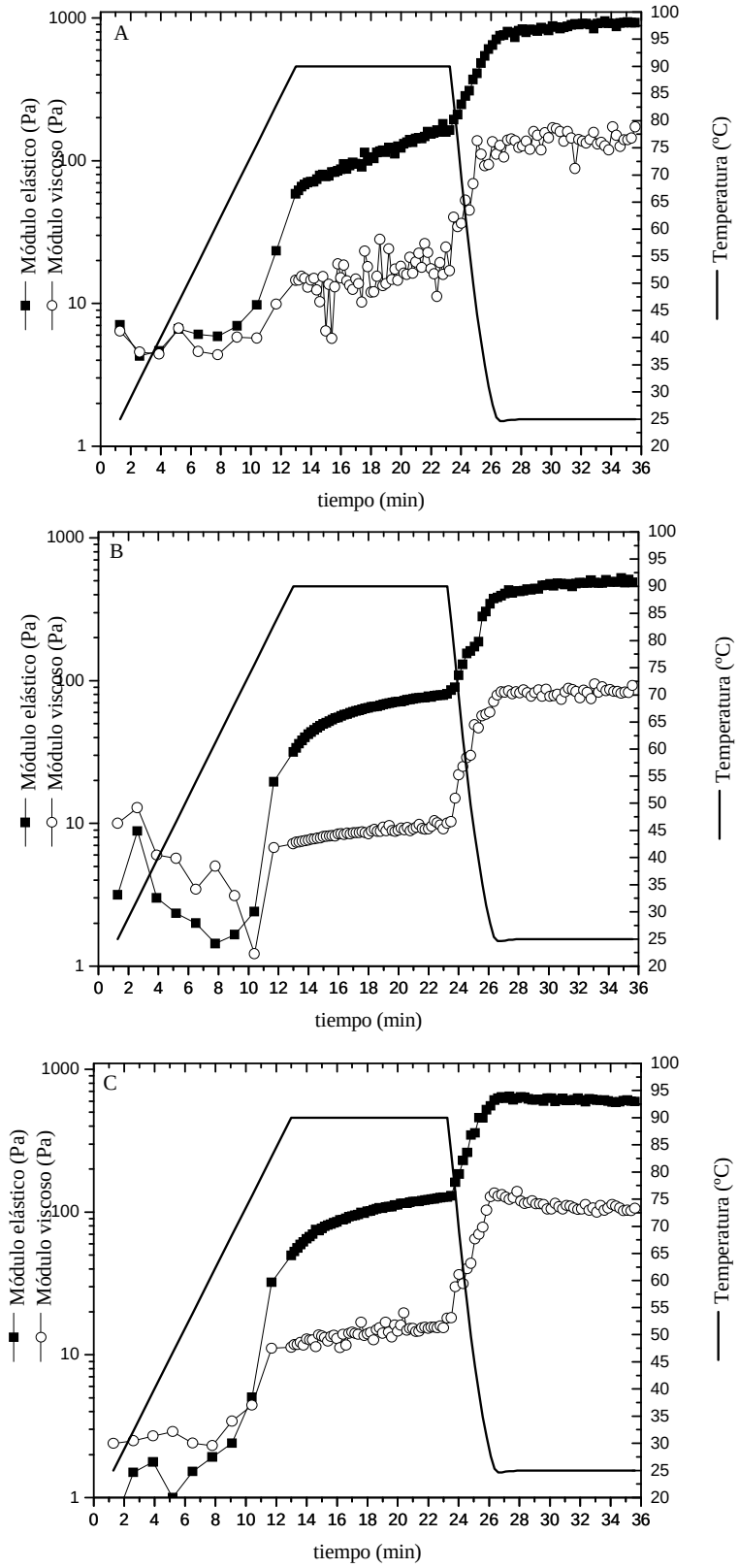


Figura 1. Evolución de (■) G' y (○) G'' versus tiempo y (–) temperatura de gelificación de sistemas mixtos ß-lg 9% p/p - PGA 1,25% p/p. Variedad de PGA: A: KLVF, B: KO, C: MAN.

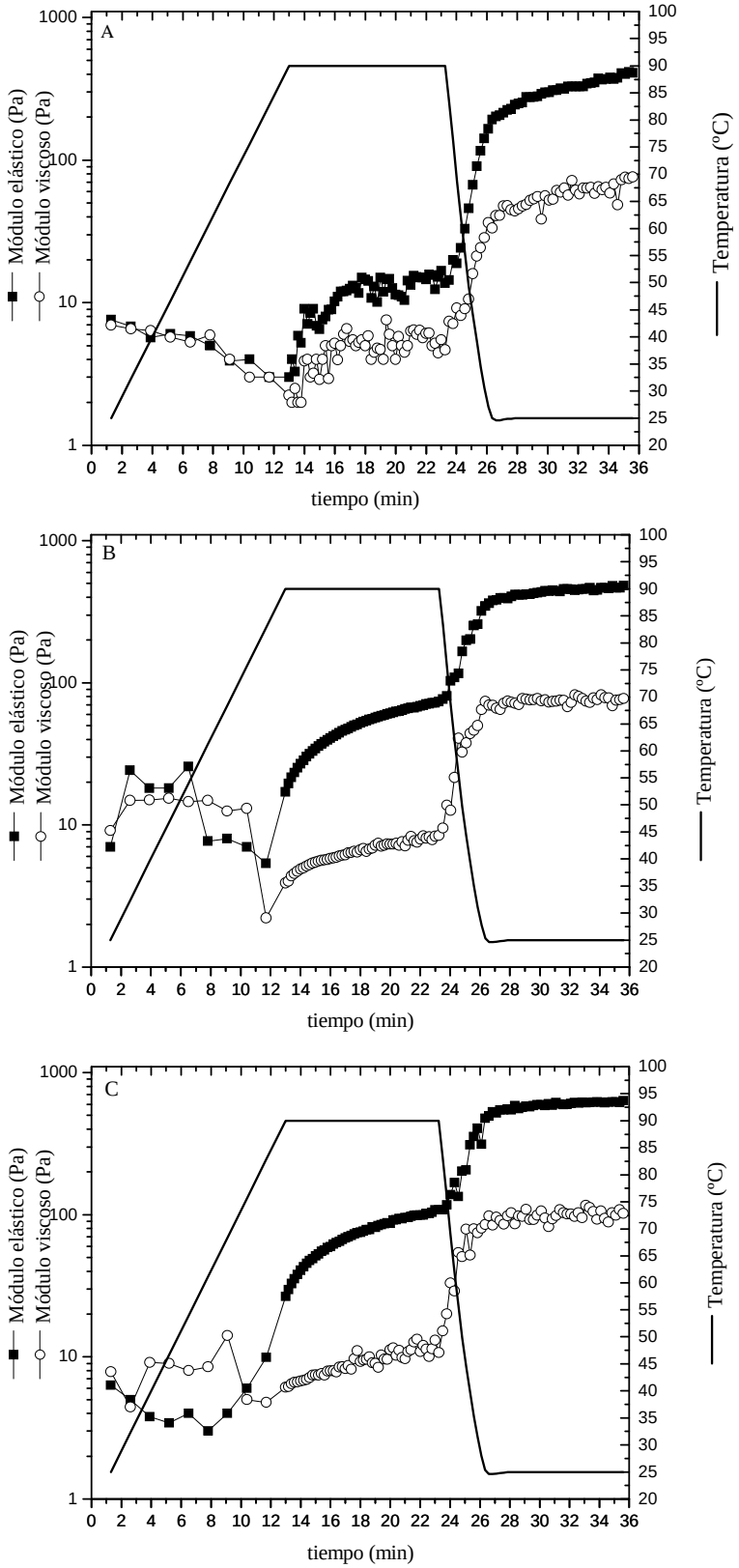


Figura 2. Evolución de (■) G' y (○) G'' versus tiempo y (–) temperatura de gelificación de sistemas mixtos ß-lg 7% p/p - PGA 1,25% p/p. Variedad de PGA: A: KLVF, B: KO, C: MAN.

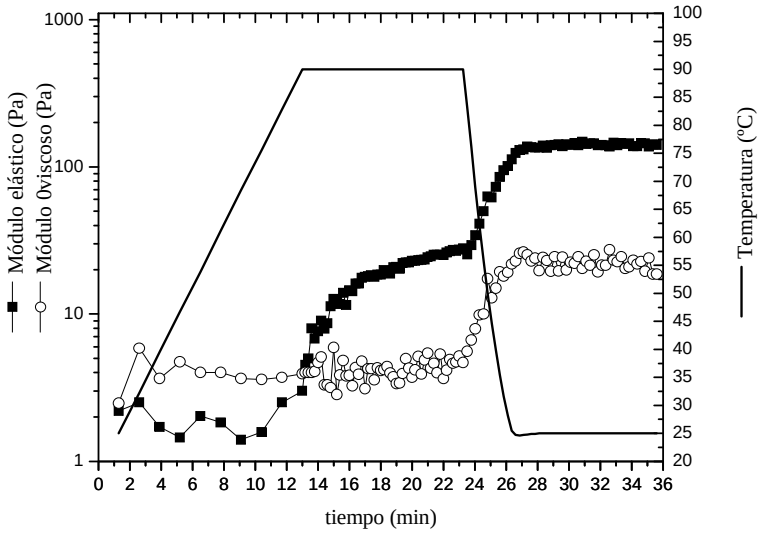


Figura 3. Evolución de (■) G' y (○) G'' versus tiempo y (–) temperatura de gelificación del sistema mixto ß-lg 5% p/p - KLVF 1,25% p/p.

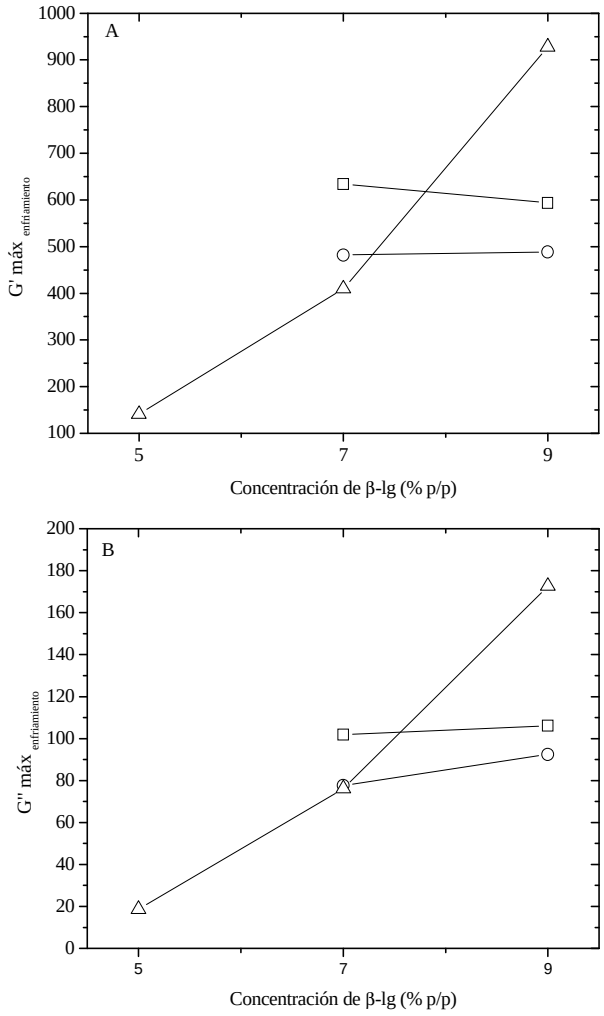


Figura 4. (A) G' máximo de enfriamiento y (B) G'' máximo de enfriamiento versus concentración de ß-lg para sistemas mixtos ß-lg – PGA con 1,25% p/p de PGA. Variedad de PGA: (□) MAN, (○) KO, (Δ) KLVF. Temperatura 25 *ºC*.

A partir de los reogramas (**Figura 1**, **2** y **3**) se obtuvieron el tiempo y la temperatura de gelificación de cada sistema. La **Figura 5** muestra la temperatura de gelificación (T_{gel}) donde puede observarse que para los sistemas mixtos con KO y MAN no se obtuvo gran diferencia en las T_{gel}, aunque hubo una tendencia de disminución de la temperatura con el aumento de la concentración de ß-lg en los sistemas. En cambio, para los sistemas mixtos con KLVF se observó una enorme disminución de la T_{gel} con la concentración de proteína variando desde 90 ºC a 46,7 *ºC*. En la **Figura 5** se indica además, la T_{gel} de una solución de ß-lg al 15% p/p, concentración mínima necesaria para la gelificación de esta proteína, y se observó que excepto la solución mixta con 5% p/p de proteína, todos los sistemas mixtos gelificaron a temperaturas mucho menores que esa T_{gel} de la proteína sola (89 *ºC*), aun con concentraciones de proteína más bajas. La misma tendencia se observó al analizar la velocidad de gelificación (V_{gel}) (**Figura 6**) obtenida a partir de la inversa del tiempo de gelificación (t_{gel}), donde se observa una mayor velocidad en los sistemas con mayor concentración de proteína y principalmente en presencia de KLVF.

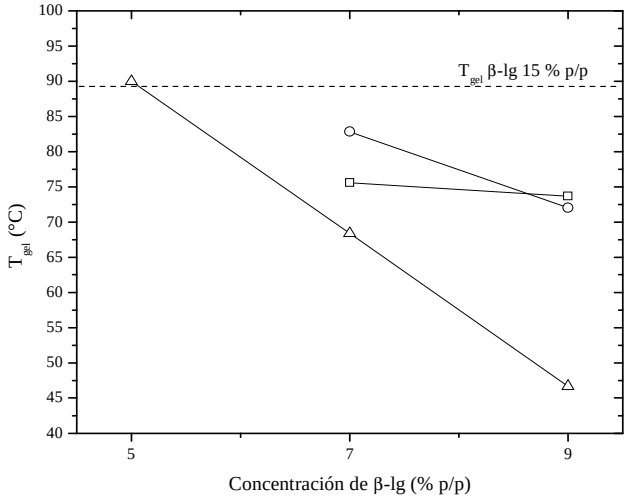


Figura 5. T_{gel} (*ºC*) versus concentración de ß-lg para sistemas mixtos ß-lg – PGA con 1,25% p/p de PGA. Variedad de PGA: (□) MAN, (○) KO, (Δ) KLVF. Con línea punteada se indica la T_{gel} de ß-lg al 15% p/p.

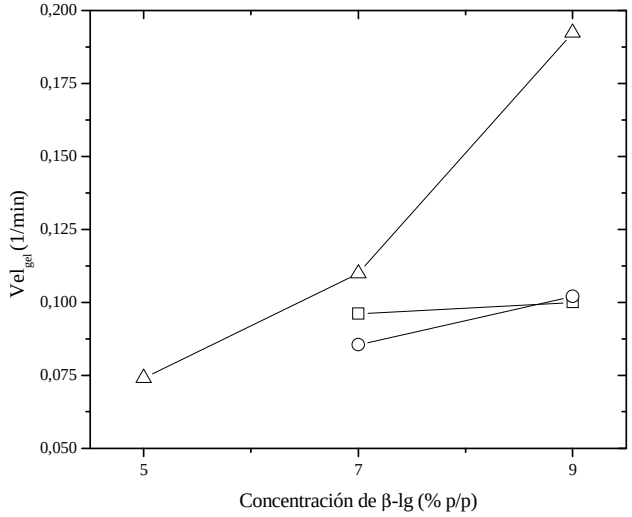


Figura 6. V_{gel} (1/min) versus concentración de ß-lg para sistemas mixtos ß-lg – PGA con 1,25% p/p de PGA. Variedad de PGA: (□) MAN, (○) KO, (Δ) KLVF.

El hecho de que la proteína gelifique en presencia de los alginatos de propilenglicol, en concentraciones donde observamos que la proteína sola no gelificaba demuestra que existe un efecto sinérgico en estos sistemas mixtos. Este efecto sinérgico se puede atribuir a que en las condiciones del ensayo (pH 7) ambos biopolímeros se encuentran con igual carga neta, lo que produce repulsión entre ellos. La separación de fases de proteínas y polisacáridos ocurre por encima de una concentración crítica, en ninguno de los sistemas estudiados se observó separación macroscópica de fases. A bajas concentraciones, la proteína y el polisacáridos coexisten en una fase única donde los biopolímeros existen en dominios los cuales se excluyen mutuamente unos a otros, situación que aumenta la actividad termodinámica de cada uno y aumenta la "concentración efectiva" de cada biopolímero, lo que resulta en cambios específicos sobre las propiedades funcionales, aumentando así la ocurrencia de fenómenos que se darían a mayores concentraciones (Carp *et al.* 2001, Tolstoguzov 1997). Una consecuencia de esto es la disminución de la concentración crítica para la gelificación y la aceleración del proceso de agregación (Capron *et al.* 1999, Ould Eleya y Turgeon 2000).
Es importante resaltar que el aginato de propilenglicol es un polisacárido lineal que contiene grupos carboxilo. La incompatibildad termodinámica disminuye en el siguiente orden polisacáridos con grupos carboxilo > polisacáridos neutros > polisacáridos con grupos sulfato, además los polisacáridos lineales son más incompatibles con las proteínas que los polisacáridos ramificados (Grinberg y Tolstoguzov 1997). Por lo tanto, el PGA sería un polisacárido que provoca gran incompatibilidad con las proteínas.
Numerosos autores encontraron un comportamiento similar en mezclas de proteínas y polisacáridos (Kampf y Nussinovitch 1997, Mleko *et al.* 1997, Neiser *et al.* 2000, Ould Eleya y Turgeon 2000, Schorsch *et al.* 2000, Baeza *et al.* 2002) y la principal causa del efecto sinérgico encontrado es también la incompatibilidad termodinámica entre los diferentes biopolímeros.

CONCLUSIONES

La presencia de los tres PGA promueve la gelificación de ß-lg a concentraciones donde la proteína sola no gelifica, debido a un aumento en la "concentración efectiva" que se produce por efecto de volúmenes de exclusión.
Además, KLVF induce la gelificación de ß-lg a concentraciones menores que MAN y KO lo que podría atribuirse a su mayor viscosidad y menor grado de esterificación, que promueven una mayor incompatibilidad termodinámica con la proteína.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y la Universidad de Buenos Aires.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baeza RI, Carp DJ, Pérez, OE, Pilosof AMR. 2002. κ-carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 35: 741-747.

BeMiller JN, Whistler RL. 1996. Carbohydrates. En: Fenema OR, editor. Food Chemistry, 3ª ed., New York: Marcel Dekker.

Capron I, Nicolai T, Durand D. 1999. Heat induced aggregation and gelation of β-lactoglobulin in the presence of κ-carrageenan. Food Hydrocolloids, 13: 1-5.

Carp DJ, Bartholomai GB, Relkin P, Pilosof AMR. 2001. Effects of denaturation on soy protein–xanthan interactions: comparison of a whipping–rheological and a bubbling method. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 21: 163-171.

de Wit JN. 2009. Thermal behavior of bovine β-lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. A review. Trends in Food Science & Technology, 20: 27-34.

Donovan M, Mulvihill DM. 1987. Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. Irish Journal of Food Science and Technology, 11: 87-100.

Dziezak JD. 1991. A focus on gums. Food Technology, 45: 117-132.

Grinberg VY, Tolstoguzov VB. 1997. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. Food Hydrocolloids, 11: 145-158.

Harnsilawat T, Pongsawatmanit R, McClements DJ. 2006. Characterization of beta lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. Food Hydrocolloid, 20: 577-585.

Hoffmann MA, van Mil P, de Kruif CG. 1995. Thermal denaturation and aggregation of β-lactoglobulin studied by differential scanning calorimetry. En: Dickinson E, Lorient D, editors. Food Macromolecules and Colloids Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. pag 171-177.

Hoffmann MAM, van Miltenburg JC, van der Eerden JP, van Mil PJJM, de Kruif CG. 1997. Isothermal and scanning calorimetry measurements on β-lactoglobulin. The Journal of Physical Chemistry B, 101: 6988-6994.

Kampf N, Nussinovitch A. 1997. Rheological characterization of κ-carrageenan soy milk gels. Food hydrocolloids, 11(3): 261-269.

Le Bon C, Nicolai T, Durand D. 1999. Growth and structure of aggregates of heat-denatured β-lactoglobulin. International Journal of Food Science and Technology, 34: 451-465.

Manderson GA, Creamer LK, Hardman MJ. 1999. Effect of heat treatment on the circular dichroism spectra of bovine β-lactoglobulin A, B, and C. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 4557-4567.

Mc Swiney M, Singh H, Campanella OH. 1994. Thermal aggregation and gelation of bovine β-lactoglobulin. Food Hydrocolloids, 8: 441-453.

Mleko S, Li-Chan ECY, Pickus S. 1997. Interactions of κ-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. Food Research International, 30(6): 427-433.

Morris VJ. 1998. Gelation of polysaccharides. En: Functional properties of food macromolecules. pag 143-226.

Mulvihill DM, Donovan M. 1987. Whey proteins and their thermal denaturation – A review. Irish Journal of Food Science and Technology, 11: 43-75.

Neiser S, Draget KI, Smidsrod O. 2000. Gel formation in heat-treated bovine serum albumine-κ-carrageenan systems. Food Hydrocolloids, 14: 95-110.

Ould Eleya MM, Turgeon SL. 2000. Rheology of κ-carrageenan and β-lactoglobulin mixed gels. Food Hydrocolloids, 14: 29-40.

Relkin P. 1994. Differential scanning calorimetry: a useful tool for studying protein denaturation. Thermochimica Acta, 246: 371-386.

Relkin P. 1998. Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β-lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. International Journal of Biological Macromolecules, 22: 59-66.

Sarker DK, Wilde PJ. 1999. Restoration of protein foam stability through electrostatic propylene glycol alginate-mediated protein-protein interactions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 15: 203-213.

Schorsch C, Jones MG, Norton IT. 2000. Phase behaviour of pure micellar casein κ-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. Food Hydrocolloids, 14: 347-358.

Stading M, Hermansson AM. 1992. Inhomogeneous fine-stranded β-lactoglobulin gels. Food Hydrocolloids, 5: 455-470.

Tolstoguzov V. 1997. Protein-polysaccharide interactions. En: Damodaran S, Paraf A, editores. Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker. pag. 171-198.

Verheul M, Roefs SPFM, de Kruif KG. 1998. Kinetics of heat-induced aggregation of β-lactoglobulin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 896-903.

Efecto del almacenamiento congelado de calamar (*Illex argentinus*) sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina de aletas

Effect of frozen storage of squid (*Illex argentinus*) on emulsifier properties of actomiosine from fins

Mignino L (1,2), Tomás M (2,3), Paredi M (1,4)

(1) FCAB- Fac. Cs. Agrarias. UNMDP, Ruta 226Km 73.5, Balcarce.
(2) CONICET- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(3) CIDCA Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. La Plata. Calle 47 y 1 16, La Plata (1900), Argentina.
(4) CIC- Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires
Elima_1930@yahoo.com.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del almacenamiento de calamar congelado sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina (AM) obtenida periódicamente de aletas. Se utilizaron hembras maduras, procedentes de buques poteros, congeladas a bordo (T=-30 *ºC*) las que fueron transportadas hasta el laboratorio y almacenadas durante 7 meses a la misma temperatura. A tiempo cero (20 días de captura) y a distintos periodos de tiempo, los ejemplares, fueron parcialmente descongelados, descabezados, eviscerados y separados los mantos de las aletas, éstas luego fueron utilizadas para la extracción de AM. Se prepararon emulsiones aceite en agua (O/W) 25:75, con una concentración de proteínas de 2mg/ml, en buffer fosfato 10mM, conteniendo 0,6M ClNa, utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 S 25N-10G, a 20000rpm, 1min. A las mismas, se les midió Indice de Actividad Emulsificante (IAE) mediante un método turbidimétrico y el BackScattering inicial (BSi) mediante un analizador vertical de barrido (QuickScan). Paralelamente, se determinó el tamaño medio de partículas en volumen D[4,3] de las emulsiones, al inicio de la preparación, con un contador de partículas Coulter LS-230, y se estimó el área interfacial creada. El BSi (Back Scattering a tiempo cero) presentó una disminución hacia el tercer mes del almacenamiento, lo cual se correlacionó con los resultados obtenidos para el IAE, que mostró la misma tendencia, aunque no se observaron diferencias significativas. El análisis del tamaño de partículas de las emulsiones mostró una distribución trimodal en los primeros meses de almacenamiento lo que cambió a bimodal cuando las emulsiones fueron formuladas con AM de aletas con mayor tiempo de almacenamiento. El diámetro medio de partículas en volumen D[4,3] mostró una caída al tercer mes de almacenamiento, luego este parámetro se mantuvo sin cambios hacia el final del almacenamiento para las emulsiones formuladas con AM procedentes de aletas de calamar congelados a tiempos largos. Estos resultados sugieren que el almacenamiento congelado afectaría las proteínas, a tiempos cortos, favoreciendo sus propiedades emulsificantes, mientras a que tiempos más prolongados no se modificaría notoriamente dicha propiedad.

ABSTRACT

The aim of the present work was to analyze the effect of the frozen storage of squid on the emulsifying properties of actomyosin (AM) obtained periodically from fins. Mature female squids *I. argentinus* (de Castellanos) were harvested by commercial vessel on the patagonian shelf. The samples were frozen on board in blocks at -30°C and stored for 7 months. The specimens were gutted and cleaned and after separation of mantles peeled off fin were used for actomyosin extraction. The emulsions (O/W) 25:75 were prepared. The AM a 2mg/ml protein solution (phosphate buffer, pH7, 10mM, 0,6M ClNa) and sunflower oil were homogenized in an Ultra-Turrax T25-10G at 20000rpm for 1min. The emulsion activity index (EAI) by the turbidimetric method and Initial Backscattering (BSi) by a Vertical Scan Analyzer (QuickSCAN) were determined. In addition, the particle size distribution of droplets was determined and the Sauter Mean diameter D[4,3] expressed in differential volume was calculated on the initial emulsion by a laser scattering using a counter Coulter LS-230. A decreased in the initial BSi to 3 months of the storage was observed. The EAI showed the same behavior, though the difference is

not statistically significant. Emulsion prepared with AM from fin frozen stored for a short period exhibited a trimodal distribution. For long periods were bimodal. The D[4,3] showed a fall since 3 months of storage thereafter remained unchanged up to the end of study. These results suggest that the short frozen storage period affects the protein and show better emulsifying properties than long frozen storage period. On the other hand long frozen storage period will not affect significantly this property.

PALABRAS CLAVE: *emulsión, actomiosina, calamar, aletas, almacenamiento congelado.*

KEYWORDS: *emulsion, actomyosin, squid, fins, frozen storage.*

INTRODUCCIÓN

EI calamar (*Illex argentinus*) constituye una de las especies más importantes para nuestro país desde el punto de vista económico, ocupando el segundo lugar en cuanto a las toneladas de captura por año, 233.080 tn, luego de la *Merluza hubbsi* (Redes 2008). Las proteínas son utilizadas ampliamente como componentes en la preparación de alimentos por impartir atributos deseables, lo cual está relacionado con sus propiedades funcionales. Las características funcionales de las proteínas están determinadas por su estructura y conformación. En el procesamiento de productos cárnicos las propiedades funcionales son usualmente descriptas en términos de hidratación, solubilidad, propiedades de superficie, de unión y comportamiento reológicos (Xiong 1994).

En sistemas de alimentos, tipo espumas y emulsiones, uno de los componentes más importantes como estabilizadores interfaciales son las proteínas. La capacidad de éstas para favorecer la formación y la estabilización de emulsiones es importante en la elaboración de muchos alimentos procesados y está relacionada con su habilidad para ubicarse en la interfase y reducir la tensión interfacial. Si bien existen algunos estudios sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de calamar son escasos los conocimientos relacionados con sus propiedades emulsificantes (Mignino *et al.* 2007). Estudios previos han informado que el almacenamiento congelado modifica las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la actomiosina (AM) de calamar. (Paredi y Crupkin 1997, Paredi *et al.* 2006, Mignino *et al.* 2006, Mignino *et al.* 2008).

Por lo tanto profundizar los estudios sobre el comportamiento de la AM de aletas de calamar con el almacenamiento congelado, en su rol como agente emulsificante, es de importancia ya que permitiría dar un mayor valor agregado a dichas proteínas, mediante su empleo en la formulación de diferentes sistemas alimenticios.

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto del almacenamiento congelado de calamar sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina (AM) obtenida periódicamente a partir de aletas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ejemplares, hembras maduras de calamar (*Illex argentinus*), procedentes de buques poteros, los que fueron congelados enteros a bordo en bloques (T -30 *ºC*), transportados al laboratorio y almacenados congelados a la misma temperatura durante 7 meses a la misma temperatura. A tiempo cero (20 días de captura) y a distintos periodos de tiempo (0, 1, 3, 5 y 7 meses), 3-4 ejemplares fueron parcialmente descongelados, descabezados, eviscerados y separados los mantos de las aletas, éstas luego fueron utilizadas para la extracción de AM y la preparación de las emulsiones.

Preparación de actomiosina

La extracción y purificación de actomiosina (AM) se realizó según lo descripto por Paredi *et al.* (1990). Los precipitados de AM purificada fueron resuspendidos en Buffer fosfato 0,01M, (pH 7) conteniendo 0,6M NaCl. Todos los pasos se realizaron a 0-4 *ºC*.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de actomiosina, fue determinada por el método de Lowry Lowry et al. (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Sigma Chemical Co., USA).

Preparación de las emulsiones O/W

La preparación de las emulsiones se llevó a cabo utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 S 25N-10G, con un rotor de 7.5mm de diámetro a 20000 rpm, 1 min. Se formularon emulsiones aceite en agua (O/W) 25:75 (P/V), concentración 2mg/mL de proteína, en buffer fosfato 0.01M, 0,6M NaCl.

Análisis de estabilidad de las emulsiones

Se monitoreó utilizando un analizador vertical de barrido (QuickSCAN) mediante el cual se obtuvo la caracterización óptica de las dispersiones estudiadas. Las muestras son analizadas contenidas en una celda cilíndrica de vidrio. El Quick Scan posee una cabeza lectora móvil compuesta por una fuente pulsátil de luz y dos detectores sincrónicos: uno a 0°, detector de transmisión (T), que recibe la luz que atraviesa la muestra y otro a 135°, detector de Back Scattering (BS), que recibe la luz dispersada por la muestra. La cabeza lectora realiza un barrido a lo largo de la longitud de la celda, obteniendo los valores de ¨Transmisión¨ y ¨Back Scattering¨, por lo tanto, se registra el flujo de luz transmitida y dispersada en función de la altura de la muestra a distintos tiempos de análisis, pudiéndose analizar los mecanismos y las cinéticas de desestabilización de las emulsiones. El estudio de cada emulsión se realizó durante un período de 1 h con mediciones efectuadas cada 1 min. Se graficó el valor medio de la variación de BS (Back Scattering) en una zona determinada del tubo en función del tiempo y se analizó la cinética correspondiente a cada emulsión a tiempo cero (BSinicial).

Índice de actividad emulsificante (IAE)

El IAE de la actomiosina purificada se determinó de acuerdo al método descripto por Pearce y Kinsella (1978). Se homogeneizaron 2mL de aceite de girasol puro y 6 mL de 0,1% de actomiosina en un Omni-Mixer Sorvall 17106 x 1min, con un micro homogeneizador a 5000 rpm. Se tomaron 50µl de la emulsión de la base del recipiente los que fueron diluidos en 5 mL de buffer fosfato 0,01M, pH 7, conteniendo 0,1% (P/V) de dodecilsulfatosódico (SDS). La lectura de la absorbancia a 500nm inmediatamente después de preparar la emulsión fue expresada como Índice de Actividad Emulsificante (IAE).

Análisis del tamaño de partículas

Se determinó la distribución de tamaño de partículas de las emulsiones a tiempo inicial, en un contador de partículas Coulter LS-230. Se estimó el área interfacial creada a través de las determinaciones de los diámetros medios de gota en superficie [3,2] y en volumen [4,3]. Las mediciones de las emulsiones se realizaron en presencia y en ausencia de SDS (1%)

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza y el Test de Duncan de rangos múltiples, usando el programa Statistica/MAC. Statistica/Mac (1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de Back Scattering inicial (BSi) e Indice de Actividad Emulsificante (IAE), para emulsiones formuladas con AM de aletas de calamar almacenadas congeladas, se muestran en la **Figura 1**. En función del tiempo de almacenamiento congelado se observó una caída significativa ($p \leq 0,05$) en los valores de BSi, a partir del tercer mes, manteniéndose luego, sin cambios hacia el final del mismo. Esto estaría indicando un mejor comportamiento superficial de las proteínas por efecto del almacenamiento congelado a tiempos cortos, lo cual esta relacionado con la presencia de una mayor cantidad de gotas a partir de la formación de la emulsión, detectadas por el equipo. Además esta información se correlaciona con la obtenida mediante el método turbidimétrico, donde pudo observarse la misma tendencia, si bien no se detectaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el IAE. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente para emulsiones formuladas con AM proveniente de mantos de calamar para tiempos de almacenamiento cortos (Mignino *et al.* 2007).

En la **Figura 2** se muestra la distribución del tamaño de partículas en volumen, para las emulsiones O/W, formuladas con AM de aletas de calamar almacenado congelado. Las curvas de distribución de tamaño de partículas correspondiente a dichas emulsiones permiten la caracterización inicial de las mismas. Las emulsiones formuladas con AM de tiempos cortos de almacenamiento mostraron una distribución trimodal, siendo la población correspondiente al pico 2 la que contribuye en mayor proporción, con un diámetro medio de 98, 80µm para las partículas que la conforman y en menor medida la población cuya media es de 25.72µm, (**Figura 2**). En cambio, en las emulsiones formuladas con AM de aletas, a tiempos más largos de almacenamiento las distribuciones de partículas tienen una distribución de tipo bimodal, observándose una disminución significativa de la contribución de partículas que corresponde al pico 2. Este comportamiento estaría indicando que se obtienen emulsiones con un tamaño de partículas más uniformes a tiempos prolongados de almacenamiento. Estos resultados se correlacionan con trabajos previos realizados en AM de manto y aletas de *Illex*

argentinus los cuales demostraron cambios en las propiedades fisicoquímicas y funcionales en función del almacenamiento congelado (Paredi y Crupkin 1997, Mignino *et al.* 2006).

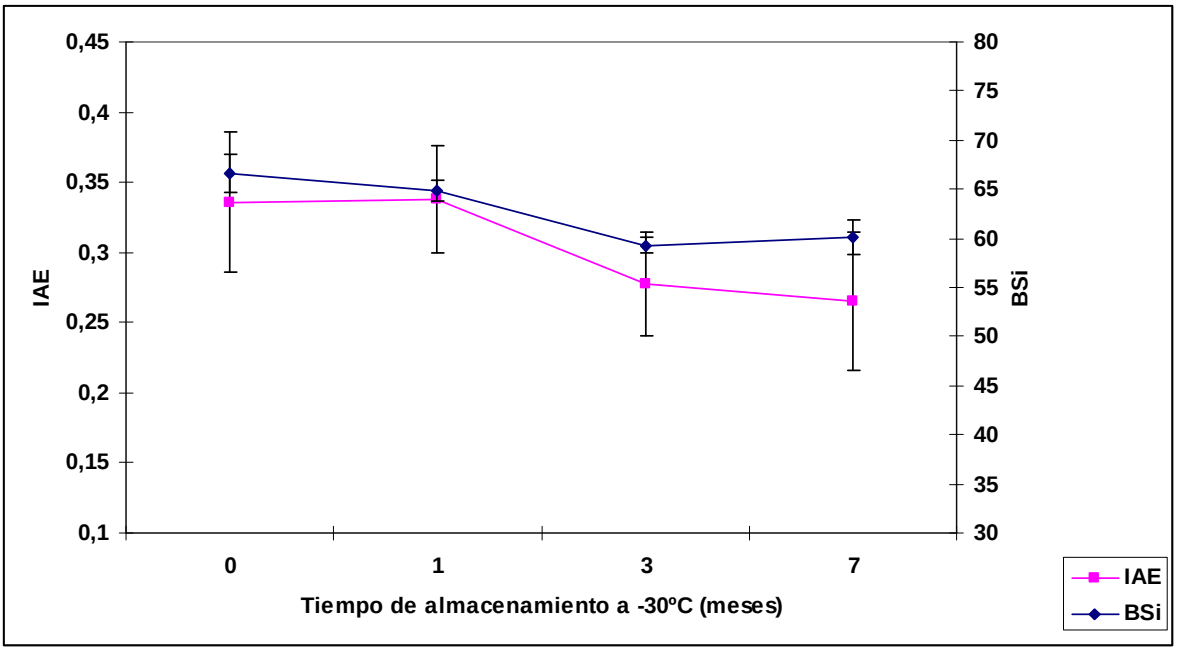


Figura 1. Evolución del BackScattering inicial (BSi) y del IAE (Índice de Actividad Emulsificante) de emulsiones O/W, (25:75), aceite en solución de actomiosina de aletas de calamar en función del tiempo de almacenamiento congelado. Valores promedios ± SD.

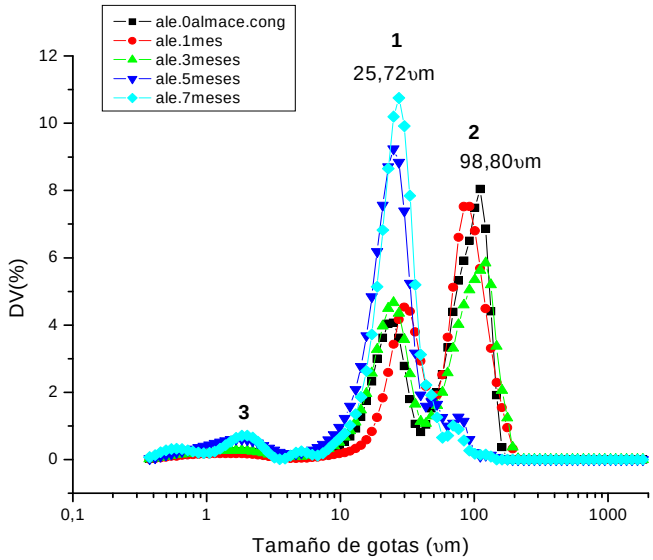


Figura 2. Distribución del tamaño de partículas en Volumen (%) para emulsiones (O/W) 25:75, de actomiosina de aletas de calamar almacenado a –30 *ºC* en función del tiempo de almacenamiento congelado. 1, 2 y 3 picos representativos de la curva.

Paredi *et al.* (2006) informaron sobre la presencia de actividad proteolítica en AM de manto de ejemplares inmaduros de *Illex argentinus*, mostrando una degradación de la cadena pesada de miosina (MHC), con la aparición y/o el incremento de componentes polipeptídicos de menor peso molecular. En el mismo trabajo se sugirió que durante el almacenamiento congelado de calamar hay modificaciones en la proteína mayoritaria con proteólisis seguida de desnaturalización-agregación. Cambios en algunos parámetros fisicoquímicos y funcionales de las proteínas de esta especie, como la

caída de los valores de viscosidad reducida y el aumento de la hidrofobicidad superficial por efecto del almacenamiento congelado también fueron informados (Mignino *et al.* 2008). En virtud de lo expuesto, la AM sufriría cambios estructurales, debidos a los procesos de congelación y almacenamiento congelado y a la actividad proteolítica presente, la que impartiría diferentes actividades superficiales a las proteínas. Resultados similares fueron obtenidos para emulsiones obtenidas a partir de AM de manto de calamar almacenados congelados (Mignino *et al.* 2007).

El análisis de la emulsiones en presencia y en ausencia de SDS, permite evidenciar la presencia de agregados de gotas ¨flóculos¨ a través de la disociación de los mismos. Por otro lado, la floculación, esta relacionada con la asociación de las gotas de aceite facilitada por las fuerzas netas atractivas entre partículas. La estructura y propiedades de los flóculos dependen de la magnitud de las fuerzas atractivas entre las gotas y la fracción volumétrica de aceite. A bajas fracciones volumétricas (emulsiones diluídas) y con fuerzas atractivas débiles pueden resultar emulsiones débilmente floculadas con flóculos de número pequeño de gotas. Sin embargo, si las fuerzas atractivas son muy fuertes, pueden ocurrir grandes agregados, aún en emulsiones diluidas. Dependiendo del tipo de surfactante empleado, interacciones adicionales como las hidrofóbicas y de hidratación (repulsivas) entre los surfactantes adsorbidos al *film* pueden ser importantes en la promoción o retraso de la floculación de las gotas de aceite (Damodaran 2005). La principal fuerza que previene o retarda significativamente la floculación de gotas de aceite, en emulsiones alimentarias son las estéricas repulsivas. Esto es particularmente muy dominante en emulsiones estabilizadas por proteínas y otros surfactantes poliméricos. En la **Figura 3** se muestra la distribución de partículas en volumen, evaluadas en presencia y ausencia de SDS. Para las emulsiones formuladas a tiempos cortos, se pudo observar que la población que corresponde a mayor tamaño de partículas estaría conformada por el agregado de gotas o flóculos, favorecido por el tipo de uniones atractivas. En este sentido, éste proceso de desestabilización no se estaría evidenciando en emulsiones formuladas con AM de aletas almacenadas a tiempos más largos, sugiriendo que las emulsiones serían más estables frente a éste mecanismo, como resultado de los diferentes tipos de interacciones involucradas.

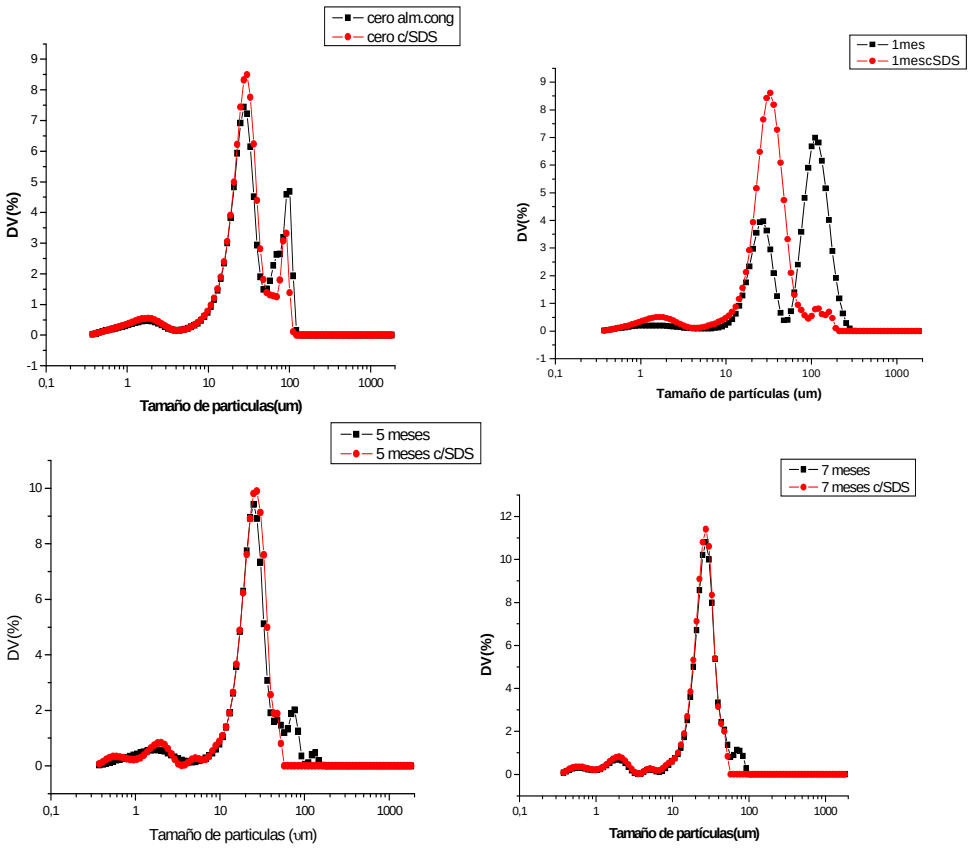


Figura 3. Distribución del tamaño de partículas, en Volumen (%) para emulsiones (O/W) 25:75, de actomiosina de aletas de calamar almacenado a –30 *ºC* a distintos tiempos de almacenamiento congelado. (t = 0, 1, 5 y 7 meses de almacenamiento congelado con y sin SDS 1%).

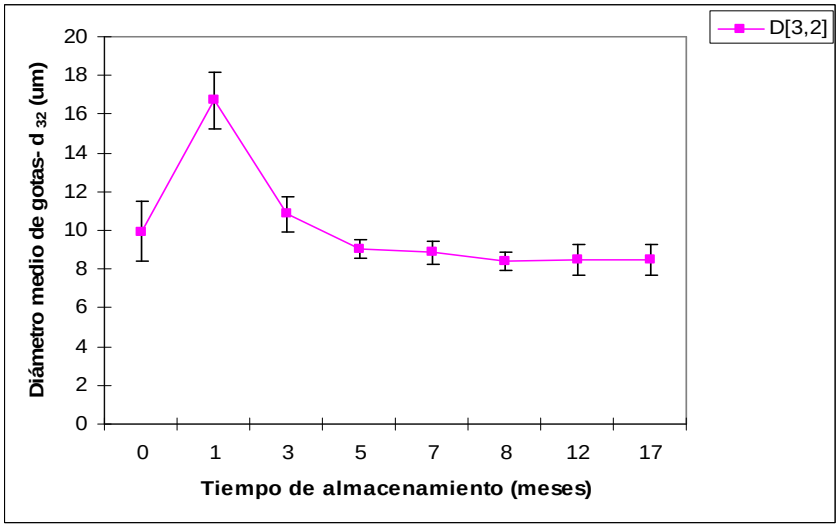


Figura 4. Efecto del almacenamiento congelado sobre el Diámetro medio de partículas en superficie $D_{3,2}$ para emulsiones o/w (25:75), de AM de aletas de calamar almacenado a -30 *ºC*. Valores promedios ± SD.

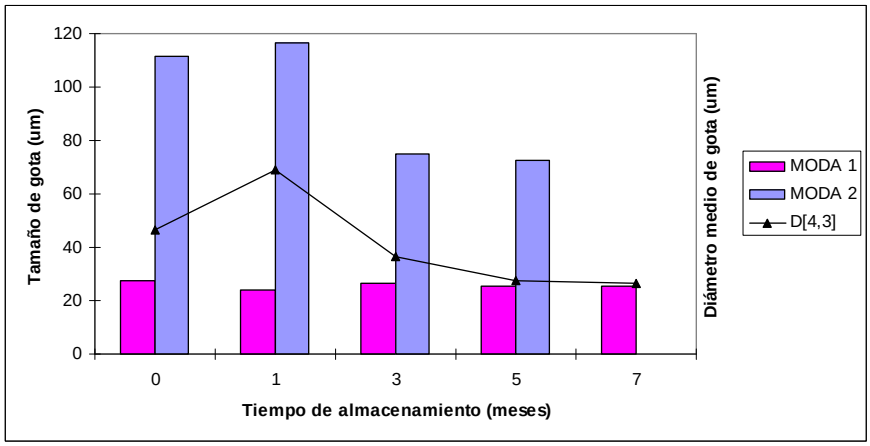


Figura 5. Moda 1 y 2 (tamaño de gota correspondiente al máximo punto de cada pico) y D[4,3] diámetro medio de partículas en volumen de emulsiones O/W, (25:75), aceite en solución de actomiosina de aletas de calamar en función del tiempo de almacenamiento a –30 *ºC*. Valores promedios ± SD.

El análisis de los diámetros medios de partículas, el D[3,2] mostró un incremento en los primeros meses, luego disminuyó significativamente ($p<0,05$) y se mantuvo sin cambios hacia el final del almacenamiento (**Figura 4**), éste parámetro está relacionado con un aumento del área interfacial creada al formar la emulsión. Este comportamiento está de acuerdo con lo observado para la distribución del tamaño de partículas (**Figura 3**) donde se evidencia la presencia de agregados de gotas (flóculos). Con respecto a la evolución del D [4,3], valores significativamente ($p<0,05$) más altos de este parámetro, fueron observados para los primeros meses de almacenamientos con una caída significativa a partir de los 3 meses, no detectándose modificaciones posteriormente. El análisis de las modas (tamaño de las partículas correspondientes al punto máximo de cada pico) fue realizado a fin de poder determinar la contribución de cada población de partículas a los valores de D[4,3] (Márquez *et al*. 2007). La **Figura 5** permite observar que la moda correspondiente a la población de partículas de menor tamaño (moda 1) (**Figura 2**) no presenta cambios en función del tiempo de almacenamiento congelado. Sin embargo, el valor de la moda correspondiente a la población de partículas de mayor tamaño (moda 2) tuvo un descenso significativo a los 3 meses hasta no detectarse a los 7 meses de almacenamiento congelado. Este hecho puede correlacionarse con la disminución del D[4,3] observada en los primeros meses, mientras que hacia el final del almacenamiento, dichos valores se corresponderían fundamentalmente con las partículas de menor tamaño (moda 1). Un comportamiento

similar se observó para emulsiones formuladas con AM de manto de calamar almacenado congelado (Mignino *et al.* 2007). Trabajos previos realizados con AM de manto y aletas de calamar, han mostrado que la proteína extraída periódicamente de manto y aletas de calamar almacenado congelado sufre modificaciones estructurales que afectan sus propiedades superficiales (Mignino *et al.* 2006, Mignino *et al.* 2008).

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el diferente comportamiento observado en las características emulsificantes de la AM de aletas con el almacenamiento congelado podría estar relacionado con los cambios estructurales que sufre dicha proteína. Dichos cambios incidirían en la obtención de emulsiones con estabilidades diferentes frente al proceso de floculación, debido a distintos tipos de interacciones que se producirían por dichos cambios estructurales en función del tiempo de almacenamiento congelado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Repsol-YPF por brindarnos el equipo Coulter LS-230.A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), a la UNMDP- Agencia FONCyT (PICT 06 N°1264), por la subvención de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Damodaran S. 2005. Protein Stabilization of emulsions and foams. Journal of Food Science, 70, 3: 54-59.

Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement whit the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275

Márquez AL, Palazolo GG, Wagner JR. 2007. Water in oil (w/o) and double (w/o/w) emulsions prepared with spans: microstructure, stability, and rheology. Colloid and Polymer Science, 285, 10: 1119 - 1128.

McClements DJ. 1999. Food emulsions: Principles, practice and techniques. CRC, New York.

Mignino L, Crupkin M, Paredi ME. 2006. Efecto del almacenamiento congelado sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de aletas de calamar *(Illex argentinus*). Proceeding del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Tomo I: 234-242. ISBN- 987-22165-1-7. Publicado en CD

Mignino L, Tomás M, Paredi ME. 2007. Efecto del almacenamiento congelado de calamar (*Illex argentinus*) sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina de manto. Proceeding del XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Mignino L, Crupkin M, Paredi ME. 2008. Surface hydrophobicity and functional properties of myofibrillar proteins of mantle from frozen-stored squid (*Illex argentinus*) caught either jigging machine or trawling. LWT, 41, 4: 678- 685.

Paredi ME, De Vido de Mattio N, Crupkin M. 1990. Biochemical properties of actomyosin of cold stored striated adductor muscle of *Aulacomya ater ater* (Molina): effect of ionic solutes. J. Aquatic Food Prod. Technol., 3- 4: 133-145.

Paredi ME, Crupkin M. 1997. Biochemical properties of actomyosin from frozen stored mantles of squid (*Illex argentinus*) at different sexual maturation stages. J. Agric. Food Chem., 45: 1629-1632.

Paredi ME, Roldan HA, Crupkin M. 2006. Changes in myofibrillar proteins and lipids of squid (*Illex argentinus*) during frozen storage. Journal of Food Biochemistry, 30: 604–621.

Pearce KN, Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of turbidimetric technique. J Agric. Chem. 26, 3: 716-726

Redes, de la Industria Pesquera Argentina. 2008. Suplemento Redes Setter Nº63: 230- 240. Ed. Segmentos S. A. República Argentina.

Statistica/MAC. 1994. Statistica for Macintosh; Sttatsoft Inc.: Tulsa, OK.

Xiong Y. 1994. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing. Critical Reviews in Food Science and Nut. 34, 3: 293-320.

Evaluación de la calidad de harinas de trigos blandos para la producción de galletitas

Evaluation of soft wheat flour quality for cookie making

Moiraghi M (1), Vanzetti L (2), Bainotti C (2), Helguera M (2), León AE (3), Pérez GT (3)

(1) Subsecretaría CEPROCOR, Ministerio de Ciencia y Tecnología y, Córdoba, Argentina
(2)INTA Marcos Juárez, Córdoba, Argentina
(3) CONICET - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
mmoiraghi@ceprocor.uncor.edu
Av. Valparaiso sn, Cátedra de Química Biologica, Ciudad Universitaria.

RESUMEN

La calidad del gluten afecta la calidad del pan pero no es un factor determinante en la calidad de galletitas, que se encuentra más influenciada por la dureza del grano y el contenido de almidón dañado. Entre los test de predicción de calidad de harinas el índice de retención de agua alcalina (IRAA) predice la calidad galletitera y el perfil de capacidad de retención de solventes (SRC) es un test usado para evaluar la funcionalidad de harinas de trigo para elaborar distintos productos. Este test relaciona cada solvente con un componente de la harina en particular (proteínas, almidón dañado y pentosanos). El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros físico-químicos que tienen mayor influencia sobre la calidad galletitera de las harinas. En el estudio se utilizaron 54 variedades de trigo blando evaluadas por EEA INTA-Marcos Juárez durante los años 2004, 2005 y 2006. Se midió la dureza de grano mediante el índice de tamaño de partícula (PSI) y a las harinas se les determinó proteínas totales (PT), almidón dañado (AD), pentosanos solubles (PS), perfil de SRC e IRAA. Se elaboraron galletitas con el Micro metodo III con algunas modificaciones. A las galletitas se les determinó factor galletita (FG) y textura. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple utilizando FG como variable dependiente. El mejor ajuste del modelo de regresión se determinó usando la eliminación de variables por el método de Backward. El error cuadrado predictivo medio (ECPM) fue calculado como medida de la capacidad del modelo para sugerir el factor galletita. La textura de los granos mostró un amplio rango de dureza desde muy duro a muy blando. El contenido de proteínas totales, almidón dañado y de pentosanos solubles también mostraron un amplio rango de variación. Estas diferencias también se reflejaron en los ensayos de predicción y en el FG. El contenido de almidón dañado de las harinas correlacionó positivamente con el IRAA, SRC carbonato y SRC agua. El análisis de correlación mostró una correlación negativa del FG con almidón dañado y pentosanos solubles lo que indica el efecto negativo del alto contenido de estos componentes hidrofílicos sobre la calidad de las galletitas. La textura de las galletitas correlacionó significativamente con el contenido total de proteínas, SRC carbonato, IRAA y almidón dañado. El análisis de regresión múltiple fue utilizado para desarrollar una ecuación que permita predecir el factor galletita, obteniéndose la siguiente ecuación: FG = 11,41 – 0,29 AD – 0,03 SRCsac – 0,01 SRClac, con un R^2= 0,75 y un error cuadrado predictivo medio, ECPM = 0,15. Los resultados obtenidos muestran una importante relación entre la composición química de trigos blandos y el perfil SRC que permite predecir el factor galletita mediante una ecuación que incluye SRC sacarosa y SRC láctico como variables independientes.

ABSTRACT

Gluten characteristic affects bread quality but is not a determinant factor on cookie quality that is influenced by grain hardness and damaged starch content. It has been shown that alkaline water retention capacity (IRAA) predicts cookie quality of wheat flours. In other hand the solvent retention capacity profile (SRC) is used to evaluate the functionality for end use applications and to select wheat for production of flour with a required functionality. The aim of this study was to determinate the physical-chemical parameters that influence flour cookie quality. Fifty-four introductions from a collection of soft wheat with diverse origin evaluated in INTA- Marcos Juarez during years 2004, 2005 and 2006 were used in this study. Grain texture (particle size index-PSI), total protein content (PT), damaged starch (AD), water soluble pentosans (PS), SRC test and IRAA were determined to the

flours. Cookies were made according to Micro método III with modification. The cookie factor (FG) and hardness were measured. Results were expressed as mean of two. Multiple linear regression was conducted with cookie factor as the dependent variable. Best-fit linear regression model was determined using backward variable elimination. Medium square predictive error (MSPE) was calculated as measure of predictive capacity of model to suggest cookie factor. Grain texture presented a wide range of hardness, from very hard to very soft. Total protein content, damaged starch and water soluble pentosans of flours showed a wide range of values. SRC different values were observed within each SRC solvent from tested soft wheat flour. Damaged starch showed a positive correlation with IRAA (0.59), carbonate SRC (0.75) and water SRC (0.81). Correlation analysis showed a strong negative correlation between FG and damaged starch (-0.77) and water soluble pentosans (-0.70) indicating a negative effect of this hydrophilic component on the cookie quality. The equation developed with multiple regression analysis to predict FG of flour samples was: FG = 11.41 – 0.29 AD – 0.03 sucrose SRC – 0.01 lactic SRC, whit R2= 0.75 and medium square predictive error, MSPE=0.15. The results show a strong relation between chemical composition of soft wheat an SRC profile that can predict cookie factor with a linear regression model that include sucrose SRC and lactic SRC as independent variables.

PALABRAS CLAVE: *galletitas, trigos blandos, SRC.*

KEYWORDS: *cookies, soft wheat, SRC.*

INTRODUCCIÓN

La textura de los granos de trigo, es decir su mayor o menor dureza, es una de las principales características para determinar el uso final de sus harinas. Los trigos pueden clasificarse según su textura en tres clases principales: blandos y duros hexaploides (*Triticum aestivum L.*) y extra duros tetraploides (*T. durum desf.*). Las harinas obtenidas a partir de trigos duros son de textura tosca y contienen almidón dañado, lo que es beneficioso para elaborar panes y otro tipo de productos leudados (Bettge 1995). Además, estos trigos tienen proteínas que pueden formar una red de gluten con capacidad de retener gases durante la fermentación. Los trigos extra duros tetraploides, que presentan un incremento adicional de la dureza, producen harinas con textura más tosca aún, denominadas semolinas, que generalmente se usan para pastas (Hoseney 1994). Las harinas de trigo blando son de textura fina y se usan para elaborar galletitas, tortas y otros productos que no requieren del desarrollo del gluten. En nuestro país el cultivo de estos trigos no está permitido. Frente a la imposibilidad de contar con variedades más apropiadas en la industria se utiliza harina elaborada con trigos pan (*Triticum aestivum*) de baja calidad, a la que se le adicionan aditivos específicos para controlar la formación de gluten, o se realizan modificaciones en el proceso de elaboración. La calidad del gluten o de las gluteninas de alto peso molecular (HMW) afectan la calidad del pan sin embargo en la calidad de galletitas no es un factor determinante; siendo mas influenciado por la dureza del grano, el contenido de almidón dañado y de otras moléculas hidrófilas como pentosanos. El almidón dañado afecta las propiedades de las harinas modificando la capacidad de hidratación, ya que absorbe 3 veces mas agua que el almidón intacto (Bushuk 1998). En la elaboración de galletitas el almidón dañado tiene un efecto negativo ya que una excesiva absorción de agua ocasiona un incremento en la dureza y una disminución del diámetro de la galleta (Gaines *et al.* 1988). De igual modo el exceso de agua produce masas pegajosas que dificultan su laminado y recorte y deben ser horneadas por más tiempo para evaporar el exceso de humedad, aumentando los costos de energía (Bushuk 1998). Además, una baja absorción de agua por parte de la harina provoca una mayor absorción por parte del azúcar, lo que incrementa la formación de jarabe y produce una disminución en la viscosidad de la masa durante el horneado, haciendo que la masa se expanda lo que provoca la obtención de galletitas con mayor diámetro (Slade y Levine 1994). Los pentosanos son un componente minoritario de la harina (2-3%) pero juegan un rol importante en la reología de la masa; son altamente hidrofílicos, absorbiendo más de 10 veces su peso en agua (Kulp 1968, Jelaca y Hlynka 1971). Los pentosanos totales y los solubles en agua se relacionan con un menor diámetro de galleta y menor volumen de bizcochuelos (Kaldy *et al.* 1991). Existen pruebas que permiten predecir el uso final de una harina. El test de capacidad de retención de solventes (SRC) (Método 56-11, AACC 2000) y el Índice de Retención de Agua Alcalina (IRAA) (Método 56-10, AACC 2000) son

protocolos utilizados para evaluar la calidad de los trigos blandos. El perfil de SRC es un test usado para evaluar la funcionalidad de harinas de trigo para elaborar distintos productos. Por su parte el IRAA predice la calidad de las harinas para elaborar galletitas. El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros físico-químicos que tienen mayor influencia sobre la calidad galletitera de las harinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

En el estudio se utilizaron 54 variedades de trigo blando evaluadas por EEA INTA-Marcos Juárez durante los años 2005 y 2006. Se acondicionaron los granos a un porcentaje de humedad de 16% y se molieron en un molino de rodillos Agromatic AG AQC 109 (Laupen, Suiza) provisto con un tamiz de 250 µm. Se utilizo una fracción de la harina obtenida sin tamizar para determinar la dureza de los granos mediante el Índice de Tamaño de Partícula (PSI, Particle Size Index) (Método 55-30, AACC).

Composición de las harinas

Para determinar composición y calidad de las harinas obtenidas se les realizaron los siguientes ensayos fisicoquímicos: **Contenido total de proteínas**: mediante el método de Dumas usando un equipo de determinación de nitrógeno (LECO FP 2000), donde la muestra es carbonizada en un horno a altas temperaturas y por inyección de oxígeno. El N liberado es medido por diferencia de conductividad con un gas de referencia. **Pentosanos solubles**: se determino el contenido de pentosanos solubles por el método de orcinol – HCl (Hashimoto *et al.* 1987). **Contenido de almidón dañado** (Método 76-30ª; AACC 2000) la muestra se digirió con alfa-amilasa fúngica de Aspergillus oryzae (A6211, Sigma Chemical, St. Louis, MO) y se determino el contenido de azucares mediante una titulación.

Calidad de las harinas

Se evaluó la calidad de las harinas con ensayos para trigos blandos que permiten predecir el uso que tendrá la harina. Se realizo el **Índice de Retención de Agua Alcalina (IRAA)**, donde se hidrato la harina en un medio ligeramente alcalino (NaHCO3) y se midió la cantidad de agua retenida después de una centrifugación. El otro método es el **Perfil de Capacidad de Retención de Solventes (SRC)**, donde las harinas se hidrataron con cuatro solventes (carbonato de sodio, sacarosa, ácido láctico y agua) para medir la retención para cada uno. Cada solvente da información de sobre diferentes componentes químicos de las harinas.

Elaboración de galletitas

A partir de las harinas obtenidas se elaboraron galletitas dulces según el Micro método III con algunas modificaciones (León *et al.* 1996), a las cuales se les determinó el Factor Galletita, definido como la relación entre el diámetro y la altura de cuatro galletas tomadas al azar (León *et al.* 1996), se les medio la dureza con un texturómetro (TA.XT2i Texture Analyzer) usando la sonda (HDP/3PB).

Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por duplicado y los datos obtenidos se tratarán estadísticamente con el programa INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina). Los resultados obtenidos fueron comparados por el Método de Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significancia de 0,05. Las relaciones entre los diferentes parámetros medidos fueron evaluados por el método Pearson y los valores de coeficientes de correlación informados son significativos con un $p< 0,05$. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple utilizando FG como variable dependiente. El mejor ajuste del modelo de regresión se determinó usando la eliminación de variables por el método de Backward. El error cuadrado predictivo medio (ECPM) fue calculado como medida de la capacidad del modelo para sugerir el factor galletita

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias significativas entre los valores de textura de granos y composición química de las harinas obtenidas a partir de las 54 muestras estudiadas (**Tabla 1**). Los granos mostraron un rango de textura que va desde muy duro a muy blando. El contenido de proteínas totales, almidón dañado y pentosanos solubles presentaron un amplio intervalo de valores entre las distintas harinas. Estos valores estuvieron comprendidos en el rango informado para trigos blandos por otros autores (Ram and Sigh 2003, Gaines 2000, Finney and Bains 1999).

Tabla 1.Valores de dureza de los granos (PSI), proteínas totales (PT), pentosanos solubles (PS), almidón dañado (AD) perfil de capacidad de retención de solventes (SRC), índice de retención de agua alcalina (IRAA), factor galletita (FG) y textura de las galletitas.

	Valores (%)		
	Mínimo	Máximo	Promedio
PSI	11,60	32,20	23,30
PT	8,40	14,10	10,50
PS	0,30	1,00	0,60
AD	2,50	10,50	4,80
SRCcarb	62,23	98,68	74,57
SRCsac	82,67	122,59	96,67
SRClac	74,35	139,73	105,79
SRCagua	47,92	75,76	57,74
IRAA	54,93	86,39	66,30
FG	4,34	7,56	6,10
Textura	4395	10629	6711

El Perfil de Capacidad de Retención de Solventes es una herramienta muy útil para predecir la calidad de una harina. El SRC se basa en la hidratación de una harina con un set de cuatro solventes donde cada uno provee diferente información química de la muestra. El patrón de comportamiento obtenido para cada solvente se relaciona con la calidad de la harina para elaborar distintos productos de panificación. El SRC de ácido láctico se asocia con las características de las gluteninas; el SRC de carbonato de sodio se asocia con los niveles de almidón dañado; el SRC de sacarosa se asocia con el contenido de pentosanos y el SRC de agua con todos los componentes de la harina capaces de absorber agua (Gaines 2000). Se obtuvo un amplio rango de valores de SRC para cada uno de los solventes (**Tabla 1**). Los valores mínimos encontrados para los cuatro SRC se corresponden con harinas de buena calidad galletitera según los valores informados para trigos blandos (Gaines 2000, Guttieri *et a.l* 2001). Los promedios de SRCagua y SRC carbonato fueron menores y los de SRCsac y SRClac fueron mayores que los observados por Rahm y Singh (2004) quienes evaluaron 50 cultivares de la India seleccionados por su buena calidad para la elaboración de galletitas.

El Índice de Retención de Agua Alcalina es un test utilizado para seleccionar harinas de buena calidad galletitera. El IRAA mide la capacidad de una harina de absorber una solución alcalina, ya que las galletitas se elaboran en un medio ligeramente alcalino que dificulta el desarrollo del gluten, el cual es indeseable en este tipo de productos porque absorbe mucha agua. El IRAA mostró un amplio rango de valores entre 54,93% y 86,39% (**Tabla 1**).

Las harinas de buena calidad galletitera producen galletitas de diámetro grande y altura pequeñas, esto se refleja en un mayor Factor Galletita. Las galletitas elaboradas con las distintas harinas presentaron un amplio rango de FG (desde 4,34 a 7,56) (**Tabla 1**). Estas diferencias también se reflejaron en la textura de las galletitas (entre 4395g y 10629g) (**Tabla 1**).

Las correlaciones obtenidas entre los distintos parámetros se muestran en la **Tabla 2**. El contenido de almidón dañado de las harinas correlacionó positivamente con el IRAA (0,59), SRC carbonato (0,76) y SRC agua (0,82) confirmando el gran poder de absorción de agua de este componente de la harina. El SRC carbonato correlaciono positivamente con almidón dañado (0,76) y con IRAA (0,87) coincidiendo con lo encontrado por Gaines 2000. El SRC láctico no mostró correlación con proteínas totales coincidiendo con lo encontrado por otros autores (Guttieri *et al.* 2001, Gaines 2000). Esto sugiere que el SRClac se encuentra mas asociado a la calidad del gluten que a la cantidad de proteínas de una harina. Los cuatro SRC mostraron una correlación negativa con el FG (SRCsac: -0,70; SRClac: -0,30; SRCcarb: -0,70 y SRCagua: -0,75) coincidiendo con lo encontrado por Gaines (2000) donde mayor diámetro de galletita se correlaciona con menores valores de SRC. El SRCsac mostro una correlación significativa con pentosanos solubles (0,58) acorde a lo encontrado en triticale por Roccia *et al.* (2006).

Tabla 2. Coeficientes de correlación de factor galletita, dureza del grano, proteínas, perfil de capacidad de retención de solventes, pentosanos solubles, almidón dañado, índice de retención de agua alcalina y textura de las galletitas.

	FG	PSI	PT	SRCsac	SRClac	SRCcarb	SRCagua	PS	IRAA	AD
PSI	0,48*									
PT	-0,23	-0,41*								
SRCsac	-0,70*	-0,08	-0,06							
SRClac	-0,30*	0,08	-0,01	0,37*						
SRCcarb	-0,70*	-0,30*	0,12	0,77*	0,19					
SRCagua	-0,75*	-0,39*	0,20	0,68*	0,28*	0,84*				
PS	-0,41*	0,08	-0,20	0,58*	-0,05	0,29*	0,20			
IRAA	-0,49*	-0,19	0,16	0,60*	0,25	0,87*	0,72*	0,12		
AD	-0,77*	-0,54*	0,23	0,50*	0,03	0,76*	0,82*	0,17	0,59*	
Textura	-0,43*	-0,27*	0,50*	0,33*	0,08	0,51*	0,30*	0,16	0,54*	0,27*

*Indica un nivel de significancia (P) menor a 0,05

Existen discrepancias con respecto al efecto de las proteínas totales en el diámetro de la galletita, Gaines *et al.* (1994) encontraron una correlación positiva mientras que Yamamoto *et al.* (1996) informaron correlación nula. En el presente trabajo no se encontró correlación entre el FG y el contenido total de proteínas. La correlación negativa encontrada entre el FG y el SRClac (-0,30) muestra el efecto negativo de un gluten fuerte sobre la calidad galletitera; estos resultados coinciden con lo encontrado por Guttieri *et al.* 2001. Asimismo el FG mostró correlaciones negativas con el IRAA (-0,49), almidón dañado (-0,77) y pentosanos solubles (-0,41) indicando el efecto negativo del alto contenido de estos componentes hidrofílicos sobre la calidad de las galletitas. La textura de las galletitas correlacionó significativamente ($p<0,05$) con el contenido total de proteínas (0,50) coincidiendo con lo encontrado por Gaines *et al.* (1994) y mostrando que el mayor contenido de proteínas produce galletitas mas duras, de menor calidad. Asimismo la textura correlaciono con el SRC carbonato (0,51), el IRAA (0,54) y almidón dañado (0,27) mostrando el efecto negativo de la excesiva absorción de agua en la calidad galletitera. Si bien el contenido de pentosanos disminuye el diámetro de las galletitas, no parece tener influencia sobre la textura de las mismas. Se encontró una correlacione negativa (-0,43) entre el FG y la textura de la galletita, lo que coincide con lo informado por Pareyt et la (2008).

El análisis de regresión múltiple fue utilizado para desarrollar una ecuación que permita predecir el factor galletita: FG = 11,41 – 0,29 AD – 0,03 SRCsac – 0,01 SRClac, con un R^2= 0,75 y un error cuadrado predictivo medio, ECPM = 0,15. Estos resultados sugieren que una harina de buena calidad galletitera puede ser seleccionada basándose en los valores de almidón dañado, SRC de sacarosa y SRC láctico. El AD es el componente que mas afecta la calidad galletitera de una harina, seguido por el contenido de pentosanos, representado en la ecuación mediante el SRCsac; mientras que la calidad proteica de la harina influye menos en la obtención de una galletita de buena calidad.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran una importante relación entre la composición química de trigos blandos y el perfil SRC que permite predecir el factor galletita mediante una ecuación que incluye SRC sacarosa y SRC láctico y almidón dañado como variables independientes. La ecuación permite discriminar la calidad de una harina para la elaboración de galletitas realizando solo tres ensayos. Esto es muy importante en los programas de mejoramiento genético, donde la cantidad de granos de cada muestra es limitada, ya que permite determinar los atributos de calidad de los trigos usando un número reducido de parámetros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC International 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed. Methods 38-10, 44-19, 46-13, 55-30, 56-10 and 76-30A. The Association St. Paul, MN.

Bettege A, Morris C, Greenblatt G. 1995. Assesing genotypic softness in single wheat kernel using starch granule-asociated friabilin as biochemical marker. Euphytica, 86:65-72.

Bushuk W. 1998. Interactions in wheat doughs. In: Interacions: The key to cereal quality. AACC, Inc. St. Paul MN, USA, 1-16.

Finney PN, Bains GS. 1999. Protein functionality diferences in Eastern U.S. soft wheat cultivars and interrelation with end use quality tests. Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 32:406-415.

Guttieri M, Bowwen D, Gannon D, O'Brien K, Souza E. 2001. Solvent retention capacities of irrigated soft white spring wheat flours. Crop Sci., 41:1054-1061.

Gaines CS. 2000. Collaborative study of methods for solvent retention capacity profiles (AACC Method 56-11) Cereal Foods World, 45:303-306.

Gaines CS, Kassuraba A, Finney PL. 1994. Influence of eight flour on the hardness of commercial cookies and crackers. CFW, 39:160-167.

Gaines C, 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 Chem., 65:348-389.

Giroux MJ, Morris CF. 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.

Hashimoto S, Shogren M, Pomeranz Y. 1987. Cereal pentosans: Estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. Cereal Chem., 64:30-34.

Hoseney RC. 1994. Dry milling of cereals. In: Principles of cereal science and technology, 2nd Ed. American Association of Cereal Chemists: St Paul MN. 125-145.

Gaines C. 2000. Report of the AACC committee on soft wheat flour. Method 56-11, Solvent Retention Capacity Profile. Cereal Foods Word, 45:303-306.

Jelaca S, Hlynka I. 1971. Water-binding capacity of wheat-flour crude pentosans and their relation to mixing characteristies of dough. Cereal Chem., 48:211-222.

Pareyt B, Talhaouia F, Kerckhofsb G, Brijsa K, Goesaerta H, Weversb M, Delcoura JA. 2008. The role of sugar and fat in sugar-snap cookies: Structural and textural properties. Journal of Food Engineering, 90(3):400-408.

Kaldy M, Rubenthaler G, Kereliuk G, Berhow M, Vandrecook C. 1991. Relationship of selected flour constituents to baking quality in soft white wheat. Cereal Chem. 65:508-512.

Kulp K. 1968. Pentosans of wheat endosperm. Cereal Sci., 13:414-417.

Ram S, Singh RP. 2004. Solvent retention capacities of Indian wheats and their relationship with cookies-making quality. Cereal Chem., 81(1): 128-133.

Roccia P, Moiraghi M, Ribotta PD, Pérez GT, Rubiolo OJ, León AE. 2006. Use of solvent retention capacity profile to predict ahe quality of triticale flour. Cereal Chem., 83(3)243-249.

Slade L, Levine H. 1994. Structure-function relationships of cookie and craker ingredients. Pp, 23-141 in: The Science of Cookie and Craker Production. H. Faridini, ed. Chapman and May: New York.

Yamamoto H, Worthington ST, Hou G, Ng PKW. 1996. Rheological propierties and baking qualities of selected soft wheats in the United Satates. Cereal Chem., 73:215-221.

Gelación térmica de pasta de aleta de calamar (*Illex argentinus*). Efecto del agregado EDTA

Thermal gelation of finned squid (*Illex argentinus*) paste. Effect of EDTA addition

Ortiz Miranda[1] GS, Manca [2] EA, Paredi [1,3,4] ME

(1) Área de Ciencia de los Alimentos.Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP, Ruta 226 Km. 73,5 , Balcarce, Argentina
(2) Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero(INIDEP), Victoria Ocampo(s/n) Mar del Plata.
(3) Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Bs As.
elima_1930@yahoo.com.ar

RESUMEN

Se investigaron las características de gelación térmica en pasta de aleta de calamar y el efecto de inhibidores de proteasas como ácido etildiamino tetraácetico (EDTA). Con ese fin se formularon pastas en ausencia y presencia de EDTA las que fueron sometidas a dos tratamientos térmicos: calentamiento directo a 85°C o en dos pasos (preincubación a 40°C durante 3 horas y posterior calentamiento a 85°C). A la pasta gelificada se le efectuaron determinaciones de Fuerza de gel, capacidad de retención de agua, blancura y SDS-PAGE. Las muestras con tratamiento directo arrojaron los mayores valores de fuerza de gel. Este comportamiento fue similar al obtenido con pasta de manto de calamar y fueron relacionados a la presencia de actividad proteolítica a la temperatura de preincubación. La capacidad de retención de agua fue significativamente mayor ($p<0.05$) en las muestras obtenidas con tratamiento directo. La pasta obtenida con el agregado de EDTA mostró los mayores valores de fuerza de gel y capacidad de retención de agua para ambos tratamientos. Estos resultados fueron correlacionados con los obtenidos en los perfiles electroforéticos, los que evidenciaron una menor degradación de la cadena pesada de miosina en las pastas formuladas con EDTA. El análisis de blancura no mostró diferencias significativas con el tratamiento térmico utilizado. Estos resultados sugieren que la preincubación desfavorece la fuerza de gel para ambos tipos de pastas. La pasta obtenida con aleta puede ser utilizada para obtener productos gelificados cuando se utiliza el tratamiento de calentamiento directo y es mejorado con el agregado de EDTA. Las aletas podrían ser utilizadas para la elaboración de ciertos productos gelificados que no requieran elevada fuerza de gel

ABSTRACT

The heat-induced gelling characteristics and the effects of proteases inhibitor ethylenedeaminetetracetic acid (EDTA), were investigated in fin squid pastes. Pastes were formuled in presence and absence of EDTA and thermally treated either in one step at 85 °C (direct treatment) or in two steps (pre-incubation at 40 °C during 3 hs followed by heating at 85 °C. On the obtained pastes determinations of gel strength, water holding capacity (WHC), whiteness and SDS-PAGE, were performed. Gels obtained by direct treatment showed higher gel strength and WHC that those obtained in two steps. Irrespective to the procedure used to obtain the gels, EDTA produce an increase of both gel strength and WHC. The SDS-PAGE profiles of gels obtained in presence of EDTA, showed lower degradation of myosin heavy chain that those obtained in absence of inhibitor. Whiteness of the gels was independent of the use thermal procedure and the presence and absence of EDTA. These results suggest that the preincubation produce detrimental effects on gel strength a WHC of the gels. In addition, also suggest that the fin can be used to obtain gelled products in which high gel strength are not necessary.

PALABRAS CLAVE: Gelación *térmica, pasta, aleta, calamar*.

KEYWORDS: *Thermal gelation, paste, fins, squid.*

INTRODUCCIÓN

El calamar (*Illex argentinus*) es una de las especies de cefalópodos más importante a nivel comercial por el volumen de capturas, por la talla de los ejemplares y por la calidad de su carne. Dadas las características de la misma puede ser utilizad para la elaboración de análogos de mariscos y productos reestructurados. Existen estudios de la utilización de proteínas musculares de otras especies de calamar (Gómez Guillén y col., 2003). Sin embargo, las propiedades de gelación térmica de las proteínas miofibrilares del manto de calamar (*Illex argentinus*) son escasos (Paredi y Manca, 2006, 2007). Algunos de esos trabajos refieren a que la actividad proteolítica presente en músculos de estos moluscos afecta fundamentalmente la cadena pesada de miosina disminuye la capacidad de gelación de sus proteínas (Nosawa *et al.* 1992, Gómez-Guillén *et al.*2003). La utilización de ácido etilen diamino tetraacético y fenil-metil sulfonil fluoruro han resultado eficaces para evitar la degradaciòn proteolítica en pasta de manto de *I. argentinus*. Se cuenta con estudios sobre algunas propiedades fisicoquímicas y funcionales de aletas de calamar (Mignino *et al.*, 2007), sin embargo la información acerca de las propiedades de gelación de aleta de calamar es escasa. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue investigar las propiedades de gelación de aletas de calamar y el efecto del agregado de EDTA sobre las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ejemplares de *hembras maduras* de calamar *Illex argentinus* capturados por buques de altura, con poteras en el Océano Atlántico entre las los 42 y 52º de latitud. Los ejemplares fueron congelados a bordo en bolsas de polietileno y mantenidos a -30 *ºC*. Se seleccionaron aquellos bloques cuyo tiempo de congelado no supero los 20 días desde la captura. Antes de su utilización para los diferentes análisis, los bloques fueron parcialmente descongelados a 5-10 *ºC*, por 12 horas.

Preparación de la pasta y gelación térmica.

Los calamares parcialmente descongelados fueron descabezados, eviscerados y separados los mantos y las aletas. Las aletas fueron peladas, cortados en pequeños trozos y homogeneizadas en una procesadora con 3% de NaCl La pasta formada fue tamizada y colocada en recipientes plásticos caso se realizó la inmersión directa en un baño de agua a 85 *ºC*. En el segundo se preincubó a 40 *ºC* por 2 horas con posterior calentamiento a 85 *ºC*, paralelamente se formularon pastas con el agregado de EDTA 5mM, las que fueron procesadas de la forma ya descripta. Luego del calentamiento, los geles obtenidos fueron inmediatamente sumergidos por 2 horas en mezcla agua - hielo y posteriormente almacenados 12 horas en heladera. Una vez removidos de los recipientes plásticos, fueron cortados en cilindros de 3 cm de altura a los que se les determinó: la fuerza de gel en un equipo Instron 4442 y calculada como fuerza de ruptura (g) por la deformación (cm), el color en un colorímetro MINOLTA CR 300 (escala Lab CIE) y la capacidad de retención de agua se cuantificó determinando la humedad expresible (HE) en porciones de 4 gr de pasta gelificada por centrifugación (Pietrasik y Li-Chan, 2002), La HE se calculó como el porcentaje de exudado liberado luego de la centrifugación por 100gr de pasta gelificada. Se realizaron 6 ensayos y las determinaciones se efectuaron por cuadruplicado.

Determinación de blancura.

Con los valores obtenidos del colorímetro Minolta utilizando la escala CIE (L*, a*, b*). La blancura se estableció de acuerdo a lo descripto en un trabajo previo (Lanier, 1992).

Electroforesis en SDS-PAGE 10%

Las pastas gelificadas fueron liofilizadas y solubilizadas en un buffer Tris HCl 20mM pH 8,0 conteniendo 2% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 2% de 2-mercaptoetanol y 8M de urea de acuerdo a lo descripto por Numakura *et al.* (1985). La electroforesis fue realizada según el procedimiento de Laemmli en un equipo mini-slab Sigma. Se utilizaron estadandares de masa molecular de amplio rango de Biorad. Se sembraron alícuotas de 30 µg de muestras solubilizadas a las que previamente se les determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*1951).

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y a test específicos mediante el paquete estadístico Statistica /Mac (Statistica, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoria de los estudios realizados sobre las propiedades de gelación de diferentes especies de calamar se han llevado a cabo utilizando los mantos o tubos, tanto en sistemas modelos como actomiosina (Paredi *et al.*, 1999) o con pasta de músculo (Gomez-Guillén *et al.* 2003, Paredi y Manca 2007). Los estudios realizados con proteínas de aletas de calamar son escasos (Paredi *et al.* 2006).

Los estudios realizados con manto de calamar muestran que la presencia de proteasas del tipo métalo o serin proteasas produce degradación de la cadena pesada de miosina con la consecuente pérdida de la fuerza de gel y eso es dependiente de la temperatura (Nagashima *et al.*, 1992, Paredi y Manca 2007).

En la **Figura 1** se pueden observar los valores de fuerza de gel para la pasta gelificada de aleta de calamar obtenida con distintos tratamientos térmicos en presencia o ausencia de EDTA. Independientemente de la formulación, las pasta gelificada con tratamiento térmico directo mostró los mayores valores de fuerza de gel. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para la pasta obtenida con manto de la misma especie (Paredi y Manca 2007). Es ampliamente aceptado que las propiedades de gelación de surimi (concentrado de proteínas miofibrilares) varía dependiendo de la especie y solo algunas de ellas tienen la capacidad de producir geles traslúcidos y elásticos a temperaturas cercanas a 40 °C, cuando estas proteínas son mezcladas con sal (fenómeno denominado setting). Por ello la preincubación se utiliza con el objeto de mejorar las características de los geles, esto ha sido relacionado con la presencia de transglutaminsa endógena. Sin embargo, la presencia de actividad proteolítica con actividades óptimas entre 30-40°C disminuyen la fuerza de gel, por degradación de la cadena pesada de miosina (Gómez-Guillén *et al.* 2003, Paredi y Manca 2007). Estos resultados fueron relacionados con la presencia de actividad proteolítica a la temperatura de preincubación que afecta negativamente la fuerza de gel (Paredi y Manca 2007) Como se puede observar en la **Figura 1** el agregado de EDTA produjo un incremento significativo ($p<0.05$) en los valores de fuerza de gel para la pasta gelificada en ambos tratamientos. Trabajos previos realizados con pasta de manto de la misma especie de calamar mostraron que el agregado de inhibidores de proteasas EDTA y fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) fueron efectivos para evitar la degradación de la cadena pesada de miosina (MHC), con un resultado más efectivo con el agregado de EDTA (Paredi y Manca 2007). Resultados similares fueron descritos en pasta de manto de *Loligo bleekeri* y *Toradores eblanae* (Nagashima *et al.* 1992, Ayensa *et al.* 2003).

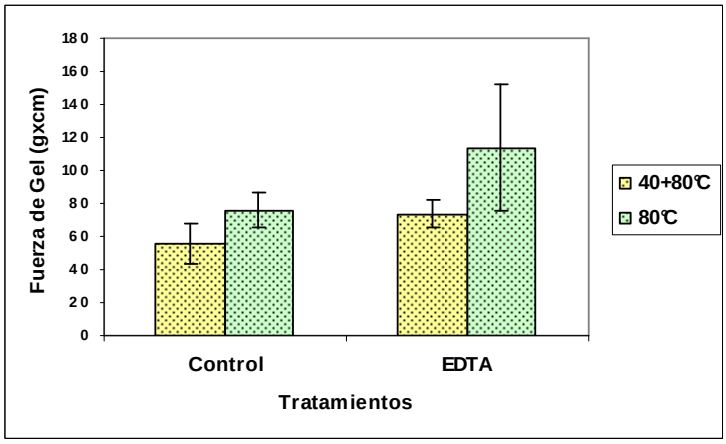


Figura 1. Fuerza de gel de pasta gelificada de aletas de calamar con distintos tratamientos térmicos en presencia y ausencia de EDTA. Se representan los valores promedio ± DS (n=8).

En la **Figura 2** se muestran los valores correspondientes a la humedad expresible para la pasta formulada en presencia y ausencia de EDTA para ambos tratamiento térmicos. Como se puede observar, independientemente de la formulación, la capacidad de retención de agua fue mayor en las muestras con tratamiento directo. EL agregado de EDTA produjo un incremento significativo ($p< 0.05$) de la capacidad de retención de agua para ambos tratamientos térmicos. Es conocido que la capacidad de retención de agua es considerada un buen indicador de textura (Wasson *et al.* 1992). Además diversos autores han informado una correlación positiva entre la pérdida de capacidad de retención de agua y la degradación proteolítica de las proteínas miofibrilares en geles obtenidos de diversas especies pesqueras (Chang-Lee *et al.* 1989, Wasson *et al.* 1992). Algo similar puede estar

ocurriendo con la pasta gelificada de aleta de calamar en donde el agregado de EDTA incremento significativamente la capacidad de retención de agua de los mismos.

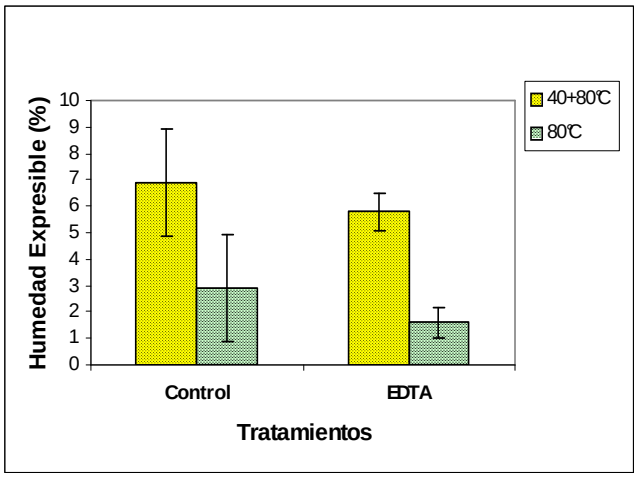


Figura 2. Humedad expresible de pasta gelificada de aletas de calamar con distintos tratamientos térmicos en presencia y ausencia de EDTA. Se representan los valores promedio ± DS (n=8).

En la **Figura 3** se muestra el perfil electroforético correspondiente a las pastas gelificadas de aletas en presencia y ausencia de EDTA y para ambos tratamientos térmicos. Los perfiles en SDS-PAGE mostraron las bandas polipeptidicas características de invertebrados cadena pesada de miosina (MHC) paramiosina (PM), Actina (A) y tropomiosina (TM), pero además una banda de 155kDa relacionado con la degradación de MHC (Paredi *et al.* 1999). Se presentan también 2 bandas polipeptídicas de masa moleculares mayores a MHC que corresponden a dimeros y productos de polimerización de la MHC. Como se observa en la **Figura 3**, las muestras preincubadas presentaron menor intensidad de MHC lo que esta relacionado con la presencia de actividad proteolítica y se correlaciona con la menor fuerza de gel y menor capacidad de retención de agua detallado previamente. Sin embargo, se puede observar también que en las pastas formuladas en presencia de EDTA, para ambos tratamientos térmicos, esta disminución de la MHC fue menor, indicando la inhibición de la actividad proteolitica. Los resultados obtenidos indican que el agregado de EDTA sería efectivo para evitar la degradación de la MHC, sugiriendo la presencia de metalo proteasas. Resultados similares fueron obtenidos con pasta de manto de la misma especie de calamar (Paredi y Manca 2007).

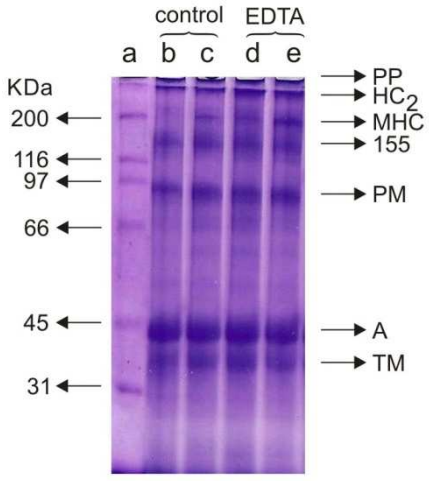


Figura 3. Perfiles electroforéticos de los geles en SDS-PAGE 10% de pasta gelificada de aletas con los distintos tratamientos térmicos en presencia y ausencia de EDTA. PP: proteína polimerizada; HC2: dímeros de MHC; MHC: cadena pesada de miosina, 200 KDa; 155: producto de degradación de MHC; PM: paramiosina, 100 KDa; A: actina, 45 KDa; TM: tropomiosina, 35 KDa. a: Estándar; b: 40+80 *ºC* control; c: 80 *ºC* control; d: 40+80 *ºC* EDTA; e: 80 *ºC* EDTA.

En la **Figura 4** se muestran los valores de blancura para ambos tratamientos térmicos en presencia o ausencia de EDTA. Como se puede visualizar no se detectaron diferencias significativas en la blancura de los geles obtenidos ni con el tratamiento térmico ni por la presencia o ausencia de EDTA. Los valores de blancura obtenidos se encuentran dentro de los considerados óptimos para este tipo de productos (Lanier 1992).

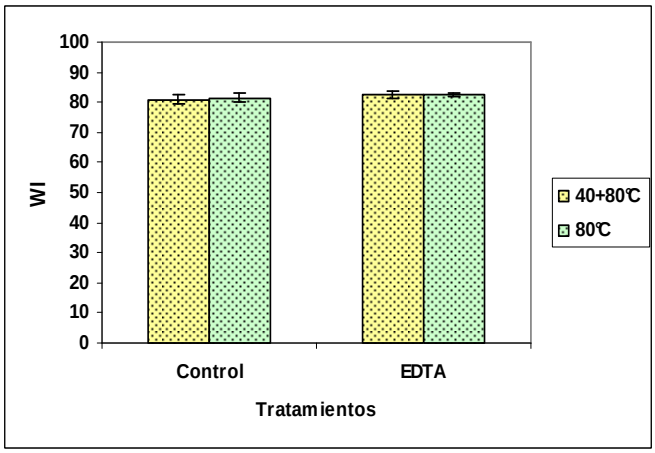


Figura 4. Blancura de pasta gelificada de aletas de calamar con distintos tratamientos térmicos en presencia y ausencia de EDTA. Se representan los valores promedio ± DS (n=8)

CONCLUSIONES

La pasta obtenida con aleta puede ser utilizada para obtener productos gelificados, cuando se utiliza el tratamiento de calentamiento directo para la elaboración de productos gelificados que no requieran elevada fuerza de gel. El agregado de EDTA mejora las características de gelación. Esto brinda la posibilidad de utilizar estos subproductos del procesamiento de calamar en la elaboración de productos de mayor valor agregado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Ing. Alejandra Yommi y la Lic. Natalia Guerra por su colaboración. A la Universidad Nacional de Mar del Plata, Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Bs.As y Agencia FONCYT (Proyecto PICT 06 1264) por la financiación de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayensa MG, Montero MP, Borderias AJ, Hurtado JK. 2002. Influence of some protease inhibitors on gelation of squid mantle. Journal of Food Science, 67:1636-1641.

Chang-Lee MV, Pacheco-Aguilar R, Crawdford DL, Lampila, LE 1989. Proteolytic activity of surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and effects of various protein additives on gel strength. Journal of Food Science, 55: 83-86.

Gómez- Guillén M, Martínez-Alvarez O, Montero P. 2003. Functional and thermal gelation properties of squid mantle protein affected by chilled and frozen storage. Journal of Food Science, 68: 1962-1967.

Lanier TC.1992. Measurement of surimi composition and functional properties. En: Technology. Lanier TC , Lee CM editors. Surimi. 2°ed. New York: Marcel Dekker. pag 123-160.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin reagent . The Journal of Biological Chemistry, 50: 1034-1040.

Mignino LA, Crupkin M, Paredi, M.E. 2006. Efecto del almacenamiento congelado sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de aletas de calamar *(Illex argentinus*). Proceeding del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Sheraton Mar del Plata , 18 al 20 de mayo del 2005. Tomo 1: pág.234-242.

Nagashima Y, Ebina H, Nakai T, Tanaka M, Taguchi T.1992. Proteolysis effects termal gelation of squid mantle muscle . Journal of Food Science, 57: 916-922.

Nozawa H, Maemgoshi S, Seki N. 1992. Partial purifications and characterization of six Transglutaminase from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. Comparative Biochemistry and .Physiology, 118B: 313-317.

Numakura T, Seki N, Kimura I, Toyoda K, Fujita T, Takana K, Arai K. 1985. Cross-linking reaction of myosin in the fish pasta during setting (suwari) Nippon Suisan Gakaishi, 51:1559-1565.

Paredi ME, Davidovich LA, Crupkin M .1999. Thermally induced gelation of squid (*Illex argentinus*) actomyosin influence of sexual maturation stage. Journal Agricultural and Food Chemistry, 47: 3592-3595.

Paredi ME, Manca EA. 2006. Gelación inducida por calor de pasta de manto de calamar (*Illex argentinus*). Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Córdoba 2006, Córdoba. 15 al 17 de noviembre del 2006.

Paredi ME, Manca EA. 2007. Gelación térmica de pasta de manto de calamar (*Illex argentinus*) Efecto de inhibidores de proteasas. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Proceedings AATA, CYTAL 2007. 12 al 14 de septiembre del 2007.

Pietrasik Z, Li-chan ECY. 2002. Binding and textural properties of beef gels as affected by protein K-carrageenan and microbial transglutaminase addition. Food Research. International, 35: 91-98.

Statistica, Mac 1994. Statistica for Macintosh. Statsoft. Inc Tulsa. O.K. USA.

Wasson DH, Reppond KD, Babbitt JK, French JS. 1992. Effects of additives on proteolytic and functional properties of arrowtooh Flounder surimi. Journal Aquatic. Food Product Technology, 1: 147-165.

Emulsiones O/W con lecitinas de soja y girasol: Estudio de las condiciones de formulación empleando diseño factorial

Soy lecithine and sunflower O/W emulsions: Study of formulation conditions using factorial design

Penci MC, Constenla DT, Carelli AA

PLAPIQUI (UNS-CONICET), Cno La Carrindanga km7, Bahía Blanca, Argentina
CP 8000, cpenci@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

Las lecitinas vegetales, subproductos en el procesamiento de aceite, están constituidas fundamentalmente por fosfolípidos, entre ellos PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina), PI (fosfatidilinositol) y PA (ácido fosfatídico). Tanto el rendimiento en la extracción de la semilla como así también la distribución de los fosfolípidos en cada lecitina dependen de la materia prima. Las lecitinas de girasol podrían resultar una alternativa tecnológica a las provenientes de soja en la obtención de emulsionantes para la formulación de productos alimentarios y/o cosméticos. Con el objetivo de ampliar los conocimientos sobre las propiedades emulsionantes de ambas lecitinas, se estudió el efecto de las condiciones de formulación de emulsiones O/W 20:80 empleando agua Milli Q como fase acuosa y aceite de girasol como fase aceite. Las emulsiones fueron preparadas utilizando un homogenizador a distintas velocidades y conservadas a temperatura ambiente. A partir de un diseño factorial completo (2^3) a dos réplicas, se evaluó el Potencial Z (Malvern Zetasizer 3000) y la estabilidad de la emulsión (tiempo en horas requerido por el sistema para la aparición de una interfase, cuyo seguimiento se realizó mediante observación visual). Los factores seleccionados para el diseño fueron la velocidad de homogeneización (A, rpm), tiempo de homogeneización (B, s) y porcentaje de emulsionante empleado en la formulación de la emulsión (C,% p/v de emulsión). A partir del análisis de los efectos significativos de cada factor y de las interacciones entre ellos, se obtuvo un modelo predictivo cuyos coeficientes fueron analizados mediante ANOVA. Para cada emulsionante, todos los efectos correspondientes a cada factor (A, B y C) resultaron significativos, pero aquellos relacionados con la interacción entre factores resultaron diferentes para cada emulsionante (AB y BC para lecitina de soja, AC y BC para lecitina de girasol). La estabilidad de las emulsiones varió entre 1 y 8,5 horas de acuerdo al tratamiento empleado y el tipo de emulsionante. En todos los casos el Potencial Z (mV) resultó mayor para las emulsiones elaboradas con lecitina de soja. La estructura de la emulsión resultante de cada uno de los tratamientos propuestos en el diseño fue observada mediante microscopía óptica, revelando diferencias en tamaño y organización de las gotas. Paralelamente, se estudió el efecto de la fase dispersante del emulsionante (agua o aceite) en la estabilidad de la emulsión y su comportamiento reológico. La dispersión de la lecitina en aceite provocó mayor viscosidad en la emulsión final, contribuyendo este efecto a la estabilidad del sistema. La metodología de diseño factorial resultó aplicable a la caracterización de emulsiones presentando ventajas frente al método tradicional de variar un factor a la vez, ya que permite reducir el número de ensayos a realizar y evidencia la interacción entre factores en la respuesta seleccionada.

ABSTRACT

Vegetable lecithins are by-products of oil extraction process. They are constituted by phospholipids as PC (phosphatidylcholine), PE (phosphotidylethanolamine), PI (phosphatidylinositol) and PA (phosphatic acid). The oil extraction yield and the phospholipid distribution depend on the raw material. Sunflower lecithin could be an alternative to soybean lecithin for the emulsifier production (food and cosmetic purposes). The scope of this work was study the formulation conditions for emulsions O/W 20:80 using both lecithins. For aqueous phase MilliQ water and for oil phase sunflower oil was employed. The emulsions were prepared using a homogenizator at different speed and then stored at room temperature. From a factorial experiment design (2^3, two samples) the Z Potential (Malvern Zetasizer 3000) and the emulsion stability (time (h) required to see an interface, by

visual observation) were evaluated. For the factorial design, the factors were: homogenization speed (A, rpm), homogenization time (B, s) and emulsifier content (C,% w/v of emulsion). From the analysis of the significant effects of factors and their interactions, a predicted model was obtained and their coefficients were evaluated by ANOVA. For both lecithins, all the factors (A, B y C) were significant being the interaction among them different (AB and BC for soybean lecithin, AC and BC for sunflower lecithin). The emulsion stability varied from 1 to 8,5 h according to the emulsifier and the formulation conditions. The Z Potential (mV) value was bigger for emulsions formulated with soybean lecithin. The emulsion structure was observed by optical microscopy, being the size and organization droplet noticeable different. The effect of the dispersant phase of lecithin (oil or water) on the emulsion stability and rheology was studied. For oil lecithin dispersant phase, the emulsions had high viscosity contributing to the emulsion stability. The factorial design methodology was applicable to the emulsions characterization and study, presenting advantages opposite to the traditional method of changing one factor at time, letting reduce the number of experiments and can also evidence the interaction between factors in the selected response.

PALABRAS CLAVE: *lecitina, emulsión, diseño factorial.*

KEYWORDS: *lecithin, emulsion, factorial design.*

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones constituyen sistemas ampliamente utilizados en la formulación de alimentos y muchas veces estos sistemas son directamente el producto final. Ejemplos de alimentos de consumo masivo que conforman emulsiones son los helados, leches saborizadas, cremas, mantecas y margarinas, algunas sopas, aderezos para ensaladas, bebidas de preparación instantánea, entre otros. Las propiedades reológicas y la estabilidad de la emulsión que conforma el alimento impactan de manera crucial en la aceptación del producto por parte del consumidor, teniendo implicancias en la textura, apariencia, vida útil, etc. Además de la industria de los alimentos, las emulsiones son sistemas ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y cosmética (Roland *et al.* 2003). Debido a esto es fundamental caracterizar y conocer el comportamiento de las mismas frente a distintos procesos de desestabilización, a la deformación (reología de emulsiones), agentes físicos y químicos, etc.

Una emulsión consiste en un sistema de dos líquidos inmiscibles (en la industria de los alimentos generalmente un componente es agua y el otro componente es aceite) con uno de ellos disperso en forma de gotas esféricas (fase interna o dispersa) dentro del otro (fase continua o externa). De esta manera las emulsiones pueden ser clasificadas de acuerdo a la distribución de aceite y agua, cada uno de estos líquidos denominados fases. Sistemas conteniendo gotas de aceite dispersos en una fase acuosa se denominan emulsiones aceite en agua, O/W (*oil-in-water*), mientras que un sistema que contiene gotas de agua dispersas en la fase aceite se denomina emulsión agua en aceite, W/O (*water in oil*). En algunos casos, pueden conformarse emulsiones múltiples, como o/W/O o w/O/W (Pal 2007). Los fosfolípidos han sido empleados en diversas aplicaciones, siendo las fuentes más comunes la lecitina de soja y aquella proveniente de la yema de huevo. Una alternativa a estas fuentes es la lecitina de girasol, siendo Argentina un importante productor de aceite de girasol a nivel mundial. Estudios previos (Pan *et al.* 2002, Pan *et al.* 2004) han evaluado emulsiones elaboradas con lecitinas de girasol sugiriendo que éstas podrían ser utilizadas como emulsionantes tanto en sistemas O/W como W/O.

En este trabajo se propone evaluar las características de emulsiones O/W elaboradas con lecitinas de soja y girasol variando las condiciones de formulación de las mismas mediante el empleo de un diseño factorial. De esta manera se pretende ampliar el conocimiento existente de las propiedades tecnológicas de este subproducto de la industria aceitera permitiendo aprovechar los fosfolípidos presentes en la semilla de girasol, actualmente empleados únicamente como suplemento en alimentación animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación de emulsiones

Para la elaboración de las emulsiones se seleccionó el siguiente sistema: emulsión aceite/agua 20:80 (Φ= 0,2 Φ, fracción volumétrica), variando el tipo y cantidad del emulsionante. Como fase aceite se

empleó aceite de girasol comercial (Aceitera General Deheza, SA, Buenos Aires).Como fase acuosa se utilizó agua MilliQ (Millipore, Inc., USA). Las emulsiones fueron elaboradas a temperatura ambiente (25-28 *ºC*) considerando la dispersión de las lecitinas tanto en la fase acuosa como en la fase aceite. En ambos casos la lecitina fue primero dispersada en una de las fases durante un tiempo fijo (4 h, o agitación durante toda la noche para los casos en los que el período de 4 h no dispersó completamente el emulsionante). Posteriormente la segunda fase fue agregada, el sistema se agitó magnéticamente durante 30 s para facilitar la incorporación de la fase y finalmente se emulsionó utilizando un homogeneizador Pro Scientific 200 (Pro scientific, Inc, USA) de velocidad variable (velocidad 1: 5.000 rpm, velocidad 2: 9.000 rpm, velocidad 3: 12.000 rpm, velocidad 4: 18.000 rpm, velocidad 5: 25.000 rpm) provisto de una sierra (rotor) de 7 mm de diámetro. En todos los casos una porción de emulsión fue colocada en contacto con aceite, observándose gotas inmiscibles. Mediante esta sencilla prueba se corroboró que las emulsiones resultaran del tipo O/W, descartando inversión de fases.

Caracterización de emulsiones

Determinación del Ph. Tanto el pH de las emulsiones como el pH de las fases empleadas para la preparación de las mismas fue determinado utilizando un pHmetro ALTRONIX (modelo TPX I, Argentina) Para la calibración del equipo se utilizaron soluciones buffer comerciales (Anedra, Argentina).

Caracterización estructural. La caracterización y el análisis de la microestructura de las emulsiones fue realizado empleando un microscopio óptico (Zeiss Phomi III POL en el modo de transmisión) con sistema de TV cámara incorporada y procesador de imágenes consistente en el software AnalySIS Pro 3.0 (Soft Imaging System GMBH). Una pequeña porción (5µL) de emulsión fue colocada sobre un portaobjeto y cubierta con un cubreobjetos para su inmediata observación en el microscopio.

Evaluación del Potencial Z (ζ). El Potencial Z (ζ) de las emulsiones se determinó empleando un equipo analizador Malvern Zetasizer 3000 (Malvern Instruments Inc, Inglaterra). Los datos obtenidos de ζ (mV) para cada emulsión analizada resultaron de promediar 15 mediciones de cada muestra.

Caracterización reológica. Las experiencias realizadas para la evaluación de las propiedades reológicas de las emulsiones se llevaron a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado Physica MCR 301 (Anton Paar, Austria). Se analizó el comportamiento al flujo en estado estacionario: viscosidad (η) o esfuerzo de corte (shear stress) en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$). La geometría empleada para la evaluación de las propiedades reológicas de las emulsiones fue cilindros concéntricos (cup & bob). Con el fin de chequear el correcto funcionamiento del reómetro utilizado, una muestra de un material certificado (sustancia patrón de viscosidad conocida) se evaluó a las condiciones especificadas por el fabricante (Patrón Brookfield 48 centipoises a 25 *ºC*).

Evaluación de la estabilidad de las emulsiones formuladas. La evaluación del poder emulsificante de las lecitinas puede realizarse mediante diversas pruebas (van Nieuwenhuyzen y Tomás 2008). La determinación de la estabilidad (capacidad emulsionante) de las lecitinas empleadas se efectuó de manera visual colocando dos alícuotas de las emulsiones en probetas de 10 mL. La separación de las emulsiones fue evaluada en función del tiempo. Se registró el tiempo (min) al cual se apreció la aparición de una interfase y luego el volumen de cada interfase en función del tiempo.

Diseño de experimentos

Factoriales completos. A los efectos de seleccionar condiciones operativas para la evaluación y comparación de las lecitinas de soja y girasol se procedió a realizar un diseño de experimentos de tipo Factorial completo 2^3 (Montgomery 2005) considerando los factores: velocidad de homogeneización, tiempo de homogeneización, cantidad de emulsionante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formulación de emulsiones: efecto de la fase dispersante de la lecitina

La caracterización de las lecitinas desaceitadas de soja y girasol se muestran en la **Tabla 1**. Dado que las lecitinas pudieron dispersarse tanto en la fase acuosa como en la fase aceite de las emulsiones, se procedió a estudiar el efecto que este procedimiento provoca en el comportamiento de las emulsiones.

La **Figura 1** muestra el comportamiento de la viscosidad de la emulsión para ambas lecitinas cuando la fase en donde se dispersó la misma fue aceite. La **Figura 2** muestra el mismo sistema pero la fase empleada para dispersar la lecitina fue agua. Para ambos casos las lecitinas fueron dispersadas en la fase correspondiente y permanecieron en agitación (magnética) durante 12 horas momento en el cual

Tabla 1. Caracterización de lecitinas de soja y girasol.

Propiedad	Lecitina de Soja	Lecitina de Girasol
Insoluble en acetona (%)	93,49 ± 0,36	90,93 ± 0,13
Insoluble en hexano (%)	0,29 ± 0,01	0,89 ± 0,02
Humedad (%)	2,84 ± 0,15	3,18 ± 0,06
Valor ácido	25,7 ± 2,2	21,0 ± 2,3
Fosfolípidos (% relativo)		
PC	43,1 ± 2,5	37,6 ± 0,4
PE	24,4 ± 0,8	21,1 ± 0,5
PI	14,2 ± 0,5	25,4 ± 0,9
PA	18,3 ± 1,8	15,9 ± 1,1

N=3, media aritmética e intervalo de confianza (95%).

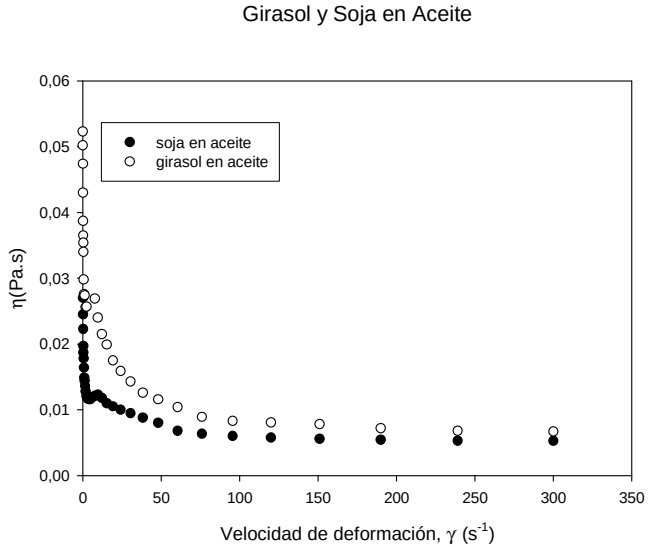


Figura 1. Comportamiento reológico de emulsiones (O/W 20:80) formuladas con lecitinas de soja y girasol (3%p/v). Homogeneización: 9.000 rpm, 60s. Fase dispersante: aceite.

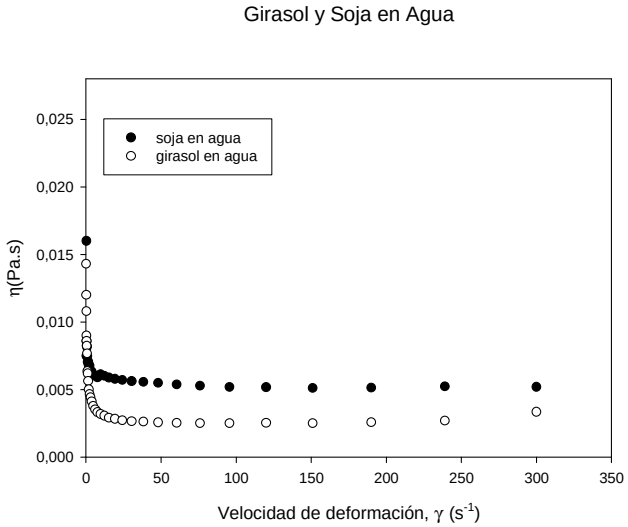


Figura 2. Comportamiento reológico de emulsiones (O/W 20:80) formuladas con lecitinas de soja y girasol (3%p/v). Homogeneización: 9.000 rpm, 60s. Fase dispersante: agua.

se agregó la fase restante y se procedió a la homogeneización para formar la emulsión. Previo a la realización de los ensayos reológicos de estas emulsiones, una porción de la muestra fue sometida a

una velocidad de deformación constante ($\dot{\gamma}$ = 250 s^{-1}) durante 300 s con el fin de detectar cambios en la viscosidad con respecto al tiempo. Para las emulsiones elaboradas con ambas lecitinas no se observó cambio alguno de la viscosidad de la emulsión en el período de tiempo ensayado. Cuando las lecitinas de soja y girasol fueron dispersadas en aceite las emulsiones presentaron viscosidades iniciales mayores y un comportamiento pseudoplástico. Viscosidades iniciales menores y un comportamiento pseudoplástico menos marcado se observó para las lecitinas dispersadas previamente en la fase agua (**Figura 2**). Para estas últimas emulsiones la viscosidad alcanzada a velocidades de deformación cercanas a 300 s^{-1} resultaron menores (0,005 Pa.s) que para aquellas dispersadas previamente en aceite (0,008 Pa.s). Este efecto también puede observarse en la evaluación de la estabilidad de las emulsiones como se muestra en la **Figura 3**. Las emulsiones formuladas dispersando previamente las lecitinas en agua, presentaron menores tiempos de aparición de la interfase, por lo que puede concluirse que las emulsiones formuladas con la lecitina dispersa en aceite presentan mayor estabilidad. Con respecto al tipo de emulsionante, independientemente del procedimiento de formulación, la lecitina de girasol presentó menor estabilidad que la lecitina de soja.

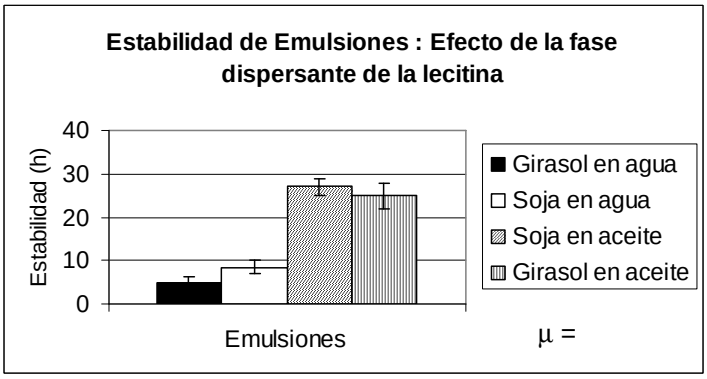


Figura 3. Efecto de la fase dispersante de la lecitina en la estabilidad de la emulsión. Fuerza iónica μ= 0.

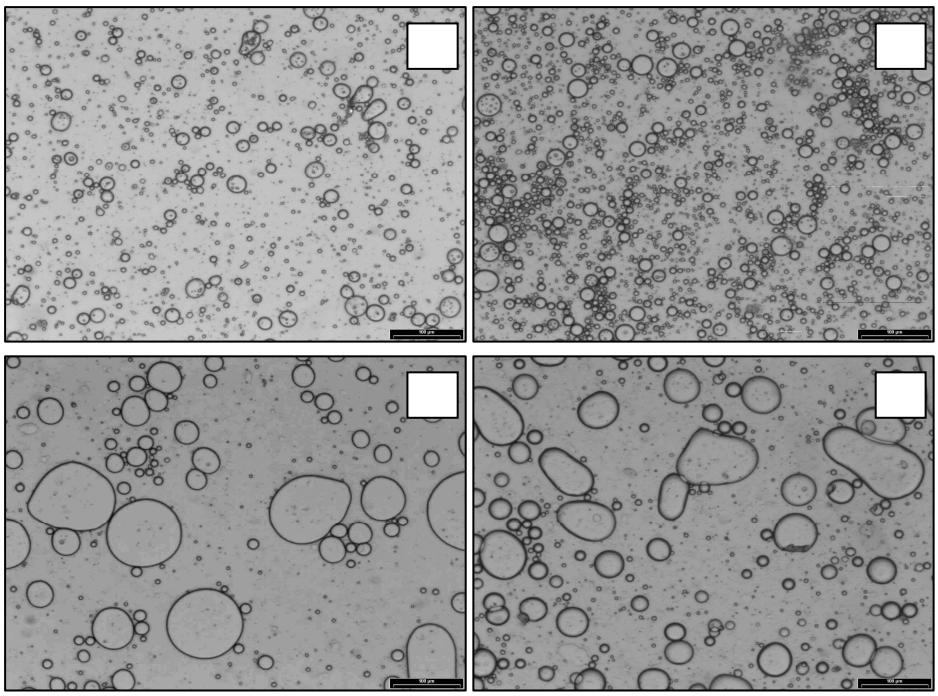


Figura 4. Efecto de la fase dispersante de la lecitina. Fotografías de emulsiones observadas con microscopía óptica (160X). La barra representa 100 μm. A: soja en aceite, B: girasol en aceite, C: soja en agua, D: girasol en agua.

Es importante conocer los detalles estructurales de las emulsiones ya que los mismos pueden contribuir a la comprensión del comportamiento de estos emulsionantes en el sistema planteado. Las estructuras de cada una de las emulsiones evaluadas pueden observarse en la **Figura 4**. Las imágenes A y B de la **Figura 4** corresponden a emulsiones formuladas dispersando las lecitinas en la fase aceite. Las mismas presentan gotas de menor tamaño que las correspondientes a las emulsiones formuladas dispersando ambas lecitinas en agua (C y D de la **Figura 4**). La formación de gotas y/o vesículas mayores a partir de gotas menores como puede observarse en las imágenes mencionadas anteriormente podría indicar un fenómeno de coalescencia, incluso la forma de las mismas no resultó esférica. Mientras que para ambas lecitinas dispersadas en aceite las imágenes revelan la aparición de entidades agregadas, sugiriendo un proceso de floculación en la emulsión. La mayor presencia de flóculos en la imagen correspondiente a la lecitina de girasol dispersada en aceite puede justificar la mayor viscosidad observada con respecto a la lecitina de soja.

Formulación de emulsiones: Efecto de la cantidad de emulsionante, velocidad y tiempo de agitación.

La preparación de emulsiones implica fijar condiciones en la formulación de las mismas. Los datos reportados en la literatura son escasos cuando se desea conocer el efecto de cada uno de los factores que influyen en este proceso. Una vez determinadas las proporciones de cada fase (aceite y agua) y tipo de emulsionante queda por definir al menos tres variables que pueden influir directamente sobre las propiedades finales de la emulsión, estas son: **cantidad de emulsionante**, **velocidad y tiempo de homogeneización**. Con el fin de conocer el efecto que tienen estas variables en el comportamiento de los sistemas a estudiar (emulsiones empleando fosfolípidos como emulsionante), se procedió a realizar un diseño de experimentos de tipo factorial de dos niveles con los tres factores mencionados anteriormente. La **Tabla 2** resume los factores seleccionados y el nivel que éstos toman en las experiencias que conforman el diseño factorial. La respuesta seleccionada fue la estabilidad de cada emulsión (tiempo en horas de aparición de una interfase). Además, para cada emulsión se determinó el Potencial Z (mV). Siguiendo el procedimiento estándar para realizar el diseño (Montgomery 2005, Anderson y Whitcomb 2007) se presentan en la **Tabla 3** y **4** los factores seleccionados para el diseño, los niveles de los mismos y la matriz del diseño junto con los resultados obtenidos para cada condición. Los datos obtenidos fueron procesados utilizando las herramientas estadísticas y gráficas

Tabla 2. Efecto de las condiciones de procesamiento. Matriz de diseño factorial 2^3. Factores y niveles seleccionados.

Factores		Nivel	
Variable		(+)	(-)
A	Velocidad de homogeneización (rpm)	Vel 2 (9.000)	Vel 1 (5.000)
B	Tiempo de homogeneización (s)	60	30
C	Cantidad de Emulsionante (% p/v)	3	1,5

Tabla 3. Efecto de las condiciones de procesamiento. Matriz de diseño factorial 2^3. Experiencias planteadas (factores codificados).

Experiencia	Orden de Ejecución	Factor A Velocidad (rpm)	Factor B Tiempo (s)	Factor C % Emulsionante
1	4	-1	-1	-1
2	1	+1	-1	-1
3	6	-1	+1	-1
4	7	+1	+1	-1
5	2	-1	-1	+1
6	3	+1	-1	+1
7	5	-1	+1	+1
8	8	+1	+1	+1

Tabla 4. Efecto de las condiciones de procesamiento Respuestas obtenidas a partir de las experiencias en el diseño Factorial 2^3.

Experiencia	Lecitina de Soja		Lecitina de Girasol	
	Estabilidad (h)	Potencial Z(mV)	Estabilidad (h)	Potencial Z (mV)
1	2,0	-61,6	1,0	-39,6
2	3,5	-60,4	2,0	-40,9
3	2,0	-59,4	2,0	-42,8
4	2,5	-61,0	4,5	-43,1
5	2,5	-62,6	7,5	-58,3
6	6,5	-69,2	5,5	-46,5
7	7,0	-71,1	5,0	-45,0
8	8,5	-75,4	5,5	-44,9

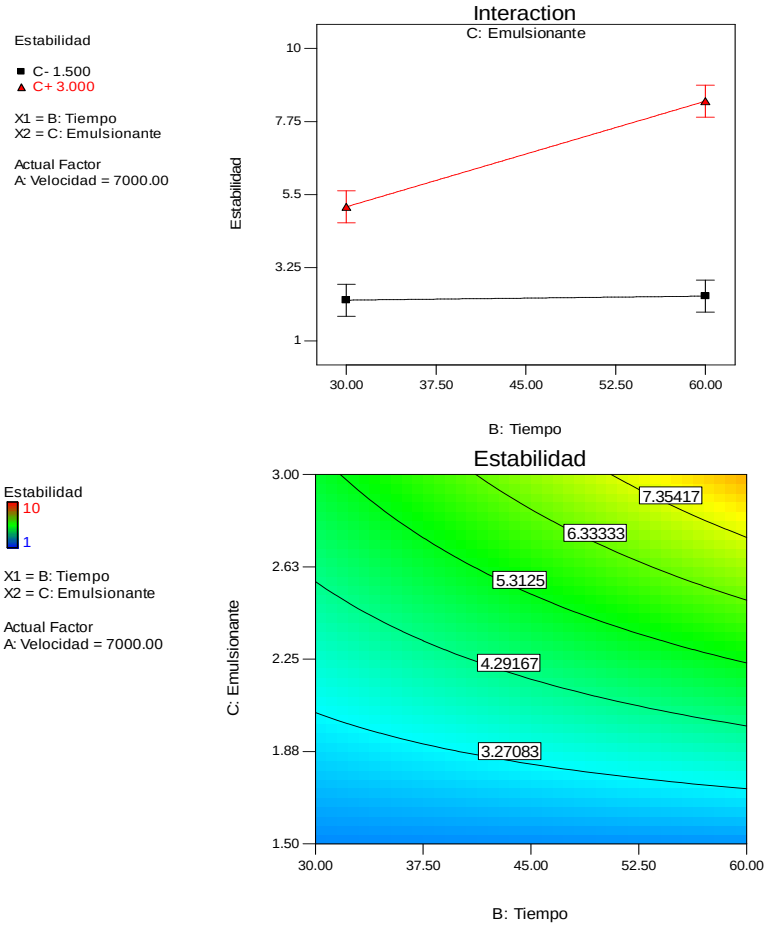
del software Design-Ease 7.1.2, Stat-Ease, Inc, (2007). Las emulsiones que presentaron mayor estabilidad (mayor tiempo de aparición de interfase) mostraron el potencial más alto en valor absoluto, indicando una interacción repulsiva más fuerte, causando mayor estabilidad entre una gota y otra, impidiendo que ambas se acerquen. En todos los casos ensayados las emulsiones presentaron potenciales Z negativos. Posteriormente mediante ANOVA (Análisis de la Varianza) se evaluaron los coeficientes del modelo propuesto para la variación de la estabilidad de la emulsión con los factores analizados.

Sistema empleando lecitina de soja

Las **Figuras 5** y **6** resumen los resultados obtenidos cuando se utilizaron fosfolípidos provenientes de soja como emulsionante (20:80 O/W), de acuerdo a la metodología mencionada anteriormente. El modelo planteado para la estabilidad de emulsiones empleando lecitina de soja resultó:

$$\text{Estabilidad}_{soja} = -4{,}6250 + 1{,}0\ \text{E-}003\ A - 0{,}01979\ B - 0{,}1666\ C - 1{,}1458\ \text{E-}005\ AB + 0.06944\ BC$$

$$\text{Estabilidad}_{soja} = 4{,}53 + 0{,}97A + 0{,}84\ B + 2{,}22\ C - 0{,}34\ AB + 0{,}78\ BC \text{ (factores codificados)}$$



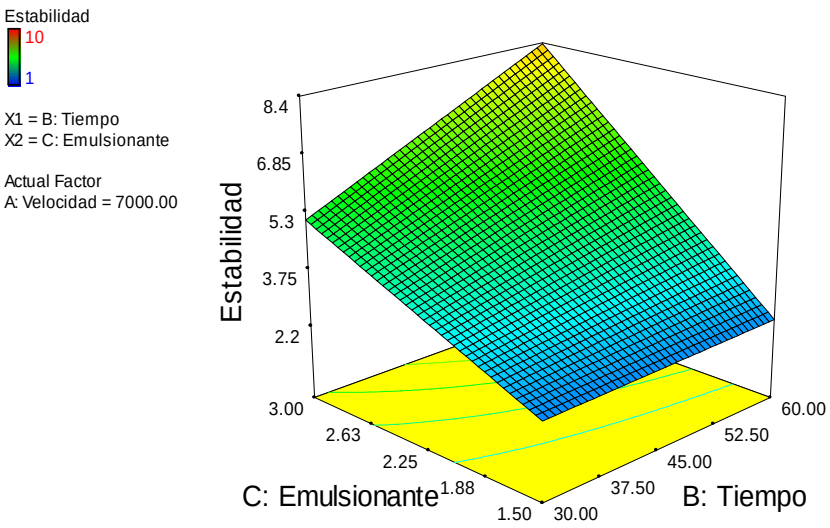
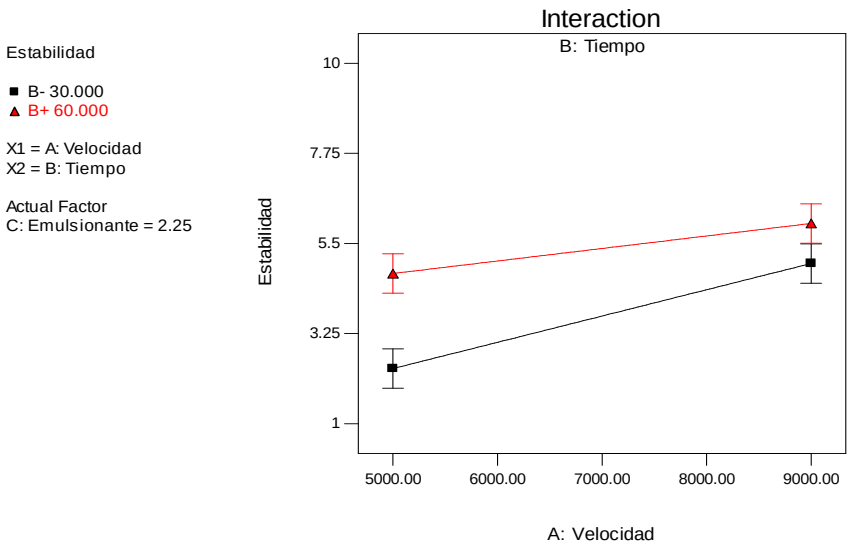
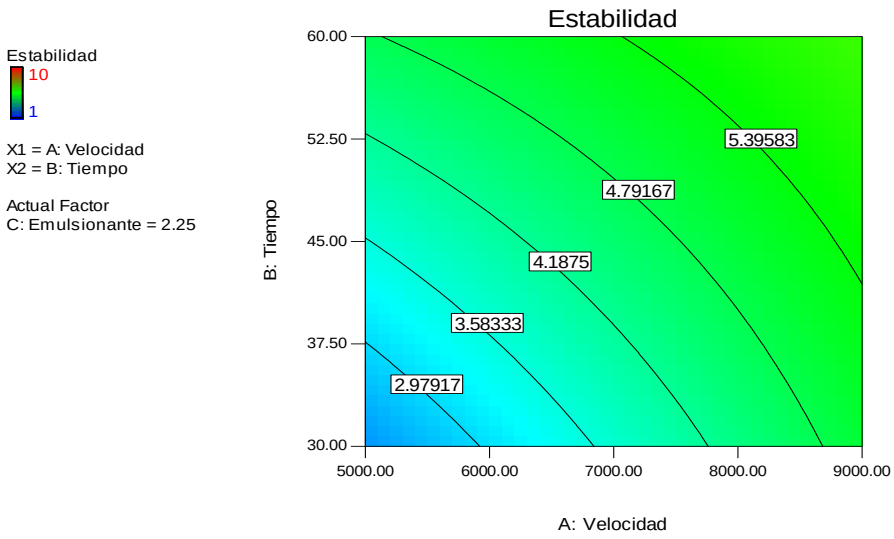


Figura 5. Gráfico de interacción, plano contorno, superficie tridimensional para los factores B y C (soja).





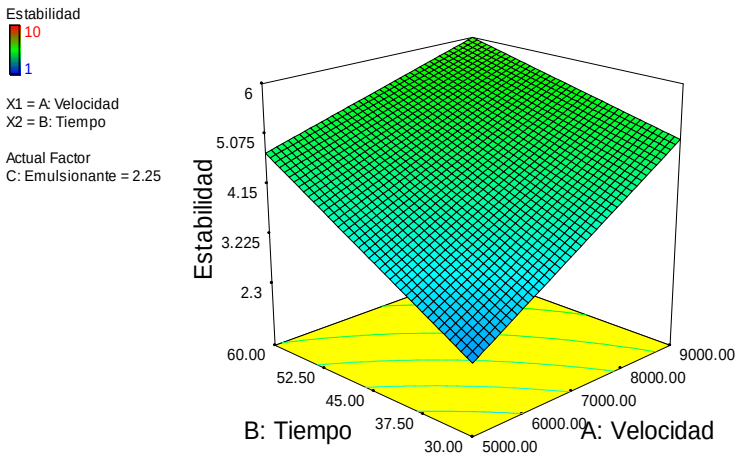


Figura 6. Gráfico de interacción, plano de interacción y superficie tridimensional para los factores A y B (soja).

Tabla 5. ANOVA - Modelo aplicado a emulsiones elaboradas con lecitina de soja.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	Valor F	Valor-p Prob>F	
Modelo	116,83	5	27,37	59,82	< 0,0001	significativo
A- Velocidad	15,02	1	15,02	38,44	0,0001	
B-Tiempo	11,39	1	11,39	29,16	0,0003	
C-% Emulsionante	78,77	1	78,77	201,64	< 0,0001	
A-B	1,89	1	1,89	4,84	0,0524	
B-C	9,77	1	9,77	25,00	0,0005	
Residuos	3,91	10	0,39			
Carencia de Ajuste (Lack of Fit)	1,28	2	0,64	1,95	0,2039	No significativo
Error Puro	2,63	8	0,33			

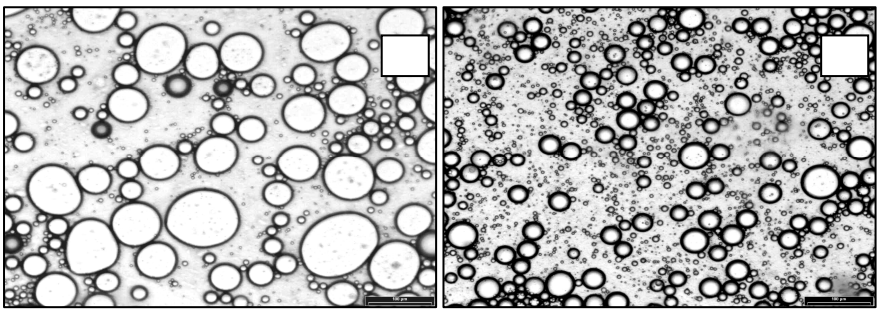


Figura 7. Microfotografías de emulsiones empleando lecitina de soja (160X). La barra representa 100 µm. A (A:-1, B:-1, C:+1) y B (A:-1, B:+1, C:+1).

La **Tabla 5** presenta los resultados de ANOVA para este sistema. En la **Figura 6** se observa el efecto de incrementar la cantidad de emulsionante en el tiempo de homogeneización; mientras que para la menor concentración el tiempo de agitación no presenta influencia (línea recta horizontal) para la concentración de 3% de emulsionante resulta beneficioso aumentar el tiempo de agitación (línea recta de pendiente positiva). Esto puede relacionarse con la capacidad de los fosfolípidos de autoagregarse, a mayor concentración de fosfolípidos en la formulación, se haría necesario dispersarlos para que puedan incorporarse a gotas de aceite y no a vesículas de fase continua. En la microfotografía designada como A de la **Figura 7** pueden distinguirse partículas de mayor grosor de pared, ocluyendo

fase continua, puede concluirse que estos fosfolípidos no están disponibles para emulsionar aceite. Esta situación cambia cuando el tiempo de agitación aumenta a 60 s (microfotografía B de la **Figura 7**) donde no se observa la presencia de estas vesículas, las gotas son más pequeñas y la estabilidad de la emulsión es mayor.

Sistema empleando lecitina de girasol

Las emulsiones elaboradas con lecitina de girasol como emulsionante presentaron en general, un Potencial Z menor que las formuladas empleando lecitina de soja. Las diferencias en la composición de fosfolípidos y un valor menor de insolubles en acetona (valor asociado a la cantidad de fosfolípidos presentes) podrían justificar esta observación. Tal como se obtuvo para las emulsiones empleando lecitina de soja, el modelo predictivo, considerando sólo los efectos significativos, viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{Estabilidad}_{gir} = -11{,}7812 + 8{,}4375\text{E-}004\ A + 0{,}1375\ B + 6{,}3541\ C - 3{,}1250\ \text{E-}004\ AC - 0{,}05278\ BC$$

$$\text{Estabilidad}_{gir} = 4{,}34 + 0{,}28\ A + 0{,}28\ B + 1{,}34\ C - 0{,}47\ AC - 0{,}59\ BC \quad \text{(factores codificados)}$$

El análisis ANOVA de este modelo se muestra en la **Tabla 6**. La **Figura 8** muestra imágenes de emulsiones elaboradas con lecitinas de girasol y las **Figuras 9** y **10** muestran los efectos de interacción AC y BC obtenidos para emulsiones preparadas empleando lecitina de girasol. El comportamiento de este emulsionante frente a las condiciones de formulación planteadas en el diseño difiere notablemente de la de lecitina de soja. Empleando el nivel alto de emulsionante (3%), se obtiene mayor estabilidad con menor velocidad de agitación o menor tiempo **(Figuras 9** y **10)**. Contrariamente a lo que ocurre en otros sistemas emulsionados, para lecitina de girasol el aumento de los factores B (tiempo) o A (velocidad) manteniendo C (% de emulsionante) elevado provocó la formación de vesículas o gotas que ocluyen emulsión (**Figura 8**). Los datos reportados en bibliografía son escasos en el caso de lecitinas de girasol. Pan *et al.* (2004) evidenciaron la presencia de vesículas conteniendo emulsión a concentraciones mayores a 0,5% de emulsionante. Como se observa en las microfotografías, el tamaño de la gota no difiere cualitativamente, sino que la oclusión de emulsión dentro de las vesículas podría ser la causa de la desestabilización del sistema dando lugar a mecanismos como coalescencia y/o cremado con mayor velocidad que en ausencia de las vesículas. El modelo obtenido otorga un mayor valor negativo al coeficiente de interacción BC (-0.59); si se observa la microfotografía C de la **Figura 8**, el entrampamiento es mayor que cuando el factor B se halla en el nivel más alto (**Figura 8**, D).

Tabla 6. ANOVA - Modelo aplicado a emulsiones elaboradas con lecitina de girasol.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	Valor F	Valor-p Prob>F	
Modelo	40,58	5	8,12	16,97	0,0001	significativo
A- Velocidad	1,27	1	1,27	2,65	0,1348	
B-Tiempo	1,27	1	1,27	2,65	0,1348	
C-% Emulsionante	28,89	1	28,89	60,42	< 0,0001	
AC	3,52	1	3,52	7,35	0.0219	
B-C	5,64	1	5,64	11,80	0,0064	
Residuos	4,78	10	0,48			
Carencia de Ajuste (Lack of Fit)	0,16	2	0,078	0,078	0,14	No significativo
Error Puro	4,63	8	0,58			

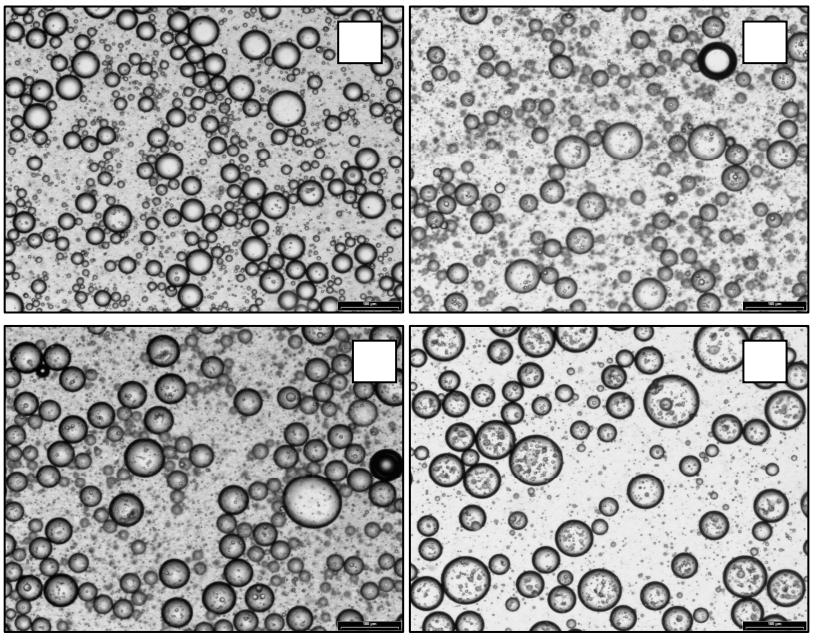
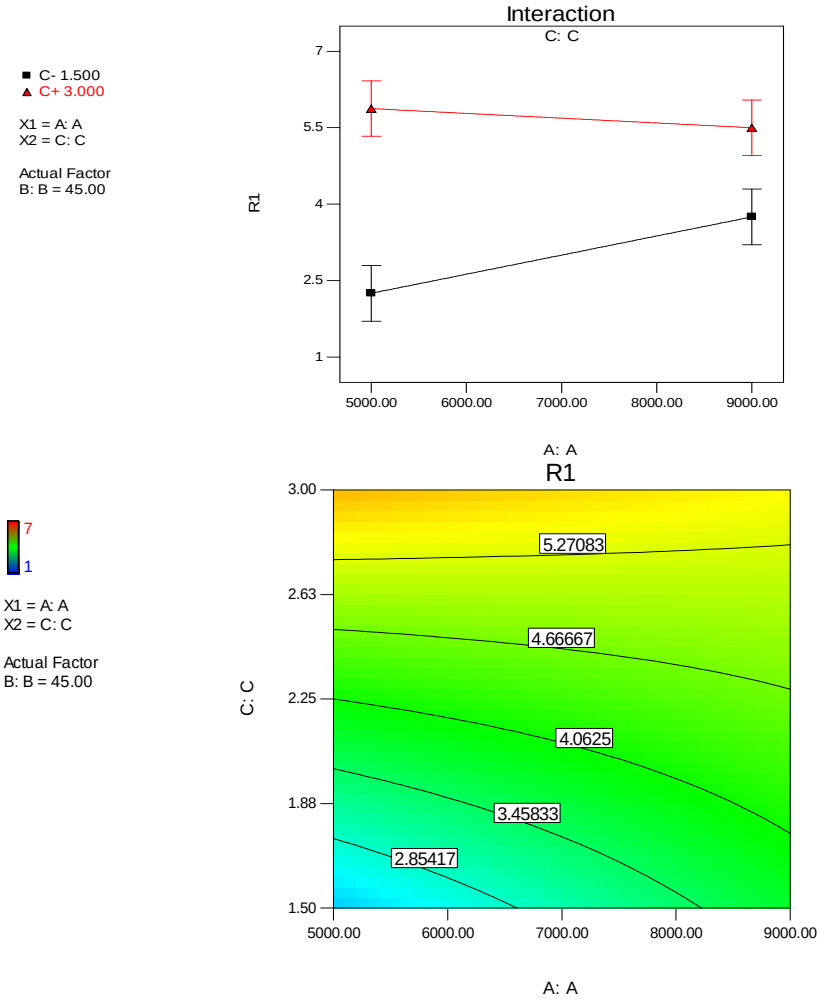


Figura 8. Microfotografías de emulsiones empleando lecitina de girasol (160X). La barra representa 100 µm. A (A:-1, B:-1, C:+1) y B (A:+1, B:+1, C:+1), C (A:+1, B:-1, C:+1), D (A:-1, B:+1, C:+1).



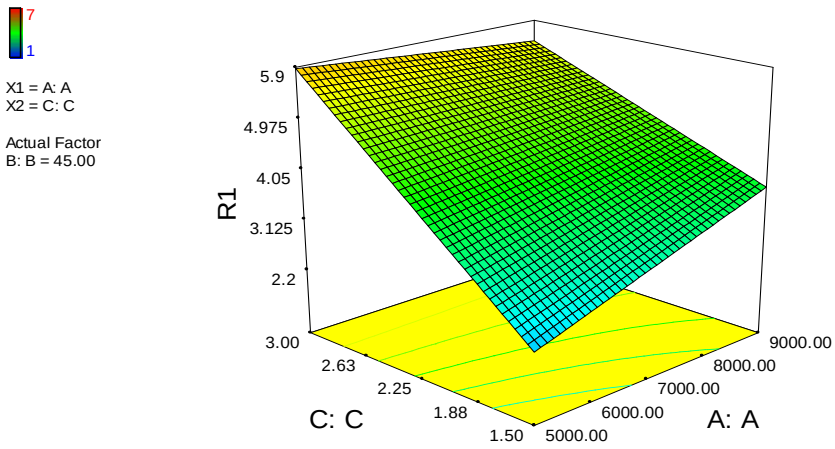
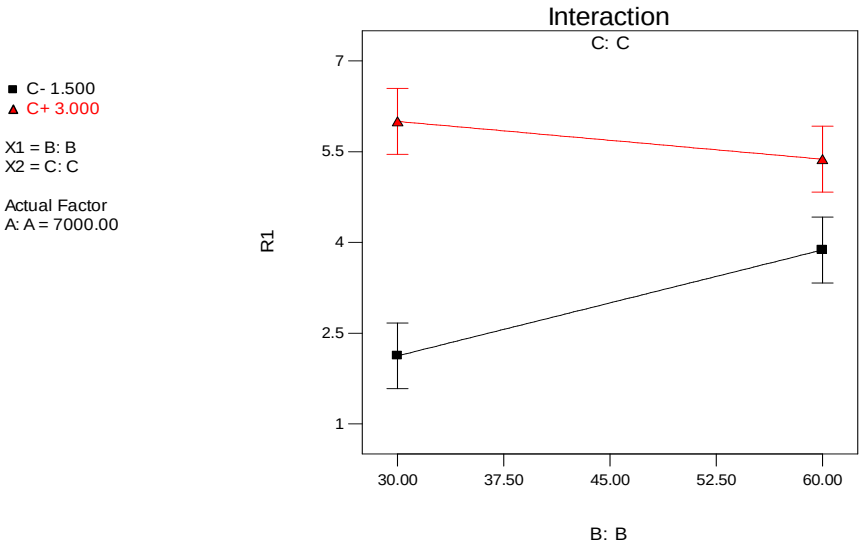
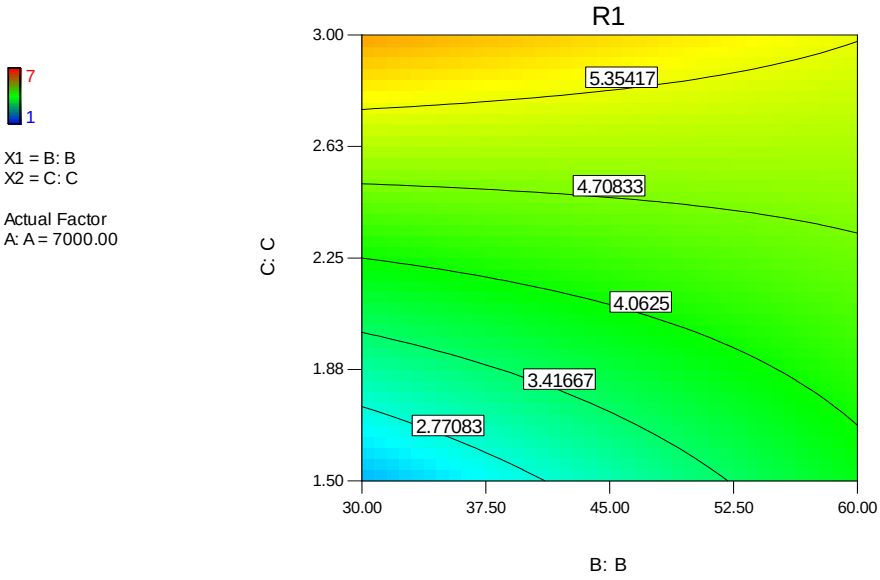


Figura 9. Gráfico de interacción, plano contorno y superficie tridimensional para los factores A y C (girasol).





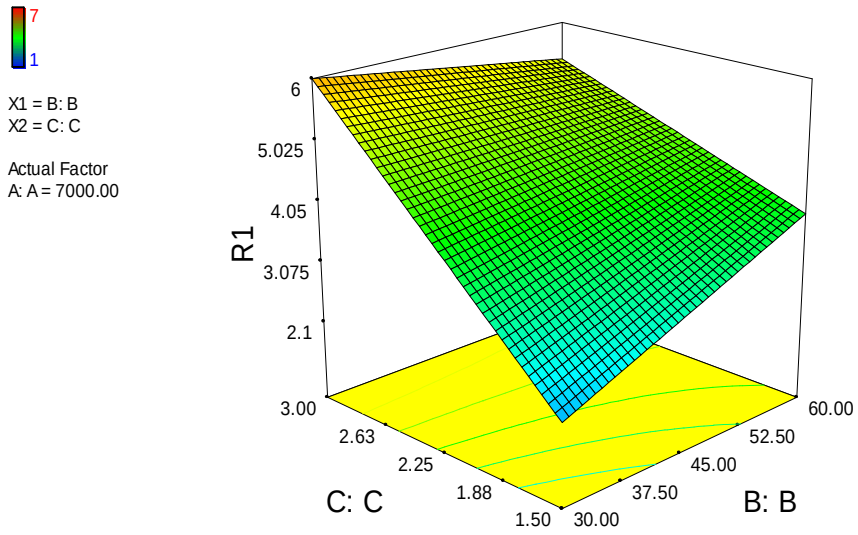


Figura 10. Gráfico de interacción, plano contorno y superficie tridimensional para los factores B y C (girasol).

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha abordado el estudio de los factores que intervienen en la formulación de emulsiones O/W empleando lecitinas de soja y girasol. Para ambos emulsionantes, la dispersión previa de las lecitinas en la fase aceite generó emulsiones con mayor estabilidad, gracias a la mayor viscosidad resultante del sistema. La metodología experimental empleada (diseño factorial completo) resultó apta para la caracterización y evaluación de las emulsiones. Los resultados obtenidos de este estudio permiten ampliar el rango de análisis de estos sistemas siendo posible incluir otros factores como fracción volumétrica de aceite o la incorporación de otros componentes como proteínas o sales. Con respecto a la lecitina de girasol, esta puede ser considerada como una alternativa tecnológica a la lecitina de soja, con propiedades emulsificantes aptas para su empleo en la formulación de alimentos. Particularmente para las lecitinas de girasol, el comportamiento observado, podría tener importancia en la formulación de emulsiones dobles del tipo w/O/W ó o/W/O (con aplicaciones industriales en formulación de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos), donde generalmente, deben emplearse al menos dos emulsionantes diferentes para provocar la formación de este sistema. Jahaniaval *et al.* (2003) prepararon sistemas emulsionados dobles empleando fosfolípidos como uno de los emulsionantes del sistema. La presencia de gotas de emulsión en vesículas podría explicarse desde la composición de la lecitina de girasol (mayor cantidad de PI) otorgándole a la mezcla de fosfolípidos un comportamiento diferente. Este fenómeno no es observado en las emulsiones preparadas con lecitina de soja (menor cantidad de Fosfatidilinositol en la composición de fosfolípidos). La presencia de metales acomplejando la molécula de PI podría ser la causa de un potencial Z menor para las lecitinas de girasol frente a las de soja. La aparición de gotas ocluidas dentro de vesículas en las emulsiones podría sugerir un comportamiento diferencial en la mezcla de los fosfolípidos en la lecitina de girasol, similar al necesario para producir emulsiones dobles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONICET, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y la Universidad Nacional del Sur por el apoyo financiero brindado para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson MJ, Whitcomb PJ. 2007. DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation, New York: Productivity Press Inc. pag 43-90.

Jahaniaval F, Kakuda Y, Abraham V. 2003. Characterization of a double emulsion system (oil-in-water-in oil emulsion) with low solid fats: Microstructure. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 80(1): 25-31.

Montgomery D. 2005. Design and analysis of experiments. New York: John Wiley & Sons Inc. pag 160-202.

Pal R. 2007. Rheology of double emulsions. Journal of Colloid and Interface Science 307: 509-515.

Pan LG, Tomás MC, Añón MC. 2002. Oil-in water emulsions formulated with sunflower lecithins: vesicle formation and stability. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 81 (3): 241-244.

Pan LG, Tomás MC, Añón MC. 2004. Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-Oil- and oil-in-water emulsions. Journal of Surfactants and Detergents, 5(2): 135-142.

Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. 2003. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. International Journal of Pharmaceutics 263: 85-94.

van Nieuwenhuyzen W y Tomás MC. 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technology. European Journal of Lipid Science and Technology, 110:5 472-486.

Propiedades Térmicas y de Sorción de agua de β-ciclodextrina, Metil-β-ciclodextrina y sus Complejos de Inclusión con Timol y Cinamaldehido

Water Sorption and Thermal Properties of β-cyclodextrin and Methyl-β-cyclodextrin and their Inclusion Complexes with Thymol and Cynnamaldehyde

Ponce-Cevallos PA, Buera MP, Elizalde BE

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes s/n. C.P. 1428 – Capital Federal.
betty@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Las ciclodextrinas (CDS) son oligosacáridos cíclicos de unidades de glucosa unidos por enlaces glucosídicos α-1,4. El interés en las CDS se debe fundamentalmente a su habilidad para formar complejos de inclusión, encapsulando dentro de su cavidad moléculas que posean una hidrofobicidad y tamaño adecuado. Esta habilidad ha sido utilizada para aumentar la solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad y liberación controlada de compuestos lipofílicos a saber: vitaminas, colorantes, aceites esenciales y *flavors* en la industria alimentaria y cosmética y drogas lábiles en la industria farmacéutica. Sin embargo, la β-ciclodextrina (β-CD) aunque es la más utilizada por razones económicas y facilidad de obtención, tiene una solubilidad limitada. Por esto, se han realizado numerosas modificaciones estructurales con el objetivo de producir cambios en las propiedades de sorción, solubilidad, y habilidad para formar complejos. El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades de sorción de agua y termofísicas de un derivado de la β-CD: la metil-β–ciclodextrina (M β-CD) y su habilidad para formar complejos de inclusión con componentes hidrofóbicos de diferente estructura (timol y cinamaldehído) en relación con las mismas propiedades de la β-CD y sus complejos de inclusión. Los complejos fueron obtenidos por el método de coprecipitación, en una relación equimolar ciclodextrina:ligando. Los precipitados obtenidos fueron liofilizados y equilibrados a diferentes humedades relativas (HR). Las isotermas de sorción de agua fueron obtenidas por el método isopiéstico, equilibrando los complejos deshidratados a HR constante (22 a 97%) en desecadores evacuados a 25 *ºC*. Las propiedades termofísicas fueron determinadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC). La formación de los complejos no afectó la forma de las isotermas de la M β-CD, a diferencia del comportamiento que presentó la β-CD donde la interacción con el ligando produce una drástica disminución en la cantidad de agua adsorbida. En todos los sistemas estudiados, la sorción de agua se incrementó abruptamente a 84% HR, aunque los valores de sorción de agua fueron menores en los complejos comparándolos con las ciclodextrinas puras. Sin embargo, estas diferencias fueron más significativas en la ciclodextrina natural, la β-CD. La presencia de una transición vítrea bien definida (T_g) confirmó la amorficidad de la ciclodextrina modificada y sus complejos de inclusión, a diferencia de la β-CD, que forma hidratos cristalinos. Los valores de T_g decrecieron al incrementarse la HR y además, a una misma HR, los complejos presentaron menor T_g. Estos resultados indican que la presencia de componentes de inclusión en la cavidad de la ciclodextrina (β-CD o M β-CD) produce modificaciones estructurales que afecta su interacción con el agua. Es importante mencionar que además de la polaridad, la estructura espacial de los ligandos modifica significativamente la inclusión, su liberación y su interacción con los sistemas acuosos. Esta información podría ser útil para seleccionar las condiciones de almacenamiento más adecuadas o para incrementar la vida útil de productos con propiedades funcionales, así como también predecir la velocidad de liberación de la sustancia incluida en dicho sistema.

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDS) are cyclic oligosaccharides consisting of glucose units linked by α-1,4 glucoside bonds. Much of the interest in CDS arises from their ability to encapsulate hydrophobic molecules with suitable size inside their annulus to form inclusion complexes. This ability has been used to

increase the solubility, stability, bioavailability and the controlled delivery of lipophilic drugs, vitamins, colorants, essential oils and flavors in food, cosmetic and pharmaceutical industries. Nevertheless, natural CDs have limited water solubility. To obtain a significant increase in water solubility, some chemically derivatives have been produced. Structural modifications in the external surface of (β-CD) ring produces changes in sorption properties, solubility, amorphicity and in the capacity of forming different hydrates from those with the original β-CD. The objective of this work was to determine the water sorption and thermal properties of a modified cyclodextrin, the methyl-beta-cyclodextrin (Mβ-CD) and its ability to form inclusion complexes with hydrophobic components of different structure (thymol and cinnamaldehyde, in relation to the same properties of the β-CD and its complexes. The complexes were obtained by the co-precipitation method in a equimolecular ratio guest:host. The precipitates obtained were freeze-dried. Water sorption isotherms were obtained by the isopiestic method, by equilibration of the dehydrated samples at constant relative humidity (RH) (22 to 97%) in evacuated chambers at 25 *ºC*. Thermal properties were determined by DSC. The formation of the complexes did not affect the shape of the isotherms for the Mβ-CD, differing from the behavior of the natural β-CD, where the formation of the complex modifies significantly the shape of the isotherm. In all the studied systems, the water sorption increased abruptly at 84% RH, although the values of water sorption were lower in the complexes comparing to the pure cyclodextrins. However, these differences were more significant in the natural cyclodextrin. The presence of a well defined glass transition (T_g) confirmed the amorphous characteristics of the modified cyclodextrin and its complexes, unlike β-CD, that forms crystalline hydrates. The T_g values decreased as the RH increased and also, at a same RH, the complexes presented a lower T_g. These results indicate that the presence of the guests inside the cyclodextrin cavity produces structural modifications that affect the physical characteristics of the β-CD and the Mβ-CD. It is important to mention that besides polarity, the spatial structure of the guest alters significantly the spatial form of inclusion, its liberation and the interaction among the systems with water. This data would be useful to choose different storage conditions or to predict the shelf life of certain products that may contain complexes of these kinds.

PALABRAS CLAVE: *Ciclodextrinas, Encapsulación, β-ciclodextrina, timol, cinamaldehído.*

KEYWORDS: *Cyclodextrins, encapsulation, β-cyclodextrin, thymol, cinnamaldehyde.*

INTRODUCCIÓN

Un paso importante en el desarrollo de ingredientes funcionales es el diseño de procedimientos de formulación para la estabilización, solubilización y liberación de componentes activos en el alimento al cual serán incorporados. Durante los últimos años y para poder lograrlo, se han venido utilizando moléculas anfifílicas llamadas ciclodextrinas (Hedges y Mc Bride 1999).

Las CDS son oligosacáridos cíclicos compuestos de 6, 7 u 8 residuos de D-glucopiranosas (α-, β- y γ-, respectivamente) unidos por enlaces α -1,4. Estos son obtenidos industrialmente por degradación enzimática del almidón, catalizada por la enzima ciclomaltodextrin glucano transferasa (CGT). Las CDS presentan la forma espacial de un cono truncado, y debido a su estructura circular y la posición particular de los grupos hidroxilos, la CD tiene dos zonas con propiedades distintas la una de la otra: una superficie hidrofílica externa y una cavidad hidrofóbica en el centro. Esto les brinda la habilidad de actuar como huéspedes de una gran cantidad de compuestos hidrofóbicos, tales como moléculas aromáticas y alifáticas que pueden alojar en su cavidad. Debido a que la mayoría de las reacciones de formación del complejo tienen lugar en un medio acuoso, la interacción de las CDS con el agua es de fundamental importancia. Existe una competencia entre el huésped hidrofóbico a ser incluido y las moléculas de agua alojadas en le interior de la cavidad de la CD, pues la formación del complejo involucra el desplazamiento de las moléculas de agua del interior de la cavidad por compuestos que tengan mayor hidrofobicidad que ésta. El compuesto es retenido por interacciones no covalentes, dando lugar a un sistema de equilibrio entre el complejo, la CD y el compuesto incluido.

Por cuestiones económicas y por facilidad de obtención, la β-CD ha sido la CD más utilizada y más estudiada para formulaciones alimenticias (Hedges y Mc Bride 1999), farmacéuticas (Uekama *et al.* 1998) y cosméticas (del Valle 2004), formando parte de la lista de la FDA para aditivos GRAS desde el año 2001. Sin embargo, su solubilidad en agua es limitada, por lo que se han realizado ciertas

modificaciones químicas con el objetivo de obtener derivados con mayor solubilidad, mayor estabilidad y una capacidad distinta para formar complejos que aquellos de las ciclodextrinas naturales.

El timol y el cinamaldehído son dos componentes importantes en aceites esenciales naturales. El timol es un monoterpeno que caracteriza a los orégano y tomillos. Es muy reconocido por sus propiedades antisépticas, fungicidas y antimicrobianas (Cosentino *et al.* 1999). Además, en los últimos años se ha venido estudiando sobre su propiedad antioxidante (Youdim y Deans 1999). El cinamaldehído es el componente más importante del aceite de canela y sus aplicaciones más importantes se encuentran en la industria aromática y de sabores. Sin embargo, se ha verificado su efectividad como fungicida e insecticida, además de efectos farmacéuticos como analgésicos o antidiarreicos (Roller y Sedar 2002, Wang y Cheng 2005).

La estabilidad durante el almacenamiento de formulaciones deshidratadas de complejos de CDS depende de las propiedades de sorción de la CD. Entonces, la determinación de las isotermas de sorción de las CDS y de los complejos es una herramienta fundamental para predecir las interacciones entre CDS y sus complejos con el agua, y así poder predecir los cambios que se pueden producir bajo diferentes condiciones de almacenamiento (Ponce *et al.* 2007).

El objetivo de este estudio fue estudiar comparativamente las propiedades de sorción de agua y termofísicas de un derivado soluble de la β-CD (M β-CD) y sus complejos con timol y cinamaldehído con las correspondientes de la β-CD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina provista por Sigma Chemical Co.(St.Louis, MO, USA). El timol y el cinamaldehído fueron adquiridos a Carlo Erba (Milán, Italia). Todos los otros químicos fueron de grado analítico y adquiridos a Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO, USA).

Métodos

Preparación de los complejos sólidos

Los complejos de inclusión de timol y cinamaldehído (moléculas huéspedes) con β-CD y M β-CD fueron preparados por el método de coprecipitación (Mulinacci *et al.* 1996). El timol y el cinamaldehído fueron agregados a una solución saturada de β-CD previamente llevada a 55 *ºC*, en concentraciones equimolares de ligando:CD. A esta misma temperatura, se sometió a agitación durante 4 horas, y luego se almacenó por 24 horas a 2 *ºC*. Los complejos obtenidos para la β-CD precipitaron y posteriormente fueron filtrados, congelados y liofilizados. En el caso de la M β-CD, la solución obtenida fue directamente congelada y liofilizada. En ambos casos, antes de la liofilización, las muestras fueron sumergidas en nitrógeno líquido. Los sistemas deshidratados así obtenidos se pulverizaron con la ayuda de un mortero y posteriormente se almacenaron en un desecador al vacío sobre $MgClO_4$ hasta su uso.

Isotermas de sorción de agua

Luego del proceso de liofilización, se colocaron alícuotas de aproximadamente 500 mg de β-CD, de M β-CD o de sus respectivos complejos en viales de vidrio y se expusieron a atmósferas de humedades relativas (HR) constantes en desecadores evacuados y a una temperatura de 25 *ºC*. Dichas HR fueron obtenidas por medio de la utilización de soluciones saturadas de las siguientes sales: $C_2H_3KO_2$, K_2CO_3, NaBr, NaCl, KCl y K_2SO_4, que permitieron cubrir el rango de HR comprendido entre 22 y 97% (Greenspan 1977).

Los sistemas expuestos a las distintas HR fueron pesados periódicamente hasta constancia de peso. Una vez alcanzado el equilibrio el contenido de agua se determinó por diferencia de masa antes y después del secado en estufa de vacío a 98 *ºC* durante 48 horas.

Propiedades Termofísicas

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se empleó para verificar la formación de los complejos de la β-ciclodextrina o M β-CD con el timol y el cinamaldehído y también para determinar las temperaturas de transición vítrea de los sistemas analizados.

Dichas determinaciones se realizaron utilizando un equipo Mettler DSC 30 con un procesador TA 4000 y un sistema de análisis térmico TA72. Se hicieron análisis por duplicado, utilizando cápsulas de

aluminio (Mettler aluminum pan) de 40 µL herméticamente sellados, conteniendo muestras de entre 5 a 10 mg. Como referencia se utilizó una cápsula vacía pinchada.
El rango de temperatura programado fue desde -40 *ºC* a 100 *ºC* para el complejo de timol-β-ciclodextrina y desde -100 *ºC* a 120 *ºC* para el complejo de cinamaldehído-β-ciclodextrina. En el caso de los complejos con M β-CD, el rango de temperatura fue de -100 a 200 *ºC*. En todos los casos la velocidad de calentamiento utilizada fue de 10 *ºC*/min.
La desaparición completa de los picos térmicos correspondientes a los puntos de fusión de las moléculas huéspedes, cuando son examinadas como complejos, es considerada como una prueba real de inclusión (Williams *et al.,* 1998). Para el timol, el pico de fusión es de 48 - 50 *ºC* y para el cinamaldehído el mismo cae en el rango de -7,5 *ºC* a -10 *ºC*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de Complejos de Inclusión

La formación de los complejos de inclusión del timol y el cinamaldehído con la β-CD o la M β-CD, fue verificada por DSC. Este, es un método de rutina, rápido y accesible que ha sido muy recomendado en particular, para verificar la formación de los complejos de inclusión de la β-ciclodextrina (Williams *et al.* 1998, Karathanos *et al.* 2007).
La desaparición total o parcial de los eventos térmicos correspondientes a fusiones o cristalizaciones de la molécula incluida en la CD, cuando son examinadas como complejos, es considerado como una evidencia fehaciente de la formación del complejo (Pralhad y Rajendrakumar 2004, Williams *et al.* 1998).

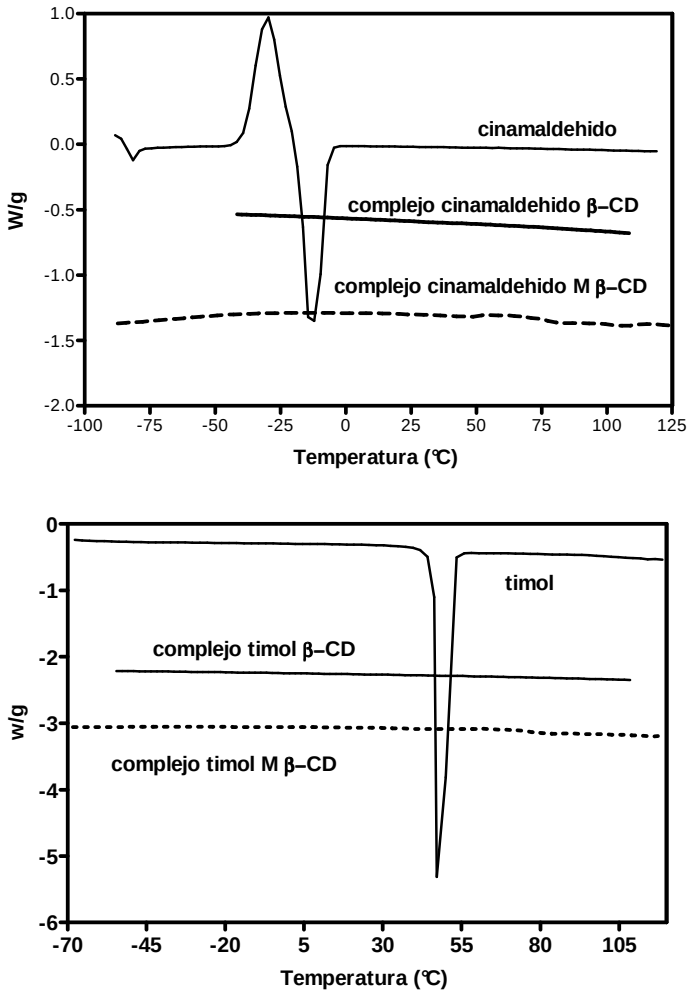


Figura 1. a) Termograma obtenido por DSC para el cinamaldehído puro y sus complejos con la β-CD y M β-CD. b). Termograma obtenido por DSC para el timol puro y sus complejos con β-CD y M β-CD.

En la **Figura 1a** se muestran los termogramas obtenidos para el cinamaldehído y sus complejos con la β-CD y la M β-CD. De manera análoga, la **Figura 1b** se muestran los termogramas del timol y sus complejos con β-CD y M β-CD. El cinamaldehído mostró un pico de fusión entre -10 y -7° C. Dichos picos no se observaron en los termogramas correspondientes a los complejos β-CD y M β-CD. Algo similar se observó en los termogramas correspondientes al timol (**Figura 1b**) en donde desaparece el pico de fusión (48-50° C) al formarse los complejos. Estos resultados son una fuerte evidencia que los complejos de inclusión s formaron (Williams *et al.* 1998, Ribeiro *et al.* 2003, Pinto *et al.* 2005).

Isotermas de sorción de agua

En la **Figura 2** se muestran las isotermas de sorción de agua de la ciclodextrina natural (β-CD) y su derivado soluble: M β-CD. La isoterma de sorción obtenida para la β-CD coincide con datos previos publicados por Cserháti y Forgács (2003). A bajas HR, se observó que ambas CDS mostraron un contenido de agua similar. La β-CD alcanzó un plateau alrededor del 43% de RH, y su contenido de agua se mantiene aproximadamente constante hasta 85% de HR. Fujiwara *et al.* (1983) demostraron que la β-CD forma hidratos estables y puede cristalizar como un dodecahidrato o undecahidrato a partir de soluciones acuosas. Esto coincide con nuestros resultados pues el plateau se obtuvo cuando la relación molar entre el agua y la β-CD es de 12, aproximadamente. Entre 33 y 75% de HR, la M β-CD muestra un comportamiento de sorción similar al observado para la β-CD sin embargo, la isoterma sigue un comportamiento de tipo sigmoideo y no se alcanzó un plateau, lo que indica que no se formaron hidratos (Mazzobre *et al.* 2009). A una HR de 95% se observó una interacción de 45 moles de agua por mol de M β-CD. A humedades relativas superiores a 84% la M β-CD presentó colapso estructural y encogimiento, fenómeno que no fue observado en la β-CD. De esta manera, las isotermas de sorción mostradas en **Figura 1** reflejan que la modificación de la β-CD afecta significativamente su interacción con el agua, sobre todo a humedades relativas altas. La baja solubilidad de la β-CD ha sido atribuida a la interacción de los grupos hidroxilos secundarios adyacentes a la cavidad con el agua. Entonces, cualquier cambio estructural en la molécula de la CD causa una modificación de su solubilidad e interacción con el agua (dos Santos *et al.* 2007, Astray *et al.*, 2009).

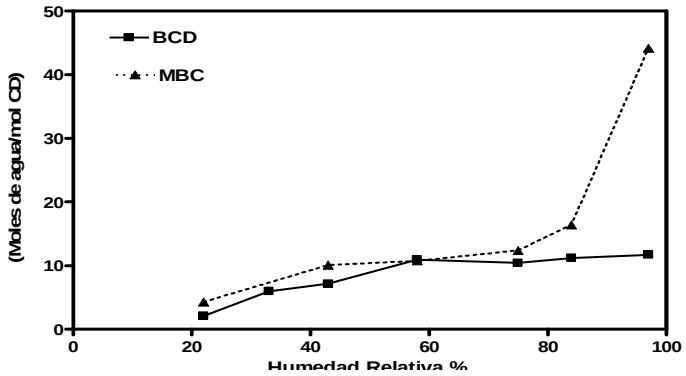


Figura 2. Isoterma de sorción de agua a 25 *ºC* de la M β-CD (▲) y de la β-CD (■).

Efecto de los ligandos en las isotermas de sorción

La inclusión de compuestos hidrofóbicos en la cavidad de las CDS modifica las propiedades de sorción de agua de las mismas. En la **Figura 3** se observa que la incorporación del timol y el cinamaldehído modificó significativamente la isoterma de sorción de la β-CD. En efecto, la sorción de agua fue mucho menor para cualquiera de los complejos que para la β-CD. Estos resultados confirmarían que la formación del complejo timol o cinamaldehído con β-CD implica el desplazamiento de moléculas de agua del interior de la cavidad de la CD (Szejtli 1998). La presencia de los ligandos modifica la capacidad de la β-CD para interactuar con el agua, no observándose un plateau, lo cual indica que en el caso de los complejos no se formaron hidratos. En la **Figura 4** se muestran las isotermas de sorción de la M β-CD y sus complejos de inclusión con timol y

cinamaldehído. En este caso se observa que la isoterma de sorción de los complejos de inclusión fueron similares a la de la M β-CD. Sólo a HR mayores a 90%, el comportamiento fue algo diferente, en donde la presencia del huésped redujo el contenido de agua del sistema. Además, la presencia de una T_g bien definida confirmó las características amorfas de la M β-CD y sus complejos (**Figura 5a** y **5b**). En la **Figura 6** se muestran los valores de T_g obtenidas para la M β-CD y sus complejos con timol y cinamaldehído en función del contenido de agua. Se observó que los valores de T_g disminuyeron al aumentar el contenido de agua del sistema. Aunque la presencia del ligando no afectó significativamente las isotermas de sorción de la M β-CD (**Figura 4**), sí produjo modificaciones estructurales que afectan las características físicas del sistema. Esto ocasionó una disminución en los valores de T_g de los complejos respecto a los de la M β-CD. Los valores de T_g de los sistemas colapsados (84 y 97% de HR) fueron menores a 25 *ºC*. La modificación de la estructura de la β-CD confirió propiedades de hidratación, solubilidad y amorficidad que pueden ser utilizadas para el diseño de productos con propiedades funcionales determinadas.

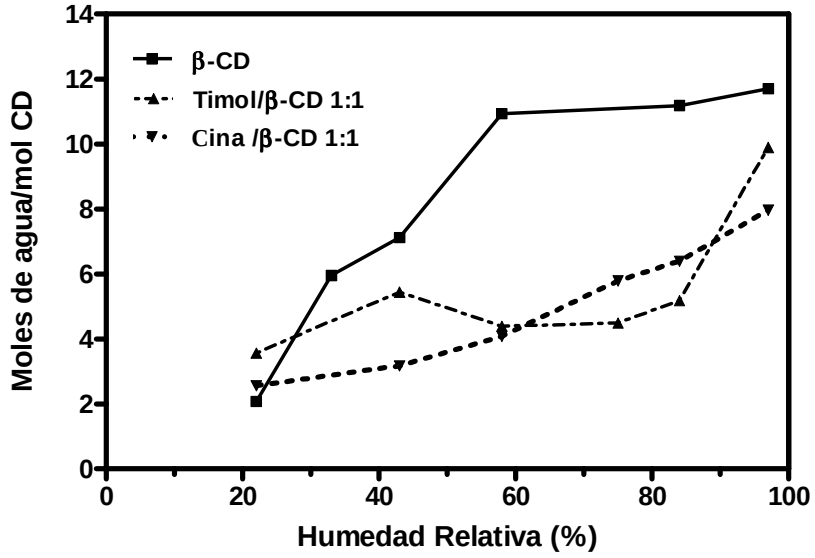


Figura 3. Isoterma de sorción de agua a 25 *ºC* de la β-CD (■) y de sus complejos con timol (▲) y cinamaldehído (▼).

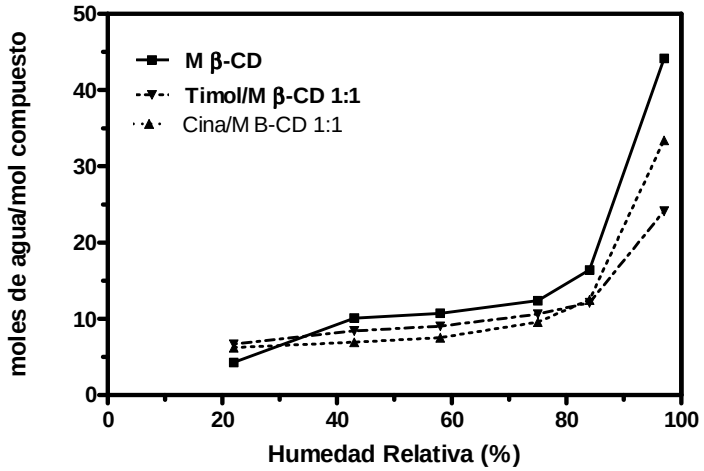


Figura 4. Isotermas de sorción de agua a 25 *ºC* de la M β-CD (■) y sus complejos con timol (▼) y cinamaldehído (▲).

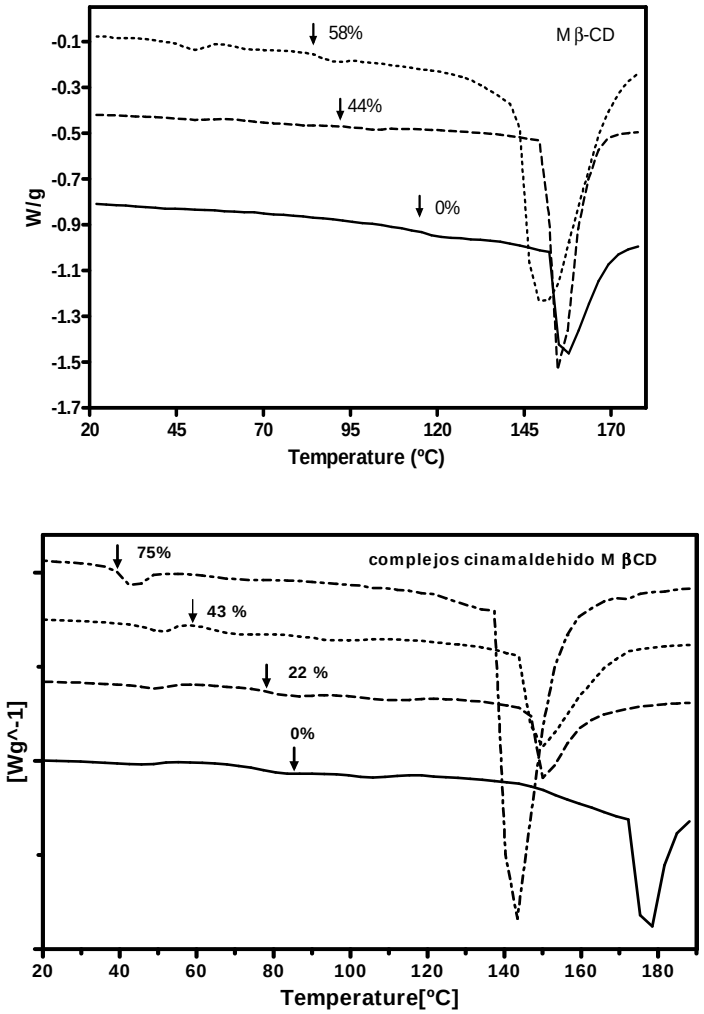


Figura 5. Termogramas de sistemas formulados con M β-CD equilibrado a diferentes HR. a) Superior M β-CD. b) Inferior complejos cinamaldehído M β-CD.

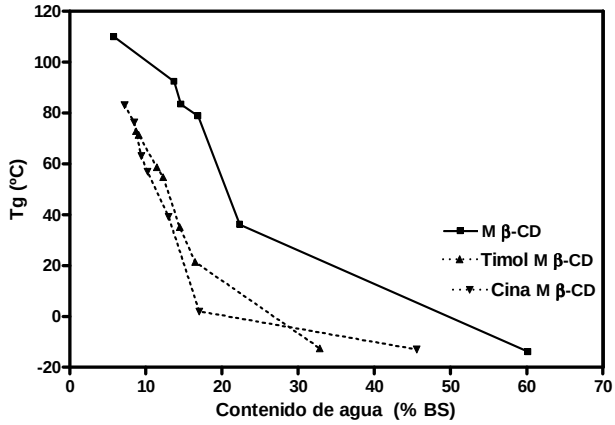


Figura 6. Temperaturas de transición vítrea determinadas por DSC para M β-CD (■) y para los complejos timol-M β-CD (▲) y cinamaldehído-M β-CD (▼) en función del contenido acuoso.

CONCLUSIONES

Se verificó que la β-CD y la M β-CD encapsulan eficientemente al timol y al cinamaldehído, dando lugar a la formación de complejos sólidos 1:1.

La presencia de ligandos hidrofóbicos, tales como cinamaldehído y timol que son constituyentes de aceites esenciales y usados como nutracéuticos, modifican notablemente las isotermas de sorción de agua de la β-CD, mientras que los complejos de inclusión de la M β-CD, fueron similares a los de CD pura.

La modificación de la β-CD con grupos metilo confirió propiedades de sorción, solubilidad, amorficidad y habilidad de formar hidratos diferentes a los de la β-CD original. Cualquier cambio estructural de la β-CD produce modificaciones en su interacción con el agua, afectando así sus propiedades físicas y habilidad de encapsular compuestos.

Estos resultados podrían ser útiles para seleccionar las condiciones óptimas de almacenamiento para nutracéuticos encapsulados o para predecir la vida útil de alimentos funcionales formulados con compuestos nanoencapsulados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires (UBACyT X024), CONICET (PIP5977), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 20545) por el financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. Food Hydrocolloids, 1-10 In press

Cosentino S, Tuberoso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29, 130-135.

Del Valle M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry, 39: 1033-1046.

Dos Santos C, Mazzobre MF, Elizalde B y Buera MP. 2007. Influencia de modificaciones de β-ciclodextrina sobre su interacción con el agua y ligandos de distinta estructura. In: Alimentos Ciencia e Ingeniería de alimentos (ISSN: 1390-2180). 16: 71-73.

Fujiwara T, Yamazaki M, Tomizu Y, Tokuoka R, Tomita K, Matsuo T, Suga M. y Saenger W. 1983. The Crystal structure of a new form of β-cyclodextrin water inclusion complexes. Nippon Kagaku Kaishi, 181-187.

Greenspan L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J. of Res. Of the Natl. Bureau of Standards, 81A: 89-102.

Hedges A y Mc Bride C. 1999. Utilization of β-cyclodextrin in Food. Cereal Foods World, 44, Nº 10.

Karathanos V, Mourtzinos I, Yannakopoulou K y Andrikopoulos N. 2007. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complex of vanillin with β-cyclodextrin. Food Chem. 101: 652–658.

Mazzobre MF, Elizalde BE, dos Santos C, Ponce-Cevallos PA y Buera MP. 2009. Nanoencapsulation of food ingredients in cyclodextrins. Effect of water interactions and ligand structure in Functional Food Product Development. Wiley Blackwell, Oxford, U.K. In press.

Mulinacci N, Melani F, Vincieri F, Mazzi G y Romani A. 1996. H-NMR and molecular modelling to caracterize thymol and carvacrol β-cyclodextrin complexes. International Journal of Pharmaceutics, 128: 81 – 88.

Ponce Cevallos PA 2008. Formación de complejos de inclusión de β-ciclodextrinas con componentes de aceites esenciales de canela, y Tomillo (Timol y Cinamaldehído). Determinación de sus propiedades fisicoquímicas y estabilidad**.** Tesis de Magíster en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos. FCEN, UBA.

Ponce Cevallos PA, Elizalde BE y Buera P. 2007. Water sorption properties and stability of inclusion complexes of thymol and cinnamaldehyde with β-cyclodextrins. In "*Water Properties in Food, Health, Pharmaceutical and Biological Systems*": Sajjaanantakul T., Reid D. (Eds) John Wiley and Sons, Inc., USA. In Press

Pralhad T, y Rajendrekumar K. 2004. Study of freeze-dried quercetincyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 34: 333–339.

Pinto LM, Fraceto LF, Santana MH, Pertinhez T, Oyama S y de Paula E. 2005. Physico-chemical characterization of benzocaine-β-cyclodextrin inclusion complexes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39: 956-963.

Ribeiro L, Ferreira DC, Veiga FJ. 2003. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine conplexation with β-cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. European Journal of Pharmaceutical sciences, 20: 253-266.

Roller S. y Seedhar P**.** 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 °C and 8 °C. Letters in Applied Microbiology, 35, 390–394.

Uekama K, Hirayama F e Irie T. 1998. Cyclodextrin drug Carrier Systems. Chem. Rev., 98: 2045-2076.

Wang CX y Chen S. 2005. Fragance-release Property of β-Cyclodextrin Inclusion Compounds and their application in Aromatherapy. Journal of Industrial Textiles, 34 (3):157-166.

Williams RO, Mahaguna V y Sriwongjanya M. 1998. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl-β-cyclodextrin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 46: 355-360.

Winkler RG, Fioravanti S, Ciccotti G, Margheritis C y Villa M. 2000. Hydration of β-cyclodextrin: A molecular dynamics simulation study. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 14: 659-667.

Youdim AK y Deans GS. 1999. Beneficial effects of thyme oil on age-related changes in the phospholipids C20 and C22 polyinsaturated fatty acid composition of various rat tissues. Biochemical Bioph Acta, 1438: 140-146.

Diseño y análisis sensorial de prototipos de una “colación saludable” para escolares

Design and sensorial analysis of healthy snack prototypes to scholars

Ponzio N (1), Brescia M (2)

(1) Tecnología de Productos de Origen Vegetal, Lic. En Alimentos. Facultad de Agronomía, Azul, UNCPBA
(2) Nutrición, Lic. En Alimentos, - Facultad de Agronomía, Azul, UNCPBA.
noraponzio@yahoo.es

RESUMEN

Los criterios de alimentación saludable indican que las colaciones que los escolares ingieren durante su horario en la escuela, no deben reemplazar ninguna ingesta, pero sí ofrecer una calidad nutricional sensiblemente mejor que la habitualmente ofrecida en kioscos comunes. El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la aceptabilidad y características texturales de dos prototipos de colaciones saludables diseñadas en base a frutas y con calorías controladas. Los ingredientes utilizados fueron: harina de trigo 000, aceite de girasol, huevos, azúcar, frutas y polvo leudante. En este trabajo se presentan resultados del análisis sensorial realizado por un grupo de alumnos de 5° y 6° grado sobre 2 prototipos realizados en base: a) mandarina y b) manzana y resultados del análisis de Textura (TPA). En cada prototipo se probó la base sola y 3 variantes que mejoraran la calidad nutricional; en el primer caso, semillas de lino, sésamo y girasol, que aportaran ácidos grasos omega 3 y 6 y en el caso b) fruta deshidratada, semillas de lino y la combinación de ambas. Se realizaron Test de Aceptabilidad global (n = 60) de cada uno de los tratamientos en los que se evaluó además, aroma, sabor y textura. Las preferencias de los consumidores en los prototipos con base mandarina mostraron que solamente el tratamiento con sésamo tuvo menos aceptabilidad global. Por otra parte la alternativa b) mostró que la inclusión de semillas de lino tuvo la menor calificación en cuanto a sabor, siendo los otros tipos de mayor y similar valoración. En ambos casos, el nivel de aceptabilidad de la base fue de alrededor de 80% mostrando una alta recepción en la población escolar. Se encontraron relaciones entre los resultados de preferencia de los Test con datos objetivos logrados con el análisis de textura a través de TPA. Los datos se analizaron a través de ANOVA con el paquete estadístico INFOSTAT. Si bien el resultado calórico de las colaciones hasta aquí ensayadas es aceptable, en sucesivos ensayos se buscará incrementar el aporte proteico para presentar un mejor balance nutricional. El diseño de estas colaciones saludables enriquecidas con omega 3 y 6, frutas y grasas óptimas, aún en su fase experimental, demuestra que es posible ofrecer productos saludables, alternativos a las existentes en el mercado y adaptadas al gusto de los escolares.

ABSTRACT

Healthy food criteria indicate that snacks that scholars can eat during school daily time, should not replace any intake but offer a nutritional quality much better than the products often available in regular food stands. The aim of the present work was to compare acceptability and textural characteristic of two prototypes of healthy snacks designed basically on fruits and with controlled calories. Ingredients used were: wheat flour 000, sunflower oil, eggs, sugar, fruits and baking powder. In this work results are shown of sensorial test performed by a group of 5^{th} and 6^{th} grade scholars on two prototypes performed in base to: a) mandarin and b) apple and results of Texture Profile Analyses (TPA). In each prototype the fruit base alone was tested as well as 3 variants aimed to improve nutritional quality: In the first case, flaxseed, sesame and sunflower were added contributing omega 3-6 fatty acids. In the b) case, desiccated grape fruit, flaxseed and a combination of both. Tests of Global Acceptability were performed (n=60) of each treatment and flavor and texture were also evaluated. Preferences of consumers in prototypes with mandarin base showed that only the sesame treatment had lower global acceptability. In the other hand b) alternative showed that the inclusion of flaxseeds presented the lower grade in taste, while the others alternatives got higher and similar values. Both base-variants showed acceptability level of around 80%, which is considered a high value among a student population. Relationships were found between the Test of Global Acceptability performed and

objective data obtained from texture analysis from TPA. Data was analyzed through ANOVA with INFOSTAT. Even when the achieved caloric value of these healthy snacks is acceptable, in further studies an improvement of protein supply is planned, in order to correct the nutritional balance. These preliminary results in designing healthy snacks enriched with omega 3 and 6, fruits and optimal fats, proved that it is possible to offer healthy products adapted to preferences of 11-12 year old children, as an alternative to those industrials, commonly available.

PALABRAS CALVE: *colación saludable, aceptabilidad global, textura, calorías, calidad nutricional.*

KEYWORDS: *healthy snack, global acceptability, texture, calories, nutritional quality.*

INTRODUCCIÓN

Existen evidencias claras a través de estudios de población, de los inconvenientes nutricionales que se presentan por la errónea incorporación de alimentos desde la edad escolar (ENNyS 2006). Las recomendaciones sobre nutrición en niños en diferentes grupos etáreos consideran no solo a la familia sino también el medio ambiente donde habitan, por ejemplo, la salida de las madres a trabajar que ocasionó un cambio de las tradiciones culinarias familiares; los grupos familiares actuales tienen más comidas realizadas fuera del hogar (restaurantes, bares, escuela); la presión social por lograr cambios físicos inadecuados para la edad (delgadez extrema, adelgazamiento, anorexia, bulimia, obesidad); horarios de los escolares con exceso de actividades suprimiendo momentos de comidas; bombardeo de información con productos alimenticios ofreciendo beneficios exagerados con su consumo; todo esto altera la educación alimentaria (Lema 2007). Por otra parte es importante entender la brecha entre las prácticas alimentarias actuales y las recomendaciones dietéticas para lactantes, niños y adolescentes (FAO Chile 2008).

Los primeros años de vida de cualquier individuo son muy importantes para establecer pautas alimentarias saludables y proporcionar a este una correcta calidad de vida. Frente a la actual situación, se considera imprescindible utilizar el ámbito escolar para lograr inculcar conocimientos sobre una adecuada alimentación. Incluir en la alimentación de cualquier individuo, alimentos que promuevan salud o que modifiquen factores de riesgo nutricional, es una estrategia para lograr una correcta educación alimentaria **(**Dieta y Salud 1992). La escuela acompaña a los padres en el proceso de enseñanza-aprendizaje, es por eso que desde lo institucional este ámbito debe brindar ejemplos para que puedan ser transmitidos por los alumnos. Con el fin de plasmar estos conocimientos en la población escolar es necesario complementar las tareas educativas con charlas sobre "Guías alimentarias para la población Argentina (AADYN FAGN 2000), Grupos de alimentos "…importancia del consumo de los mismos, distribución en las comidas, importancia del desayuno…" (López y Suárez 2002).

En el ámbito latinoamericano es de destacar el proyecto realizado en Chile sobre "Educación nutricional en las escuelas básicas", con el objetivo de contribuir a mejorar la salud y el estado nutricional de los niños en edad escolar, incorporando la educación en alimentación y nutrición en el currículo de las escuelas básicas de Chile.

A nivel nacional, las autoridades educativas llevaron a cabo en 2007, desde enero a septiembre de ese año, la iniciativa "Educación Alimentaria y Nutricional en las escuelas de educación general básica primaria", auspiciado por el Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología y SAGPyA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos del Ministerio de Economía y Producción), con apoyo de FAO. Los resultados de esa iniciativa publicados en el Portal Educativo, publicación de la Dirección General de Cultura y Educación de la Provincia de Buenos Aires. Año 2. Nº 4, Septiembre/octubre 2007, reafirman la necesidad de promover la salud alimentaria de la población escolar.

Un aspecto que actualmente acompaña al proceso de mejorar la oferta de alimentos saludables es la adecuación del servicio de kiosco de las escuelas en un establecimiento que apoye la educación alimentaria. La implementación de "kioscos saludables "que promocionen el consumo de alimentos saludables o funcionales disponibles en él y restrinjan la disponibilidad de alimentos nutricionalmente pobres también fue relevada como prioritaria por el PROPIA, (UNLP 2007).

En los “kioscos saludables” se busca orientar al escolar a elegir alimentos que le aporten vitaminas o minerales esenciales, grasas saludables, hidratos de carbono complejos, etc.
En el recinto de la Escuela N° 28 se creó este tipo de kiosco resultando por concurso el nombre de Nutrilandia. Este proyecto fue presentado a la Legislatura Provincial resultando el mismo no solo de interés Municipal sino también Provincial (2006). Con adecuado asesoramiento se incluyeron en el mismo alimentos como yogur, alfajores de maicena, bizcochuelos, galletitas de agua, sándwich de queso, turrones, barras de cereal, leche chocolatada, frutas frescas, jugos naturales, gelatinas, cereales (trigo inflado, salvado, semillas de lino, sésamo). Dentro del seguimiento del funcionamiento y respuesta de los alumnos a la oferta del Kiosco saludable se observó que el consumo de frutas frescas, jugos y yogur disminuía en los meses fríos.
Es así que, en el marco de una iniciativa conjunta entre universidad, nivel primario de educación y empresa (Molino Nuevo de Azul, S.A.) que tenía como objetivo realizar un aporte al Kiosco Saludable de la Escuela. N° 28 de Azul, se propuso el diseño de colaciones saludables que aporten frutas en una presentación apetecible en los meses invernales. Se vio también la necesidad de incluir ingredientes que aporten elementos beneficiosos para la dieta (fibras, ácidos grasos beneficiosos para la salud). Estas colaciones debían ser de calidad y calorías controladas, ofreciendo a los escolares un formato novedoso y apetecible. Cabe señalar que es importante diseñar adecuadamente estas colaciones, en principio para que sean atractivas para los escolares y porque en el mercado existen gran cantidad de éstas que aportan ácidos grasos trans, poca fibra, grasas saturadas, colesterol que no favorecen una alimentación saludable, por lo que la elección de los ingredientes y el tipo de presentación es un punto crítico.
Se partió de la base que las mismas no deben reemplazar ninguna ingesta, pero sí ofrecer calidad nutricional sensiblemente mejor que lo que habitualmente se ofrece en kioscos comunes.
Las materias primas básicas de este tipo de productos: frutas frescas, secas, semillas con aporte de Omega 3 y 6, harinas, materias grasas y su caracterización físico química y reológica estándar son de vital importancia para la confección de estas colaciones, como así también la standardización del proceso de elaboración. Por otro lado, es necesario contar con datos objetivos de las colaciones, por ejemplo, peso, color, textura, que permitan caracterizarlos y a su vez relacionarlos con datos provenientes de los consumidores. De esta manera los ensayos de textura pueden aportar datos interesantes sobre parámetros (dureza, elasticidad, gomosidad) que permitan una descripción más acabada del producto. Teniendo en cuenta que estas colaciones están dirigidas a una población etárea definida es de suma importancia el recabar información acerca de los gustos básicos de esa población como así también el aportar información que nos orientara sobre el tipo de colación apetecida y además les permita ejercer el derecho a ser consumidores responsables. Por lo que se hace necesario realizar consultas y charlas informativas de temas tales como nutrición, etiquetado de los alimentos, análisis sensorial. De esta forma, además de ir transformando a los escolares en consumidores ilustrados, se recaba información que permite ir reorientando el diseño de los prototipos de acuerdo a sus preferencias. Así, los escolares irán tomando conciencia de su rol como consumidores y de la importancia de la evaluación del nuevo producto en el que están involucrados (Carter and Riskey 1990).
El objetivo del presente trabajo es comparar la aceptabilidad de dos prototipos de colaciones saludables diseñadas en base a frutas, con calorías controladas y con variantes de enriquecimiento en la calidad nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño de colaciones saludables que aporten frutas en una presentación apetecible en los meses invernales. Se vio también la necesidad de incluir ingredientes que aporten elementos beneficiosos para la dieta
Se probaron distintos tipos de harinas pre-comerciales y comerciales proporcionadas por Molino Nuevo SA. Para la caracterización reológica de dichas harinas se utilizaron test reológicos tradicionales tales como el farinograma y alveograma. Se utilizó un Farinógrafo Brabender-50-g (Brabender OHG, Duisburg, Alemania) y se obtuvieron los siguientes parámetros: la absorción de agua (%), el tiempo de desarrollo, la estabilidad y el aflojamiento, según Norma IRAM 15855, 1979. Los alveogramas se realizaron en Alveógrafo Chopin (Chopin Technologies, Villeneuve-la-Garenne,

Francia) y se obtuvieron los parámetros de tenacidad (P), extensibilidad (E), P/L, y fuerza panadera (W) de acuerdo a la norma IRAM (Norma IRAM 15857, 1995) **Tabla1**.

Tabla 1. Caracterización reológica de harinas. El resaltado en negrita corresponde a la harina comercial 000 utilizada para la confección de los muffins.

Harinas comerciales	**PARAMETROS ALVEOGRAFICOS**				**PARAMETROS FARINOGRAFICOS**			
	P	**L**	**P/L**	**W**	**ABS AGUA**	**T DES**	**ESTAB**	**AFLO 12 MIN**
A	120,7	24,0	5,0	132,0	55	1,5	1,6	81
B	105,3	79,7	1,3	350,3	59,5	26,2	41,5	19
C	155,7	66,3	2,4	407,0	61,8	1,8	14,8	26
D	**70**	**109**	**0,66**	**246,5**	**56,9**	**10,5**	**27**	**10**
E	81,5	79,5	1,02	194	61,8	6,5	16	50

Respecto del aceite de girasol utilizado como materia grasa, se probaron diversos aceites de girasol y se caracterizaron de acuerdo a su perfil de ácidos grasos (los resultados no se muestran en este trabajo).

Se eligió el formato "muffin" por ser de fácil manipulación y permitir regular el tamaño de la porción, eligiéndose el de 25 g. Se ensayaron distintas bases a partir de frutas procesadas total o parcialmente y dentro de la formulación básica se probaron distintos balances de ingredientes y alternativas.

Los ingredientes utilizados fueron: harina de trigo 000, aceite de girasol, huevos, azúcar, frutas y polvo leudante (**Tabla2**). El proceso de elaboración de los muffins constó de la confección de la masa base: mezcla de los ingredientes húmedos (huevos, aceite, frutas procesadas) con el azúcar, agregado de ingredientes secos (harina, polvo leudante). Luego se dividió la masa base en 4 fracciones y se agregó a cada una las semillas y/o frutas desecadas correspondientes. Las masas resultantes se fraccionaron en moldes de papel de 25 g y se llevaron a horno durante 18 minutos a 180 °C (**Figura 1**).

Tabla 2. Formulación base de los prototipos (%), calorías y peso/porción.

INGREDIENTES	**BASE MANDARINA%**	**BASE MANZANA%**
AZUCAR	20,8	22,9
ACEITE	18,1	17,1
HUEVOS	4,1	11,4
HARINA	27,8	25,7
LEUDANTE	1,3	1,3
MANDARINA	20,8	
MANZANA		21,7
CALORIAS	91	89
PORCION g	23	25

Figura 1. Muffins recién horneados.

Los muffins así confeccionados se congelaron, tibios, a -18°C hasta la realización del TPA y los paneles de Análisis Sensorial, siguiendo el protocolo de Vida Util (Hough 2007).
De todas las variantes ensayadas se eligieron 2, con diferentes agregados que mejoraran la calidad nutricional. Los prototipos seleccionados para realizar análisis sensorial tenían como base: a) mandarina (*Citrus reticulata* Blanco, Md), con agregado de semillas que aportaran omega 3 y 6. En prototipo b) manzana (*Malus doméstica*, Mz), la mejora nutricional se aportó a través de fruta deshidratada y semillas de lino.
a- Base Mandarina (Md), con semillas de sésamo (Md-S), con semillas de lino (Md-L) y con girasol confitero particulado (Md-G), todos al 5%.
b- Base Manzana (Mz), con pasas de uva (Mz-P) al 8%, con semilla de lino (Mz-L) al 5%, pasas más lino (Mz-P+L).
Los muffins se evaluaron mediante TPA (**Figura 2**), liberados del molde de papel, con dos ciclos de compresión al 70% de la altura original con una sonda cilíndrica (d = 7,5 cm), con un equipo TAXT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK) con celda de 5 kg y un software Texture Expert para Windows versión 1.2, obteniéndose los parámetros de Dureza, Elasticidad, Cohesividad y Gomosidad (Faubion and Hoseney, 1990).

Figura 2. Muffin iniciando el primer ciclo de compresión.

Los prototipos fueron puestos a consideración de un grupo de alumnos de 5to y 6to grado, en su calidad de evaluadores y destinatarios del producto, recibiendo entrenamiento a través de Talleres.
Se realizaron Test de Aceptabilidad global (n =60) de cada uno de ellos en los que se evaluó además, aroma, sabor y textura. Los muffins fueron colocados en bandejas sectorizadas rotuladas con números de 3 dígitos; los muffins fueron dispuestos en las bandejas por sorteo al azar (Stone and Sidell, 1985), cubiertas con *film* para evitar desecación (**Figura 3**).

Figura 3. Bandeja de presentación de los muffins para el Test de Aceptabilidad Global.

Se proporcionó una planilla a los evaluadores con Escala Hedónica numérica del 0 al 10 (0 = me disgusta mucho-10 = me gusta mucho), birome y vaso con agua para neutralizar sabores entre muestra y muestra

Se calculó el aporte calórico de los prototipos y sus variantes a partir de fórmulas desarrolladas para cálculo de hidratos de carbono, proteínas y grasas, de acuerdo a las cantidades de los ingredientes por porción (Longo y Navarro 1994). Se consideró para harinas blancas un aporte de hidratos de carbono de 70% y 12% de proteínas; aceite al 100% de grasas, huevo con el aporte de 6% de proteínas y grasas por unidad; azúcar al 100% de hidratos de carbono y aporte dado por las frutas de 12% para los hidratos de carbono.

Los datos se analizaron a través de ANOVA con el paquete estadístico INFOSTAT (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las harinas pre-comerciales y comerciales testeadas arrojaron los parámetros reológicos que se presentaron en la **Tabla 1**. Se seleccionó una harina comercial con valores farinográficos intermedios como así también de trabajo alveográfico y una relación P/L menor que 1, apta para trabajar en una masa que no necesita mucho desarrollo de gluten e interactúa con el leudante químico.

La composición de los prototipos presentados en este trabajo (**Tabla 2**), como así también las calorías resultantes de acuerdo al peso por porción de 25 g, siendo el promedio de 90 calorías por porción, aceptable para una colación de media mañana. Cabe señalar que las barras de cereal mixtas que existen en el mercado varían desde 120 a 200 calorías y las dietéticas menores a 100 calorías, los alfajores pueden aportar entre 180 a 250 calorías por unidad.

El comportamiento textural de los muffins, en sus distintas variantes, mostró diferencias significativas ($\alpha <= 0,05$) entre cada una de las bases y los respectivos agregados. La variación en Dureza de ambas bases y variaciones se observa en las **Figuras 4** y **5** debidas, en el caso de las bases a la diferencias entre frutas y a la distinta geometría de las semillas y de las pasas en el caso de los agregados.

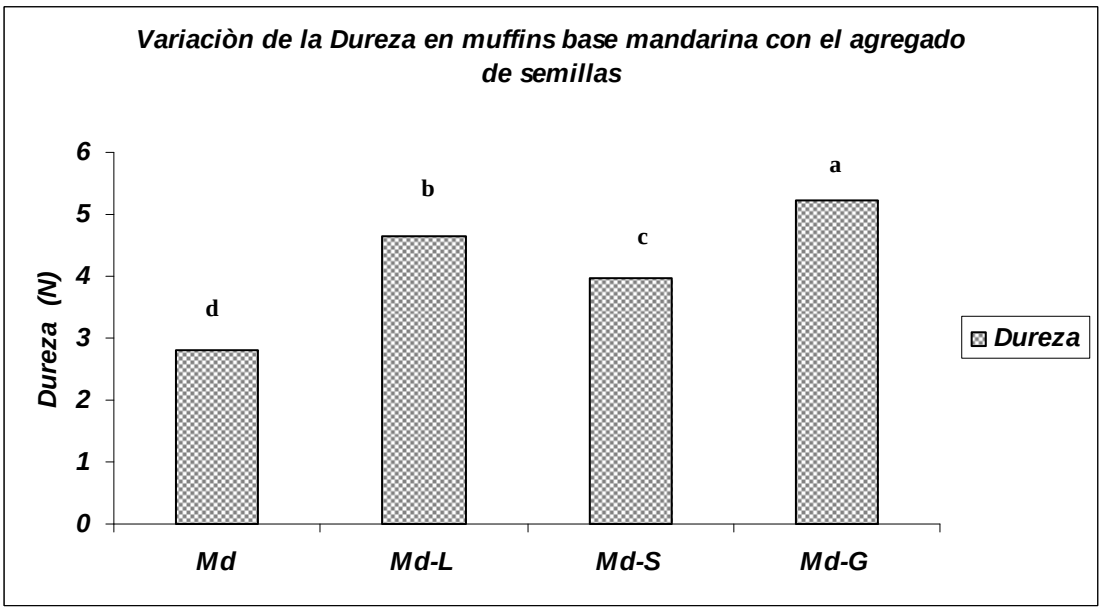


Figura 4. Variación de la Dureza (N) en muffins base cítrica con el agregado de semillas: Base mandarina (Md), semillas de sésamo (Md-S), lino (Md-L) y girasol confitero (Md-G). Letras distintas indican diferencias significativas, **mds**: 0,493, $\alpha <= 0,05$.

Los paneles de Análisis Sensorial mostraron que ambas bases lograron altos valores en todos los parámetros testeados, (**Figuras 6** y **7**) lo que indica que el diseño estuvo acorde a las preferencias de los consumidores. En el caso de la Base Md, la inclusión de semillas que aportan omega 3 y 6 (**Figura 6**), se pueden ver diferencias significativas, lo que permitiría descartar al sésamo a favor de lino o girasol.

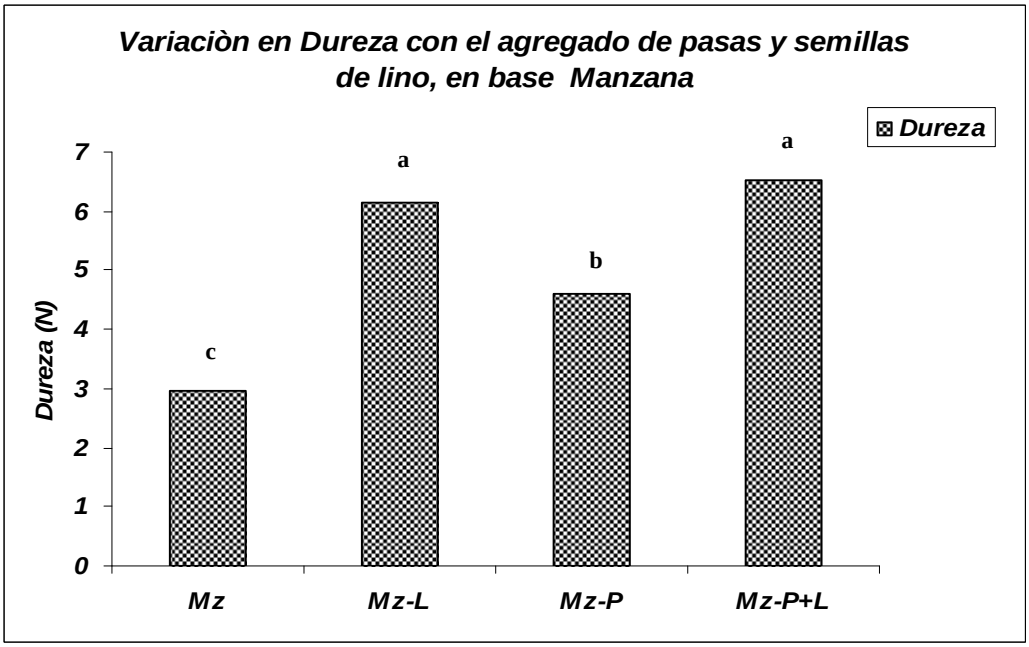


Figura 5. Variación en la Dureza (N) con el agregado de pasas y semillas de lino en base Manzana: Base Manzana (Mz), con: pasas de uva (Mz-P), semilla de lino (Mz-L), pasas más lino (Mz-P+L). Letras distintas indican diferencias significativas, **mds**: 0,494, α <= 0,05.

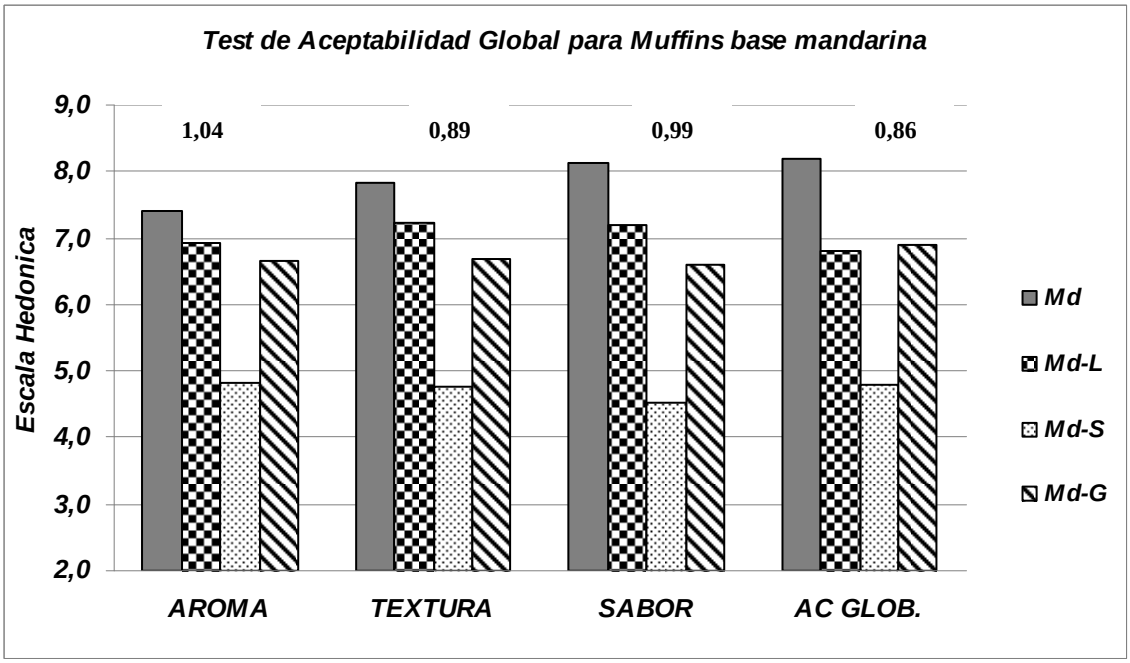


Figura 6. Valoración de los consumidores de muffins base mandarina y con agregado de semillas que aportan omega 3 y 6. Base (Md), semillas de sésamo (Md-S), lino (Md-L) y girasol confitero (Md-G). Los números que figuran sobre los grupos de barras indican **mds**, α <= 0,05.

En base Mz el agregado de lino registró los menores valores en todos los parámetros testeados (**Figura 7**) mientras que los agregados de sólo pasas y pasas + lino no mostraron diferencias significativas, lo que permitiría optar por esta última opción por presentar mejor balance nutricional.

Correlación entre Análisis Sensorial y parámetros del TPA: sólo se encontró una buena correlación (r2= 0,67) entre la Dureza (N) y Aceptabilidad Global (Escala Hedónica) en base manzana. En el caso de base Md no se halló correlación entre los valores obtenidos en el TPA y Análisis Sensorial y esto se debió en gran parte a la alta valoración por parte de los consumidores de la base que, a su vez, presentó los menores valores de Dureza. Esto indicaría, en esta base, preferencia de los consumidores

por una textura suave. Esta preferencia, sin embargo, no se ve afectada con la inclusión de semillas, aunque el análisis textural presente diferencias significativas. Esto indica que para estos consumidores el atributo Textura incluye algo más que una masa suave.

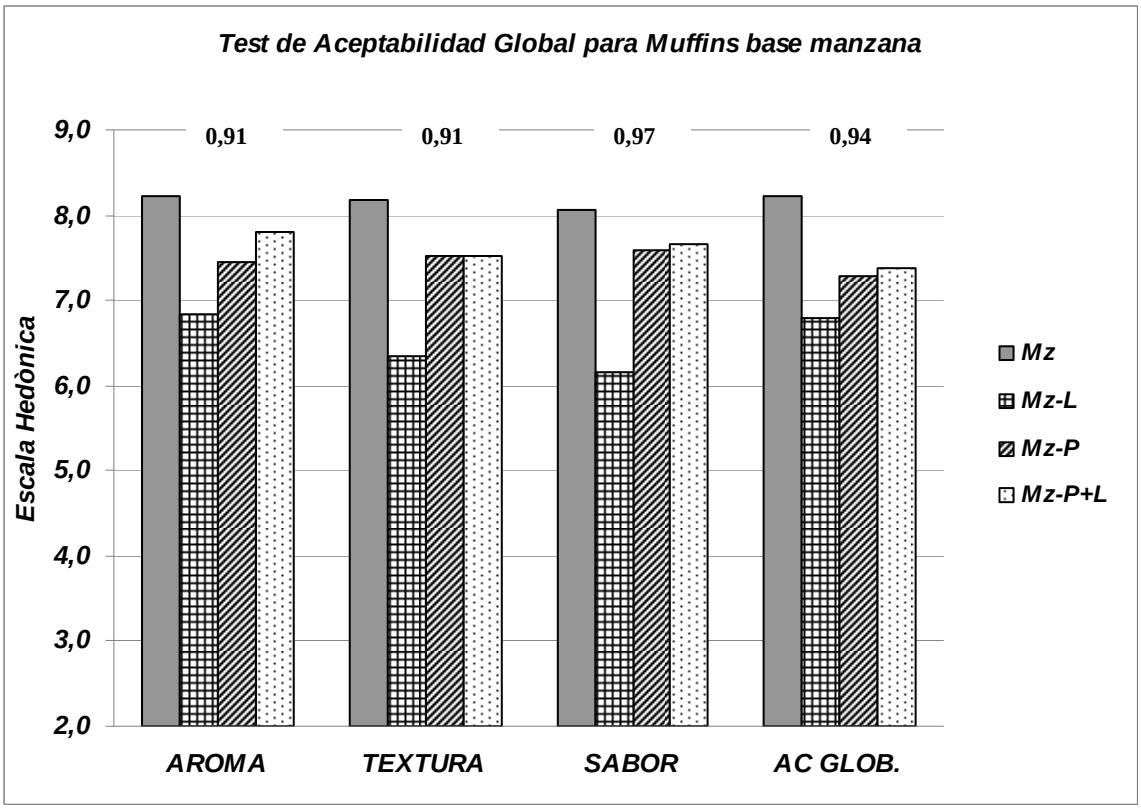


Figura 7. Valoración de los consumidores de muffins Base Manzana (Mz), con: pasas de uva (Mz-P), semilla de lino (Mz-L), pasas más lino (Mz-P+L). Los números que figuran sobre los grupos de barras indican **mds**, α <= 0,05.

CONCLUSIONES

Los valores de aceptación logrados en las bases (Md y Mz) indican que las mismas han sido logradas de acuerdo a las preferencias del consumidor.

Existe correlación entre los parámetros del TPA y la valoración sensorial de los consumidores, dependiente de la base utilizada. Sin embargo, no parece que incrementos en la Dureza debidos a las semillas y/o pasas de uva condicionen significativamente la valoración de los consumidores.

Aunque se están evaluando otras bases alternativas y mejoramiento del balance nutricional, los resultados obtenidos, aún en su fase experimental, demuestran que es posible ofrecer productos saludables, alternativos a los existentes en el mercado y adaptados al gusto de los escolares.

Si bien el resultado calórico de las colaciones hasta aquí ensayadas es aceptable, en sucesivos ensayos se buscará incrementar el aporte proteico para presentar un mejor balance nutricional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa MOLINO NUEVO S.A. por el aporte de materia prima e instalaciones donde se realizaron la evaluación de las harinas y la confección de los muffins.

También agradecemos el compromiso para con este Proyecto y la dedicación de personal directivo y docentes de la Escuela N° 28 de Azul.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bianculli C, Carmuega E, Armatta E. 1998. Factores de riesgo para la salud y la situación nutricional de los adolescentes urbanos en Argentina. Adolesc. Latinoam., jul./sep., vol.1, no.2, pag.92-104. ISSN 1414-7130.

Carter K, Riskey D. 1990. The roles of sensory research and marketing research in bringing a product to market. Food Technology 43 (11): 160.

Dieta y Salud, 1992, vol.1 Nº 1.

Dirección General de Cultura y Educación de la Provincia de Buenos Aires, Portal Educativo. 2007. Año 2.Nº 4, Septiembre/octubre, pag 3.

Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. 2006. Ministerio de Salud de la Presidencia de la Nación Argentina, ENNyS.

FAO sede Chile, 2008. Ministerio de Agricultura del Gobierno de Chile. Día mundial de la alimentación, Declaración de Viña del Mar, pag 1.

Faubion JM, Hoseney RC. 1990. Dough Rheology and Baked Product Texture. Faridi and Faubion Ed. Van Nostrandt Reinhold Publishers, cap 2, 15 y 16, pag 605.

Guías alimentarias para la población Argentina. 2000. AADYN FAGN, Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionistas y la Federación Argentina de Graduados en Nutrición, pag 118. Ed. D.G. Valentina Pérez,

Hough G. 2007. Curso Vida útil en Alimentos. 2007. DESA, 9 de Julio.

INFOSTAT (InfoStat, versión 2004. Grupo *InfoStat*, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina).

IRAM. 1995. Método 15857. Características físicas de masas. Determinación de propiedades reológicas. Método del Alveógrafo, Chopin.

IRAM. 2000. Método 15855. Determinación de la absorción de agua, tiempo de desarrollo, estabilidad y aflojamiento de la masa, farinógrafo de Brabender.

Lema S. 2007. Papel de la educación alimentaria en la Argentina en crisis. Publicado en www.proyectarg.org, pag 5.

Longo E, Navarro E. 1994. Técnica dietoterápica. Buenos Aires. Ed. El Ateneo, pag 427.

López L, Suárez M. 2002. Fundamentos de nutrición normal. Buenos Aires. Ed. El Ateneo. pag 429.

Programa de prevención del infarto en Argentina, PROPIA, 2007. Universidad Nacional de La Plata.

Stone H, Sidel JL. 1985. Sensory Evaluation Practices, Academic Press Inc. Boca Raton, Orlando. EEUU pp. 13-19.

Cinética de degradación de β-caroteno encapsulado en matrices amorfas mixtas de polímeros: Efecto de las propiedades de sorción de agua y el estado físico

Kinetics of degradation of β-carotene encapsulated in mixed matrices of amorphous polymers: Effect of water sorption properties and physical state

Ramoneda X, Buera MP, Elizalde BE

Departamento de Industrias, Facultad Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires
(1428) Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina
betty@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

La retención de β-caroteno encapsulado en matrices deshidratadas de maltodextrinas (MD) o matrices mixtas de maltodextrinas con goma arábiga (GA) o gelatina (GE) obtenidas por liofilización y almacenadas a diferentes humedades relativas (RH) fue estudiado. La retención de β-caroteno durante el almacenamiento se determinó midiendo la absorbancia a 452 nm con un espectrofotómetro. También se determinó la transición vítrea (T_g) y las isotermas de sorción de las matrices, con el objeto de obtener información del estado físico de la matriz. La degradación de β-caroteno siguió una cinética de primer orden respecto a la retención fraccional de β-caroteno. La ecuación de GAB describió adecuadamente las isotermas de sorción de todas las matrices estudiadas. Las constantes cinéticas de degradación (k_D) se incrementan al aumentar la RH de almacenamiento. La mayor degradación de β-caroteno se produjo a RH arriba de la Tg de las correspondientes matrices, cuando la matriz esta totalmente plastificada (gomosa) y colapsa (RH 75% y 92%). En estas condiciones la matriz que presentó la mayor retención de β-caroteno fue MD/GA mientras que la MD ofreció la menor protección. Los resultados obtenidos muestran que la degradación de β-caroteno esta determinada principalmente por el estado físico de la matriz vinculado al colapso de la misma. Estas observaciones pueden proporcionar información respecto a la cinética de moléculas lábiles encapsuladas en matrices deshidratadas.

ABSTRACT

The retention of β-carotene encapsulated by freeze-drying in various matrices consisting of maltodextrin or mixtures of maltodextrin with Arabic gum or gelatin stored at different relative humidities (RH) was investigated. β-carotene in the matrices was measured by absorbance readings at 452 nm using a spectrophotometer in the hexane fraction. The water sorption isotherms and glass transition temperatures (T_g) of matrices were also determined in order to determine the physical state of the matrices. β-carotene degradation followed a first-order kinetic model for the fractional retention in all encapsulating matrices. GAB model was adequate to describe the sorption isotherms of the systems containing encapsulated β-carotene. The degradation rate constants obtained increased as increasing relative humidity (RH) of the storage atmosphere. β-Carotene losses were observed mainly at RH above the glass transition temperature (T_g) of the corresponding systems, where the matrices were fully plasticized (i.e., rubbery) and collapsed (RH 75% and 92%). At these high RH the best β-carotene retention was obtained in the Arabic gum-containing systems. The lowest stability was observed in the maltodextrin systems. These results showed that pigment release was dependent on the physical state of matrix and related to degree of collapse. These observations may be a contribution to the knowledge of physical factors that affect the kinetics of retention of labile biomolecules encapsulated in dehydrated matrices.

PALABRAS CLAVE: *β-caroteno, goma arábiga, transición vítrea, encapsulación.*

KEYWORDS: *Gum Arabic, encapsulation, β-carotene retention, glass transition.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado notablemente la preferencia de los consumidores hacia productos naturales con determinados propiedades funcionales (nutracéuticos). El β-caroteno posee teóricamente el 50% de vitamina A (Delgado-Vargas *et al.* 2000). Sin embargo su demanda se ha incrementado principalmente debido a sus propiedades anticancerígenas (Giovannucci *et al.* 1999, Nishino *et al.* 1999), actividad antioxidante y su habilidad de neutralizar radicales libres (Delgado-Vargas *et al.* 2000, Bendich *et al.* 1989). Sin embargo por su alto grado de instauración es muy susceptible a la oxidación. La degradación de β-caroteno ocurre por oxidación directa sin isomerización y el producto resultante es incoloro, con lo cual pierde sus propiedades de colorante (Wagner y Warthesen 1995). La encapsulación en matrices amorfas de carbohidratos o polímeros obtenidas por congelación y deshidratación es una técnica que se ha incrementado notablemente en las industrias alimentaría y farmacéutica para aumentar la estabilidad y retención de compuestos lábiles así como también para el desarrollo de nuevos productos conteniendo compuestos bioáctivos

El material encapsulante debe poseer una solubilidad alta en agua, propiedades emulsificantes, baja viscosidad a concentraciones elevadas y proporcionar protección al compuesto lábil encapsulado bajo diferentes condiciones de almacenamiento (Kim *et al.*1996, Reinicius 1988, Bhandari *et al.* 1992). En general una única matriz no reúne todas las propiedades requeridas mencionadas anteriormente, por eso con el objetivo, de obtener la mejor performance en un proceso de encapsulación se recurre a mezclas de carbohidratos con proteínas o gomas en diferentes proporciones (Bhandari *et al.* 1992; Mcname *et al*. 2001, Sheu y Roseemberg , 1995, Voiley 1995).

Los cambios que ocurren en la estructura física de la matriz, como resultado de la transición vítrea (T_g) pueden acelerar numerosas reacciones químicas controladas por difusión tales como oxidación de lípidos, pardeamiento no enzimático y numerosas reacciones enzimáticas (Slade y Levine 1989). Todos estos cambios pueden ocasionar una disminución de la estabilidad del compuesto bioactivo encapsulado

Generalmente es aceptado que en el estado vítreo no es posible que reacción alguna ocurra pues debido a la alta viscosidad de la matriz, la difusión de los reactivos esta impedida. (Bell *et al.* 2002). Sin embargo las reacciones de oxidación dependen no solo del estado físico de la matriz, sino también de la exclusión de O_2 y de la difusividad y permeabilidad de la matriz y así se pueden producir oxidaciones aún en el estado vítreo (Karel 1991, Karel y Saguy 1991, Maa *et al.* 1997, Prado *et al.* 2007).

Además, la estabilidad del compuesto encapsulado depende de las propiedades de sorción de la matriz encapsulante, La determinación de las isotermas de sorción del material encapsulante, es entonces una herramienta fundamental para predecir las interacciones entre el agua y el material de la microcápsula y así poder estimar los cambios que se producen en la misma bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

La vida útil del β-caroteno aumentó notablemente, respecto al del jugo de zanahoria por encapsulación en maltodextrinas (Wagner y Warthesen 1995, Desobry *et al.* 1998). El efecto del peso molecular de las maltodextrinas Wagner y Warthesen (1995) y de la eficiencia de encapsulación utilizando diferentes métodos de secado para llevar a cabo la encapsulación, también fue estudiado. Poliakov *et al.* (2004) investigó la estabilidad de los complejos de inclusión de pigmentos carotenoides con β-ciclodextrina por espectroscopía ^{1}H-NMR y UV-visible y demostró que la β-ciclodextrina protege los carotenoides del O_2.

Elizalde *et al.* (2002) demostró que el cambio de color y la velocidad de degradación de β-caroteno encapsulado en un matriz de trehalosa dependieron fundamentalmente del exceso de agua necesario para formar el dihidrato cristalino de trehalosa.

En matrices poliméricas no cristalizables la liberación del compuesto encapsulado ha sido vinculada al colapso estructural como resultado de el almacenamiento de la matriz por arriba de la Tg de la matriz (Omatete y Judson King 1978, Levi y Karel 1995; Selim *et al.* 2000, Serris y Biliaderis 2001). Sin embargo, Prado *et al.* (2006) encontraron que la degradación de β-caroteno se produce en el estado vítreo (abajo de Tg) donde la matriz presenta una alta porosidad que facilita la difusión de O_2 y una rápida degradación de β-caroteno. Por el contrario, cuando la matriz estaba totalmente plastificada y presentaba colapso estructural se obtuvo la menor velocidad de degradación debido ala formación de micro poros.

La goma arábiga es un heteropolisácarido complejo cuya cadena principal esta formada por unidades de *D*-galoctopiranosa (Bemiefer y Whistler 1996) y que tiene una parte proteica unida por enlaces covalentes, la cual le confiere excelentes propiedades encapsulantes (emulsificantes y capacidad de formar películas). Estas propiedades han determinado su uso para la microencapsulación de *flavors* y aceites esenciales (Bertolini *et al.* 2001) y en mezclas con carbohidratos (maltodextrinas, almidón, etc.) (Mcname *et al.* 2000, Kaushik y Roos 2007).
La gelatina es una proteína que ha sido usado ampliamente para encapsulación (Shadi and Han 1993) debido a sus propiedades de formar *film* La misma ha sido utilizado para la encapsulación de *flavors* en mezclas con carbohidratos y emulsificantes (Robert *et al.* 2003, Yoshii *et al.* 2001).
El objetivo del presente trabajo fue estudiar la estabilidad y cinética de degradación de β-caroteno encapsulado en matrices mixtas de maltodextrina/gelatina o maltodextrina/goma arábiga en relación a las propiedades de sorción y estado físico de la matriz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La maltodextrina (MD) de PM promedio 1500 y equivalentes de dextrosa (DE): 13-17 empleada era de Grain Processing Corporation; el β-caroteno (30% p/v) adquirido a Eurovit NS (Warner Jenkinson Europe Ltd.) y la gelatina (GE) (100 Bloom) a Sanofi Bio-Industrias (Argentina SA). La goma Arábiga (GA) (*Acacia Senegal*) era de Sigma Chemical Co.(St Louis MO USA). Los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico de marca Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO).

Método de encapsulación y almacenamiento

Se mezclaron goma arábiga, gelatina y maltodextrina, según la composición que se muestra en la **Tabla 1** y disueltas en 350 ml de agua destilada a 45 *ºC* para obtener una solución al 30% de sólidos totales. A continuación se agregaron 0,4 g de la suspensión de β-caroteno (30% p/v). En el caso de la maltodextrina pura, a la solución acuosa se le añadió también gelatina (0,15% v/v) como emulsificante, la cual se disolvió previamente en agua caliente (Shimada *et al.* 1991). Todas las suspensiones se agitaron dos veces a 16000 RPM por dos minutos utilizando un Omni mixer. Dichas suspensiones se congelaron a -26 *ºC* por 24 horas para obtener cristales de hielo de tamaño adecuado y lograr un polvo homogéneo y poroso. Previo a la liofilización las muestras fueron sumergidas en nitrógeno líquido (-196 *ºC*) para permitir la máxima cristalización del agua congelable. Se utilizó un liofilizador Heto-Holten A/S, modelo CT 110 (Heto Lab Equipment, Denmark), que se operó a -110 *ºC* y a una presión de 4 $X10^{-4}$ mbar. Las emulsiones deshidratadas así obtenidas se pulverizaron en un mortero, se lavaron con hexano para remover el β-caroteno superficial no encapsulado y a continuación se secaron al vacío con $MgClO_4$.

Tabla 1. Composición de los sistemas sólidos utilizados.

Soluciones acuosas de polímeros (30% p/p)	Maltodextrina (% p/p)	Gelatina (% p/p)	Goma Arábiga (% p/p)
MD	30	-	-
MD/GE	20	10	-
MD/GA	20	-	10

Se distribuyeron alícuotas de aproximadamente 2 g de los sistemas deshidratados en viales de vidrio de 3 ml de capacidad y se expusieron a atmósferas de humedad relativa (RH) constante en desecadores evacuados a 25 *ºC*. Éstas fueron obtenidas mediante el empleo de soluciones salinas saturadas (ClLi (11%), K_2CO_3 (44%), NaCl (75%) y Cl_2Ba (92%)) (Greespan 1977*)*. A intervalos de tiempo determinados se tomaron muestras y se determinó el contenido de agua, el β-caroteno superficial y encapsulado y las transiciones térmicas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se informó el promedio de las mismas.

Isotermas de sorción

Las isotermas de sorción se determinaron utilizando el método isopiéstico. Los sistemas expuestos a las diferentes humedades relativas se pesaron periódicamente hasta obtener constancia de peso. Una vez alcanzado el equilibrio el contenido de agua se determinó por diferencia de masa antes y después del secado en estufa de vacío a 98 *ºC* durante 48 horas. Se inspeccionó también la apariencia de las

muestras para determinar si se produjo alguna modificación en la estructura física de las mismas (aglomeración, aterronamiento o colapso).
Numerosas ecuaciones empíricas y semiempíricas han sido propuestas para correlacionar la humedad de equilibrio con la a_w de alimentos Sin embargo las más utilizadas en la industria de los alimentos son las ecuaciones de B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller) y la de G.A.B. (Guggenheim-Anderson-de Boer). Dado el rango de a_w (0,22-0,92) que abarca el presente estudio, la caracterización de las isotermas de sorción se efectuó por medio de la ecuación de GAB (Ecuación 1). La misma es un modelo a tres parámetros y cuya expresión matemática es:

$$m = \frac{m_m C.k.a_w}{[(1-ka_w)(1+kC-ka_w)]} \qquad (1)$$

donde m es el contenido de humedad de equilibrio, $\mathbf{m_m}$ es el contenido de humedad de la monocapa, **C** es la constante de Guggenheim relacionada con el calor de sorción de la monocapa y **k** es un parámetro que corrige la diferencia entre las propiedades del agua en la multicapa respecto al agua libre.

Transiciones térmicas

Las transiciones térmicas fueron determinadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un equipo Mettler con un procesador TA 4000 y un sistema de análisis térmico TA72. El equipo fue calibrado con los puntos de fusión de Indio (156,6 *ºC*), plomo (327,5 *ºC*) y zinc (419,6 *ºC*). Los análisis se hicieron por duplicado, utilizando cápsulas de aluminio (Mettler) de 40 µL herméticamente selladas, conteniendo muestras de 5 a 10 mg. Como referencia se utilizó una cápsula vacía pinchada.
Para evitar los fenómenos de distorsión que suelen observarse al comienzo y final del calentamiento o enfriamiento, las determinaciones se realizaron en todos los casos comenzando el barrido por lo menos 30° C por debajo de la temperatura esperada para el inicio de una dada transición y finalizando por lo menos a una temperatura 10° C mayor.
Cada muestra fue calentada a una velocidad de 10 *ºC*/min entre -100 *ºC* y 200 *ºC* en orden de determinar la transición vítrea (T_g) y el punto de fusión (T_m). La T_g fue considerada como el comienzo de la discontinuidad de la curva de flujo de calor vs. temperatura y el T_m como el inicio del pico de fusión.

Determinación de β-caroteno superficial y encapsulado

El método de determinación del β-caroteno superficial y encapsulado se basa en que este es lipofílico y entonces soluble en hexano mientras que las matrices (goma arábiga, gelatina y maltodextrina) hidrosolubles..
El β-caroteno superficial se determinó mediante el lavado de alícuotas de 0,05 g de las muestras en estudio con 2 ml de hexano en tubos de vidrio, y posterior agitación durante dos minutos en un vortex. Este tratamiento resultó adecuado para remover todo el β-caroteno presente en la superficie. A continuación los polvos se separaron del solvente por decantación y la concentración de β-caroteno en la fase orgánica se midió espectrofotométricamente a 452 nm. Se ha encontrado que esta longitud de onda corresponde a la máxima absorbancia del espectro del β-caroteno entre 200 y 600 nm, y coincide con los resultados obtenidos por Lamikanra (1985), Chen (1992) y Desobry *et al.* (1997).
El β-caroteno encapsulado se determinó dispersando los polvos remanentes con 1 ml de agua y agitando durante dos minutos en un vortex (con el fin de disolver la matriz y poder liberar el β-caroteno encapsulado). A continuación se agregaron 2 ml de hexano, se agitó dos minutos, se midió la absorbancia de la fase orgánica (amarilla anaranjada) a 452 nm y se expresó como unidades de absorbancia por gramo de sólidos secos (UA/g).
Las mediciones fueron realizadas con un espectrofotómetro UV–Vis (UV-1203 Shimadzu).
El grado de encapsulación (GE) durante el proceso de liofilización se calculó para cada formulación, como los µg de β-caroteno obtenidos a partir de las unidades de absorbancia de los extractos orgánicos y empleando el coeficiente de absortividad, por gramo de sólidos secos (Szpylka y DeVries 2005).
El porcentaje de retención (%R) se determinó dividiendo el GE a cada tiempo por el valor del GE inicial.

Análisis de los Datos

Las constantes cinéticas de la retención de β-caroteno y los parámetros de la ecuación de GAB se calcularon mediante la aplicación de regresiones no lineales a los datos experimentales (Graph Pad Prism Version 4.1 Software). Este Software permite obtener también las desviaciones estándar correspondientes y los coeficientes de correlación (R^2) entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Todos los parámetros se determinaron con un 95% de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Isotermas de sorción

En la **Figura 1** se muestran los valores experimentales de las isotermas de sorción de agua a 25º de las matrices puras y sus mezclas con MD. En la misma se puede apreciar una notable diferencia entre las isotermas de las matrices puras y las mixtas. Los valores del contenido de agua de equilibrio de las matrices mixtas (MD/GE o MD/GA) fueron significativamente menores que los correspondientes a los sistemas puros (MD, GE, GA) a la misma RH. Resultados similares fueron hallados por Perez-Alonso *et al.* (2006) para mezclas de maltodextrinas con goma arábiga. La presencia de la MD en la GE o GA probablemente modifica el balance de los sitios hidrofílicos a hidrofóbicos y ocasiona así una disminución de la cantidad de agua adsorbida por la matriz (Kurozawa *et al.* 2009).

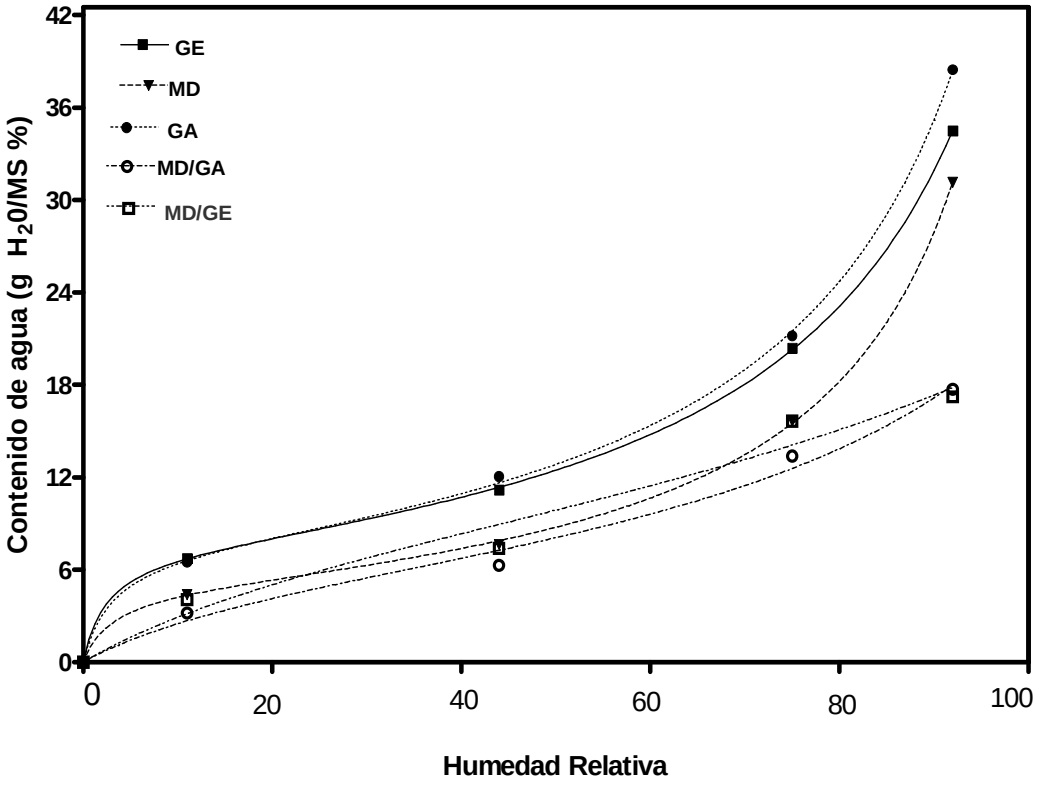


Figura 1. Isotermas de sorción de agua de β-caroteno encapsulado en matrices de MD, GE, GA, MD/GE y MD/GA a 25 *ºC*. Los símbolos representan los datos experimentales y las líneas los predichos por la ecuación de GAB.

Las isotermas de sorción fueron caracterizadas por medio de la ecuación de GAB (Ecuación 1). Los valores de los parámetros de dicha ecuación (m_m, C y k), sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de correlación (R^2) se muestran en **Tabla 2**. El modelo de GAB describió adecuadamente las isotermas de sorción de todos los sistemas estudiados (**Tabla 1**). En efecto, los valores de R^2 fueron en todos los casos $\geq 0{,}97$ y el error porcentual de todos los parámetros fue $\leq$ 10%, excepto para los sistemas mixtos: MD/GE y MD/GA y en particular, para el parámetro C. El buen ajuste entre los valores experimentales (símbolos) y los predichos por la ecuación de GAB (líneas) también puede observarse en la **Figura 1.**

Tabla 2. Valores de los parámetros de la ecuación de GAB: m_m, k y C con sus correspondientes desviaciones estándar (σ) y coeficientes de correlación (R^2) a 25 *ºC.*

Matriz	$m_m \pm \sigma_m$ (g H_2O/g MS)%	$C \pm \sigma_c$	$k \pm \sigma_k$	R^2
MD	4,9 ± 0,1	34,5 ± 9,9	0,91 ± 0,01	0,999
GE	7,3 ± 0,09	47,1 ± 7,7	0,85 ± 0,003	0,999
GA	7,4 ± 0,2	36,8 ± 12,9	0,87 ± 0,007	0,9997
MD/GE	9,9 ± 6,4	8,0 ± 7,7	0,56 ± 0,3	0,973
MD/GA	6,4 ± 1,9	7,2 ± 5,9	0,72 ± 0,09	0,991

MS: Masa Seca

Retención de β-caroteno durante el almacenamiento

En todas las muestras analizadas la concentración de β-caroteno superficial, determinado por espectrofotometría en los lavados con hexano, fue despreciable. Esto no quiere decir que el caroteno permaneció encapsulado, sino que no pudo ser detectado en la superficie debido a su rápida degradación. Entonces, en el presente estudio solo será analizado el β-caroteno encapsulado. En la **Figura 2** se muestra la retención de β-caroteno durante el almacenamiento a 25 *ºC*. Las muestras a RH 11 y 44% estaban en el estado vítreo a 25° C (**Tabla 2**). A RH 75 y 92% todas las matrices presentaron colapso estructural, con apariencia pegajosa y compacta. Es de destacar el caso de la matriz MD/GE, que a pesar de que los valores de T_g correspondientes a dichas a_w eran superiores a 25 *ºC* (63 y 46), y aún así estaban colapsadas. La forma general de las curvas de retención (% R) consistió en una etapa inicial de rápido decrecimiento, seguido de una fase lenta que se aproxima a un *plateau* (**Figura 2**). Las curvas obtenidas (**Figura 2**) fueron ajustadas por medio de la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{R - R_\infty}{R_o - R_\infty} = -k_D t \qquad (2)$$

donde: R_o, R_∞ =% de retención de β-caroteno a tiempo cero y en equilibrio respectivamente y k_D: constante cinética de degradación.

Resultados similares fueron hallados por Elizalde *et al.* (2002), Sutter *et al.* (2007), Prado *et al.* (2006) para β-caroteno encapsulado en matrices de trehalosa, manitol y PVP respectivamente.

Los valores de R_o, R_∞, k_D y las correspondientes desviaciones estándar (σ_{Ro}, $\sigma_{R\infty}$ and σ_{kD}) se muestran en la **Tabla 2**. Los coeficientes de correlación (R^2) entre los valores experimentales y aquellos predichos, utilizando la Ecuación 2 fueron altos (R^2>0,93).

La velocidad de degradación de β-caroteno (k_D) y la retención fue dependiente de la RH% y de la naturaleza de la matriz. Para todas las matrices, la velocidad de degradación aumentó con la RH, mientras que la retención disminuyó con dicha variable, en forma dependiente de la matriz (**Tabla 2**). Así, la matriz MD/GE mostró una fuerte dependencia de la RH, en tanto que la matriz MD/GA no presentó prácticamente cambios. La matriz más eficiente fue por lo tanto MD/GA.

Resultados similares fueron hallados por Yoshii *et al.* 2001 para la retención de butirato en matrices de maltodextrina/goma arábiga.

Relación entre las propiedades de sorción y térmicas y la retención de β-caroteno

En la **Figura 3** se muestra el efecto plastificante del agua sobre las diferentes matrices. La disminución relativa de T_g ocasionado por el aumento del contenido de agua a la matriz fue función de la naturaleza de la matriz. Las matrices puras de GA y GE mostraron los mayores valores de T_g y una disminución relativa mucho mayor que las matrices mixtas a bajos contenidos de agua. Como las matrices puras muestran los valores de sorción de agua más altos, se podría esperar un comportamiento inverso. Sin embargo hay que tener en cuenta que ambas matrices contienen proteínas de alto PM que aumentan su T_g. Las matrices mixtas, cuyos valores de sorción de agua son menores que los de las puras mostraron comportamientos diferentes en cuanto a la dependencia de T_g con el contenido de agua. Para el mismo contenido agua, la incorporación de MD disminuyó significativamente la T_g de la GA en todo el rango de HR, mientras que en el caso de la GE la disminución se observó únicamente a bajos contenidos de agua. Sin embargo, a pesar de presentar los menores valores de T_g, la matriz MD/GA fue la que presentó la mayor retención de β-caroteno y la de

MD/GE presentó la mayor velocidad de degradación especialmente a 75 y 92% de RH (**Tabla 3**). Esto se puede relacionar con el alto grado de colapso estructural en la matriz MD/GA que en este caso protegió al β-caroteno.

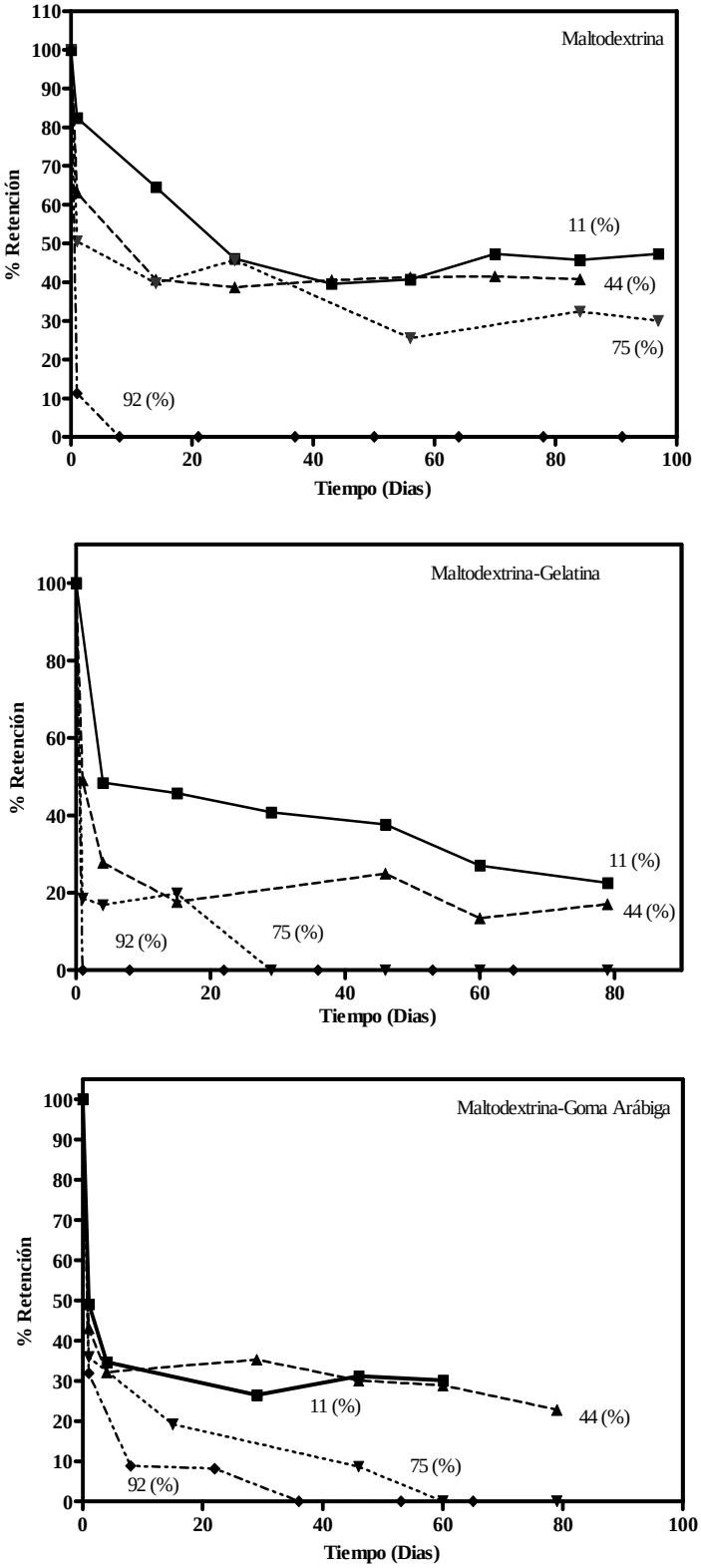


Figura 2. Retención (%) de β-caroteno encapsulado en matrices de MD, MD/GA y MD/GE en función del tiempo a diferentes hmedades relativas (RH%) y a 25 *ºC*.

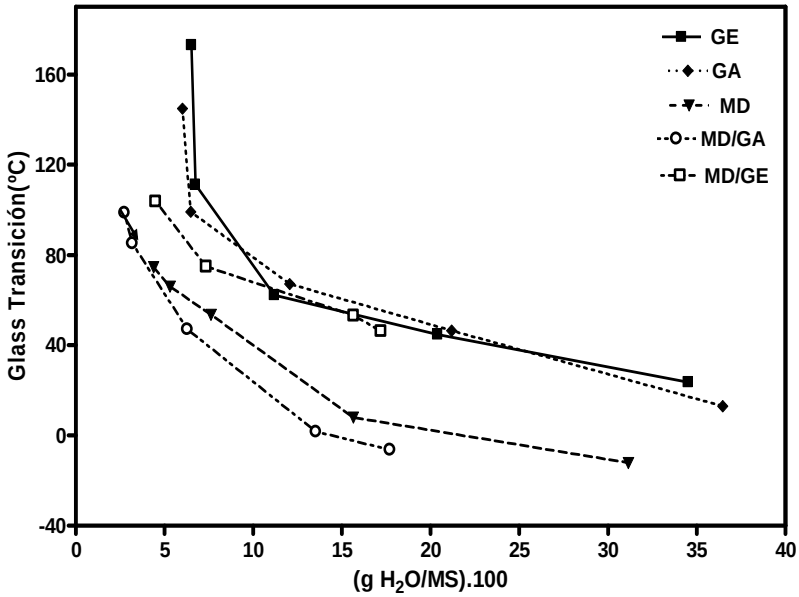


Figura 3. Efecto del contenido de agua en la transición vítrea de matrices deshidratadas de MD, GA, GE, MD/GA y MD/GE**.**

Tabla 3. Valores de los parámetros que describen la Retención (%) de β-caroteno encapsulado en matrices de MD, MD/GE con sus correspondientes transiciones vítreas (T_g) a diferentes humedades relativas (RH%) y a 25 *ºC*.

Matriz	RH (%)	T_g (°C)	$R_o \pm \sigma_{Ro}$	$R_\infty \pm \sigma_{R\infty}$	$k_D \pm \sigma_{kD}$	R^2
MD	11	66,00	94,11 ± 4	43,8 ± 3	0,08 ± 0,02	0,944
	44	53,40	100 ± 1	40,6 ± 1	0,97 ± 0,05	0,997
	75	8,00	100 ± 0.5	34,7 ± 4	1,4 ± 0,5	0,933
	92	-12,24	100 ± 2	0	2,2 ± 0,1	0,999
MD/GE	11	103,7	99,9 ± 10	34,6 ± 4	0,37 ± 0,2	0,906
	44	74,8	99,7 ± 6	19,6 ± 2	0,95 ± 0,2	0,979
	75	53	100 ± 10	6,1 ± 3	2 ±0,8	0,943
	92	46,2	100 ± 1	0	41,2 ± 5	0,999
MD/GA	11	85	99,9 ± 3	30,5 ± 3	1,3 ± 0,2	0,979
	44	47	100 ± 5	29,8 ± 2	1,7 ±0,4	0,992
	75	2	100 ± 9	7 ± 4	1,2± 0,4	0,966
	92	-6	100 ± 5	3,4 ± 2	1,2 ± 0,2	0,989

CONCLUSIONES

La degradación de β-caroteno siguió una cinética de primer orden respecto a la retención fraccional de β-caroteno, alcanzando un *plateau* cuyo valor depende del la HR. La ecuación de GAB describió adecuadamente las isotermas de sorción de todas las matrices estudiadas. Las constantes cinéticas de degradación (k_D) se incrementan al aumentar la RH de almacenamiento. La mayor degradación de β-caroteno se produjo a RH correspondiente a un valor de T_g de las correspondientes matrices inferior a la temperatura de almacenamiento, cuando las matrices estaban totalmente plastificadas (gomosas) y colapsadas (RH 75% and 92%). En estas condiciones la matriz que presentó la mayor retención de β-caroteno fue MD/GA mientras que la MD ofreció la menor protección. Una combinación adecuada de biopolímeros puede definir la estabilidad de biomoléculas lábiles encapsuladas. El estudio de las propiedades de sorción de agua y de las temperaturas de vitrificación pueden ser herramientas útiles para el diseño de la formulación de matrices protectoras.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires (UBACyT X024), CONICET (PIP5977), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 20545.) por el financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bell LN, Bell HM, Glass TE. 2002. Water Mobility in Glassy and Rubbery Solids as Determined by Oxygen-17 Nuclear Magnetic Resonance: Impact on Chemical Stability. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 35: 108-113

Bemieller N , WhistlerRL. 1996. Carbohydrates. In *"Food Chemistry"*Fenema, 0.R. 3rd Edition Marcel Dekker New York

Bendich A. Olson J A. Biological actions of carotenoids. 1989. FASEE J., 3, 1927-1932.

Bertolini AC, Sian AC, Grosso CRF. 2001. Stability of monoterpenes encapsulated in Gum Arabic by spray-drying. J. Agric. Food Chem, 49: 780-785

Bhandari BR, Dumolin ED, Richard HMJ, Noleneau I , Lebert AM. 1992. Flavour encapsulation by spray drying. Applications to citral and linalyl acetate. Journal of Food Science, 57: 217-221.

Brazel CS. Microencapsulation offering solutions for the food industry. 1999**.**Cereal Food World, 44, 338-390, 392-393.

Chen BH. 1992. Studies of the stability of carotenoids in garland chrysanthemum as affected by microwave and conventional heating. J. Food Prot., 55: 296-300.

Delgado Vargas E, Jime´nez AR, Paredes-Lo´pez O. 2000. Natural pigments Carotenoids, anthocyanins and betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 40: 173-289.

Desobry SA, Netto FM, Labuza TP. Preservation of β-carotene from carrots. 1998. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 38: 381-396.

Elizalde, B. E.; Herrera, L.; Buera, M. P. Retention of *â*-carotene encapsulated in a trehalose matrix as affected by moisture content and sugar crystallization. . 2002 J. Food Sci, 57: 3039-3045.

Findlay, J. W. (Eds); LAW Levier Scientific Publishing: Amsterdam, New York, 1989; pp 9-124.

Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: Review of the epidemiological literature. J. Natl. Cancer. Inst., 91: 317-331.

Greenspan L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J. Res. Natl. Bureau Stand. A, 81: 89-102.

Karel M. 1991. Physical structure and quality of dehydrated foods. Drying, 26-35.

Karel M, Saguy I.1991. Effects of water on diffusion in food systems. In Water Relationships of Foods. Levine H, Slade L. Eds. Plenium Press, New York, pp 157-173.

Kaushik V, Roos YH. 2007. Limonene encapsulation in freeze- drying of gum Arabic-gelatin systems. LWT, 40: 1381-1391.

Kim YD, Morr CV, Schhens TW. 1996. Micro-encapsulation properties of gum Arabic and several proteins :Liquid-orange oil emulsion particles. Journal of Food agricultural and chemistry, 44: 1308-1313.

Kurozawa EL, Park KJ, Hubinger MP. 2009. Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption isotherms an glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. Journal of Food Engineering, 91: 287-296.

Lamikanra, O. 1985. Feasibility of sulphite mediated β-carotene destruction in heterogeneous systems and carrots. J. Food Process Preserv., 9: 209-215.

Levi G, Karel M. 1995. The effect of phase transitions on release of *n*-propanol entrapped in carbohydrate glasses. J. Food Eng., 24: 1-13.

Maa YF, Constantino HR, Nguyen PA, Hsu CC. 1997. The effect of operating and formulations variables in the morphology of spray dried protein particles. Pharm. Dev. Technol., 2:213–223.

Mcname BE, O´Riordan ED Sullivan M. (2001).Effect of partial replacement of gum Arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. Journal of Food Agricultural and Food Chemistry, 49: 3385-3388.

Nishino H, Tokuda H, SatomiY, Masuda M, Bu P, Onozuka M,Yamaguchi S, Okuda Y, Takayasu J, Tsuruta J, Okuda M, Ichilsi E, Murakoshi M, Kato T, Misawa N, Narisawa T, Takasuka N, Yano M. 1999. Cancer prevention by carotenoids. Pure Appl. Chem., 71: 2273-2278.

Omatete OO, Judson King C. 1978. Volatiles retention during rehumidification of freeze-dried food models. J. Food Technol., 13: 265-280.

Perez-Alonso C, Beristain CI, Lobato-Calleros C , Rodriguez-Huezo ME, Vernon-Carter EJ. 2006. Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. Journal of Food Engineering, 77: 753-760.

Polyakov N E, Leshina TV, Konavolava TA, Hand OE, Kispert LD. 2004.Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins 1H NMR, EPR and optical studies. Free Radical Biol. Med., 16: 872-880.

Prado SM, Buera P, Elizalde BE. 2006. Structural collapse prevents *â*-carotene loss in a supercooled polymeric matrix. J. Agric. Food Chem., 54: 7̃985.

Pszczola D. 2003. Getting more fruit and vegetables into food. Food Technol., 57: 52-63.
Qui ZH, Xu A.1999. Starch -based ingredients for flavor encapsulation Cereal Food World, 44: 460-465.

Reinicius, G.A. 1988. Spray drying of food flavours .In" Flavour Encapsulation" ACS symposium series 370 (pp.55-66) Washington D.C. American Chemical Society,

Robert P, Carlsson RM, Romero N, Masson L. 2003. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. JAOCS, 80: 1115-1119

Rodrıguez-Huezo ME, Pedroza-Islas R, Prado-Barraga´n LA, Beristain CI, Vernon-Carter E. 2004.Microencapsulation by spray-drying of multiple emulsions containing carotenoids. J. Food Sci. 69: E351-E356.

Selim K, Tsimidou M, Biliaderis CG. 2000. Kinetric studies of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. Food Chem., 71: 199-206.
Serris GS, Biliaderis CG. 2001. Degradation of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices. J. Sci. Food Agric., 81: 691-700.

Shahidi F, Han XQ. 1993. Encapsulation of Food ingredients. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 6:13-35.

Sheu TY, Rosemberg M. 1995. Microencapsulation by spray drying of ethyl caprylate in whey proteins and carbohydrate systems. Journal of Food Science, 60: 98-103.

Shimada Y, Roos, Y, Karel M. 1991. Oxidation of methyl linoleate encapsulated in amorphous lactose-based food model.. J. Agric. Food Chem., 39: 637-641.

Slade L, Levine H, Finlay JW. 1989. Protein-water interactions: Water is a plasticiser of gluten and other protein polymers.In Protein Quality and the Effects of Processing. J. W., Eds.; LAW Levier Scientific Publishing: Amsterdam, New York, pp 9-124.

Sutter CS, Buera MP, Elizalde BE. 2007. β-Carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. International Journal of Pharmaceutics, 332: 45–54.

Szpylka J, DeVries JW. 2005. Determination of β-carotene in supplements and raw materials by reversed phase liquid chromatography: Collaborative study, Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, 88:.1279–1291.

Voile AJ. 1995. Flavor encapsulation. Influence of encapsulation media on aroma retention during freeze and air drying in Encapsulation and controlled release Risch SJ, Reineccius GA. (Eds). ACS Symposium Series 590 (pp. 169-179). Washington D.C. American Chemical Society.

Wagner LA, Warthesen JJ. 1995.Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. J. Food Sci., 60: 1048-1053.

Yoshii H, Scoottitantawat A , Liu XD , Atarashi T, Furuta T, Aishima S, Ohgawara M, Linko P. 2001. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum Arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2: 55-61.

Efectos de las modificaciones de proteínas de guisantes y soja sobre sobre el comportamiento reológico de los geles de almidón de maíz y mandioca

Effects of enzymatic modification of pea and soy protein on the rheological profile of corn and cassava starch-protein gels

Ribotta PD (1) (2), Colombo A (2), Rosell CM (1)

[1] Cereal Group, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Burjassot, Spain
[2] CONICET- Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
pribotta@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

Las interacciones entre proteínas y almidón durante el procesamiento de los alimentos tienen influencia sobre la estructura del gel y sus propiedades reológicas. La adición de proteínas a geles de almidón produce un debilitamiento de su estructura y un aumento de la sinéresis. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de las proteínas de soja y guisante modificadas enzimáticamente sobre las propiedades viscosimétricas y reológicas de geles de almidón de mandioca y de maíz. En este trabajo, se utilizaron aislados de proteínas de guisante (APG) y de soja (APS). Los aislados fueron previamente incubados con enzimas, una proteasa (PE) o una transglutaminasa microbiana (TG). Se analizaron los cambios en la solubilidad y en el perfil electroforético (SDS-PAGE) de las proteínas como resultado de las modificaciones introducidas por las enzimas. Se estudió el comportamiento reológico de las pastas y los geles, y la capacidad de retener agua de los geles (sinéresis). Las proteínas de los aislados fueron sustancialmente modificadas pos ambas enzimas. TG y PE produjeron una parcial polimerización e hidrólisis, respectivamente, como quedó demostrado a través del perfil electroforético y los cambios en el grado de hidrólisis de las proteínas. La incorporación de las proteínas de soja y guisante aumentaron la viscosidad de las suspensiones de almidón durante el proceso de calentamiento y enfriamiento. Sólo, la adición de proteínas tratadas con proteasa produjo una disminución de la viscosidad final durante el proceso de gelatinización de los almidones, con respecto a las mezclas de proteínas no tratadas y almidón. Los geles de maíz tuvieron mayores valores de los módulos de almacenamiento (G′) y de pérdida (G″) y menores valores de la tangente (tan δ = G"/G') que los geles de almidón de mandioca, indicando que los primeros fueron más elásticos y resistentes que los segundos. La incorporación de proteínas de soja y guisante aumentó G′ y G″ de los geles, y la magnitud del incremento fue mayor en geles de mandioca. Cuando las proteínas incorporadas fueron previamente incubadas con PE, se logró una disminución significativa de G′ y G″. Cuando las proteínas de soja fueron tratadas con TG se verificó un aumento de G′ y G″, pero el efecto contrario fue observado cuando las proteínas de guisante fueron incubadas con TG. La sinéresis de los geles de almidón de maíz disminuyó con la adición de proteínas de soja, pero no cambió cuando se usaron las proteínas de guisante. La sinéresis incrementó cuando se incorporó proteínas incubadas con PE. Los geles elaborados con almidón de mandioca no tuvieron separación de fase líquida durante el período de almacenamiento analizado en este trabajo. La utilización de proteínas incubadas con diferentes enzimas modificó sustancialmente la estructura y las propiedades reológicas de los geles de maíz y mandioca, lo que puede ser útil en el diseño de nuevos productos alimenticios.

ABSTRACT

The gelation ability of different starches and vegetal proteins could present an interesting alternative to gelled milk-starch products. Interactions between proteins and starch during processing can markedly influence starch gel network structure and its rheological profile. The present work aimed to study the effects of enzymatic modifications of pea and soy protein on the rheological profile of corn and cassava starch gels. Pea protein isolate (APG) and soybean protein isolate (APS) were used as source of vegetal proteins. Protein isolates were previously incubated with a peptidase (PE) or microbial transglutaminase (TG) to determine the impact of hydrolysis or crosslinking, respectively. Protein solubility and SDS-PAGE profile of enzyme treated proteins were determined. Rheological and

syneresis behaviors and structure of protein-corn starch gels were analyzed. Soy and pea protein were substantially modified by enzymes. TG and PE produced partial polymerization and hydrolysis of protein isolates, respectively; which was evidenced by the electrophoretic profile and confirmed by the hydrolysis and aggregation degrees. TG-treated isolates showed a decrease of protein solubility and PE-treated isolates presented the opposite result. The addition of soy and pea proteins increased viscosity of starch suspensions during and after the heating process. AL-treated proteins decreased pasting final viscosity in comparison with not-treated proteins. Corn gels showed higher storage (G′) and loss (G″) moduli and lower values of loss tangent (tan δ = G"/G') than cassava gels, indicating that corn gels were stronger and more elastic than cassava gels. The addition of pea and soy protein increased both G′ and G″ of starch gels, and this increment was much higher in cassava gels. The incorporation of PE-treated proteins to starch systems decreased both G′ and G″. TG treatment increased G′ and G″ when APS was used, but the opposite effect was observed to TG-modified APG. Corn-gel syneresis was decreased by APS, and did not change with APG. Only the PE treatment increased gel syneresis, reaching higher values than corn starch alone. Cassava gels did not show separation of water from gels. Different network structures and rheological properties can be obtained combining the use of different enzyme treated protein isolate with corn and cassava starches, which results very useful for designing new food products.

PALABRAS CLAVE: *almidón, guisante, soja, enzimas, geles.*

KEYWORDS: *Starch, pea, soy, enzymes, gels.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha puesto mucho interés en la obtención de alimentos libres de compuestos derivados animales. El aumento de enfermedades como diabetes tipo II, enfermedades digestivas y cardiovasculares y la reticencia al consumo de productos animales, han incrementado la utilización de derivados vegetales en sistemas alimenticios (Nunes *et al.* 2003). En este sentido, las proteínas de leguminosas son capaces de proveer beneficios nutricionales y propiedades funcionales deseables. Su utilización como alternativa al uso de proteínas animales en alimentos basados en mezclas de almidón y proteínas de leche tiene gran interés nutricional y comercial. Cuando se adicionan proteínas vegetales a este tipo de alimentos, se logra un incremento de la cantidad de proteínas y, debido a que estas formulaciones no contienen derivados lácteos, pueden ser usados por personas que son intolerantes a la lactosa (Endres, 2001). En diversos trabajos se han logrado desarrollar postres gelificados conteniendo proteínas vegetales con propiedades similares a los comerciales, en los que diversos aditivos (como hidrocoloides o emulsionantes) debieron ser agregados a las formulaciones (Nunes *et al.* 2006, Lim y Narsimhan 2006). De acuerdo a Nunes *et al.* 2003, la utilización de proteínas de soja, lupino y guisante produce una disminución de la firmeza y un aumento de viscosidad en los geles elaborados respecto de los que contienen proteínas de leche. Las interacciones entre proteínas y almidón durante el procesamiento influencian la estructura del gel y sus propiedades reológicas. La adición de proteínas de soja a geles de almidón produce un debilitamiento de la estructura y un aumento de la sinéresis (Ribotta *et al.* 2007). Por lo tanto, es necesario un mayor conocimiento relacionado con las interacciones presentes entre las proteínas vegetales y el almidón en este tipo de alimentos.

Entre las enzimas que producen modificaciones estructurales de las proteínas se destacan las proteasas y la transglutaminasa. Las proteasas o peptidasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas produciendo péptidos de menor tamaño. La transglutaminasa (TG) es una aciltransferasa que cataliza entrecruzamientos intra e intermolecular de proteínas a través de la formación de una unión peptídica entre residuos de lisina y glutamina, originando polímeros de alto peso molecular (Marco *et al.* 2007). La TG cataliza la formación de polímeros homólogos o heterólogos entre las proteínas de la leche, carne, soja y gluten (Bonet *et al.* 2006).

El tratamiento de aislados proteicos con enzimas que modifiquen su estructura y funcionalidad puede resultar beneficioso tanto en la comprensión de las interacciones entre los componentes como en el desarrollo de productos con mejores propiedades físicas y sensoriales. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de proteínas de soja y guisante modificadas enzimáticamente sobre las propiedades reológicas de geles de almidón de mandioca y maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron almidones de maíz (M) y mandioca (T) (Señor de Sipan, Caseros, Argentina) y aislados proteicos de guisante (APG) y de soja (APS) (Trades SA, Barcelona, España). APG tuvo un contenido de humedad, proteínas, lípidos y cenizas de 67 g kg−1, 848 g kg−1, 9 g kg−1 y 45 g kg−1 (base seca), respectivamente. Para APS, los contenidos de humedad, proteínas, lípidos y cenizas fueron 69 g kg−1, 808 g kg−1, 2 g kg−1 y 36 g kg−1, respectivamente.

Los aislados proteicos fueron tratados con una transglutaminasa (TG) microbiana de *Streptomyces* spp. (Ajinomoto Co. Inc.) donada por Apliena SA (España) y con una proteasa (Subtilisina) (EP) de *Bacillus licheniformis* (Alcalase® 2.4 L FG, Novozymes Latin America Ltda).

Incubación

Para la incubación de los aislados con las enzimas mencionadas, se suspendieron 1,32 g de APG o de APS en 20 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 6,5. Se realizaron tres tipos de mezclas: i) control: aislado proteico en agua destilada sin adición de enzima; ii) tratadas con TG: aislado proteico más 11 mg de transglutaminasa (0,83 unidades de TG/g de aislado); y iii) tratadas con EP: aislado proteico más 30 μL de endopeptidasa (49,1 mAU de EP/g de aislado). Las mezclas (en tubos herméticos) fueron incubadas a 35 °C durante 5 h, con agitación cada 30 min. Posteriormente, se sumergieron en agua en ebullición durante 10 min para la inactivación de las enzimas, y se enfriaron hasta temperatura ambiente bajo flujo de agua.

Solubilidad de proteínas y grado de hidrólisis

Luego de la incubación e inactivación enzimática, los tubos fueron centrifugados a 4400 *g* durante 15 min, obteniéndose un sobrenadante (S1). Se determinó el contenido de nitrógeno a una alícuota de 500 μL del sobrenadante mediante el método de Kjeldhal, que correspondió al contenido de nitrógeno soluble en agua. Por otro lado, se determinó el grado de hidrólisis (GH) de las proteínas incubadas con respecto a las muestras no tratadas enzimáticamente. Para ello, se tomaron 5 mL de S1 y se le adicionaron 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) (20% v/v). Esta mezcla fue agitada y centrifugada a 12000 *g* durante 15 min, obteniéndose un sobrenadante (S2) que corresponde a la fracción de péptidos soluble en TCA 10%. Se tomó 1 mL de S2 y se determinó su contenido de nitrógeno mediante el método de Lowry, el cual corresponde al contenido de nitrógeno soluble en TCA 10% (N_TCA10) (**Kim *et al.* 1990**). El grado de hidrólisis se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$GH = (N_TCA10_incubado - N_TCA10_control)/ N_TCA10_control$$

donde N_TCA10_incubado corresponde al contenido de N soluble en TCA 10% de los aislados incubados con las distintas enzimas y N_TCA10_control corresponde al contenido de N soluble en TCA 10% de los aislado proteicos no tratados enzimáticamente (control)

Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en placa (70 x 80 mm) sobre geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Se utilizó un equipo Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad laboratories, EUA). Las corridas se hicieron con voltaje constante (150 V), hasta que el marcador del frente alcanzó el final del gel (aproximadamente 90 min). Las subunidades proteicas se analizaron mediante un procedimiento de electroforesis en gel con un apilador ("stacking") y un separador, con 4% y 12% de acrilamida respectivamente. Se utilizaron como marcadores de masa molecular una mezcla constituida por miosina (200,0 kDa), β-galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), albúmina sérica (66,2 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (31,0 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotina (6,5 kDa) (Bio-Rad laboratories, EUA).

Propiedades Viscosimétricas

Las propiedades viscosimétricas de las mezclas fueron determinadas utilizando un Rapid Visco Analyser (RVA) (Newport Scientific model 4-SA, Australia). Se prepararon dispersiones de cada uno de los almidones con los diferentes aislados proteicos no modificados y modificados enzimáticamente y se ajustó el pH a 6,5. Para esto, se pesaron 1,32 g de almidón y se agregaron 5 mL de agua y la suspensión de aislado (1,32 g de APG o APS en 20 mL de agua destilada) preparada según el procedimiento descrito anteriormente. La viscosidad fue determinada durante el ciclo de calentamiento-enfriamiento: calentamiento de 50 a 95 °C en 288 s a una velocidad de 9,4 °C/min, período de mantenimiento a 95 °C durante 150 s y enfriamiento a 50 °C en 228 s; la velocidad de

agitación fue de 960 rpm durante 10 s y luego disminuyó a 160 rpm durante el resto del ciclo. Los parámetros determinados fueron: temperatura de *pasting*, viscosidad de pico, viscosidad final, *breakdown* y *setback*. Una vez finalizado el proceso de gelatinización en el RVA, las mezclas calientes se trasvasaron a tubos plásticos de 50 mL de capacitad con tapas. Las mediciones se realizaron por duplicado.

Reología

Los geles obtenidos en el RVA se almacenaron 24 h a 25 *ºC* y se analizaron con un reómetro de esfuerzo controlado (Rheostress 1 Termo Haake, Alemania). Se utilizó una geometría de plato rugoso (60 mm de diámetro, 0,5 mm de distancia entre platos). El gel se colocó entre los platos, se eliminaron los restos de gel y se colocó una fina película de vaselina para prevenir evaporación durante la medición. Luego de 3 min de reposo se comenzó el análisis de las muestras. Las mediciones fueron realizadas a 25 °C. En una primera etapa se realizó un barrido de deformación a 1 Hz para determinar la región de viscoelasticidad lineal. Posteriormente, se realizaron barridos de frecuencia (0,01 a 10 Hz) con una deformación de 0,04% y se determinó el módulo de almacenamiento (G´), módulo de pérdida (G´´) y tangente del ángulo de desfasaje (tan δ). Se obtuvieron dos réplicas de cada gel, y se informaron los promedios± desvío standard (DS).

Sinéresis

La liberación de líquido durante el almacenamiento de los geles fue determinada mediante centrifugación. Se utilizó una centrifuga Beckman J2-MI (Beckman Instruments, EUA). Los geles de almidón/aislados proteicos (~15 g) recién obtenidos en el RVA se colocaron en tubos de centrífuga de 50 mL y se almacenaron a 4-6 °C durante 7 días. Luego del almacenamiento refrigerado, los geles se dejaron reposar (~2 h) hasta que su temperatura alcanzó la temperatura ambiente (~25 °C) y se centrifugaron a 1500 g durante 15 min a 20 °C. El líquido liberado fue separado y pesado. El contenido de líquido separado fue informado como porcentaje del contenido total de agua presente en el gel. Las mediciones correspondieron al valor medio de tres repeticiones para cada gel preparado por duplicado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el método de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación de 0,05. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Infostat (Infostat 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los tratamientos enzimáticos sobre la solubilidad y la estructura de las proteínas

En la **Tabla 1** se muestran los valores de solubilidad de nitrógeno en agua (N_S1) para los distintos aislados proteicos modificados y no modificados enzimáticamente. El tratamiento de ambos aislados con TG produjo una disminución de la solubilidad de las proteínas en agua. Transglutaminasa es una enzima que cataliza la reacción entre grupos ε-amino de un residuo de lisina y grupos γ-carboxamida de un residuo de glutamina, lo que produce enlaces inter- o intramoleculares (Nonaka *et al.* 1989). La formación de enlaces intermoleculares origina un aumento del peso molecular de las proteínas que explica la pérdida de solubilidad. Por otro lado, y como se esperaba, las modificaciones producidas por EP sobre los aislados estudiados provocaron un aumento de la solubilidad del nitrógeno proteico.

Se estudió el grado de hidrólisis de los aislados mediante la determinación de la solubilidad de nitrógeno en TCA 10% (**Tabla 1**). La adición de TG a los aislados proteicos no produjo una variación significativa en los valores de nitrógeno provenientes de péptidos solubles en TCA. Los aislados modificados con EP tuvieron un aumento significativo en la solubilidad de péptidos en TCA, mostrando grados de hidrólisis de 549% y 865% para APS y APG con respecto a las muestras no modificadas enzimáticamente, respectivamente.

La **Figura 1** muestra los perfiles de proteínas separadas por SDS-PAGE. La presencia de una banda ancha e intensa de baja migración, en el inicio del gel separador, correspondiente a la muestra APS-TG (carril 3), indica que la enzima transglutaminasa produjo la agregación de proteínas de menor masa, formando estructuras de mayor masa molecular (los cuales tuvieron muy baja movilidad electroforética). Por otro lado, la presencia de bandas de elevada movilidad, es decir de muy baja masa molecular (péptidos), y la ausencia de bandas características de APS que se observan en el carril 4

(APS-EP), confirman la capacidad de EP para producir, un elevado grado hidrólisis de las proteínas de soja. Las proteínas de guisante mostraron la misma tendencia que las proteínas de soja como consecuencia de los tratamientos con TG y EP. En el carril 6 (APG-TG), puede observarse la presencia de bandas de proteínas lo suficientemente grandes para quedar retenidas en el gel apilador, aún mayores que las formadas en muestras de soja. Asimismo, puede observarse la desaparición de bandas de proteínas de entre 97 y 31 kDa, como consecuencia de la agregación proteica. En el carril 7 la ausencia total de bandas evidencia el marcado efecto de hidrólisis que tuvo EP sobre las proteínas de guisante.

Tabla 1. Efectos del tratamiento enzimático sobre la solubilidad de proteínas.

Muestra	N_S1 (mg/mL)	N_TCA10% (mg/mL)
APS	2,84 ± 0,00	1,14 ± 0,11
APS+TG	2,18 ± 0,13	1,11 ± 0,03
APS+EP	10,41 ± 0,13	7,43 ± 0,88
APG	3,17 ± 0.33	0,68 ± 0,06
APG+TG	1,70 ± 0,13	0,58 ± 0,05
APG+EP	8,52 ± 0,00	6,53 ± 0,28

N_S1: contenido de nitrógeno correspondiente a proteínas solubles en agua.
N_TCA10: contenido de N correspondiente a péptidos solubles en TCA 10%.

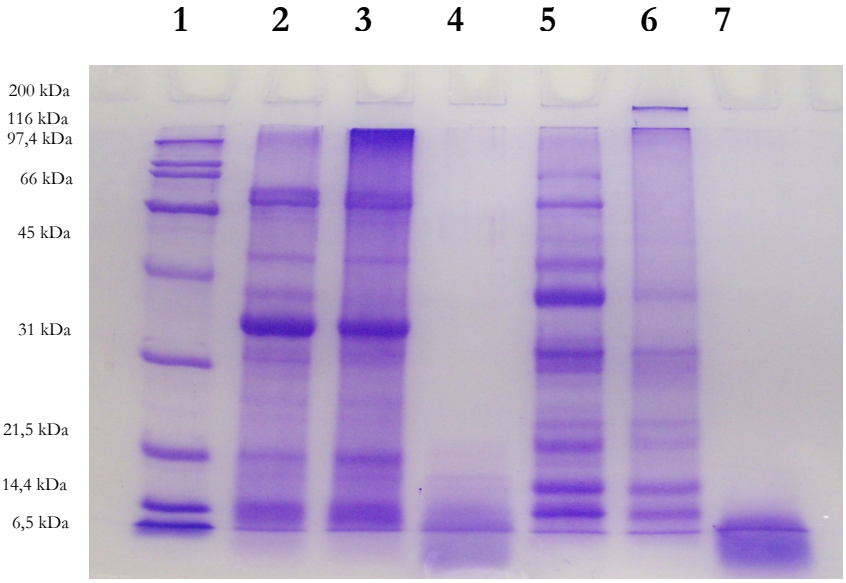


Figura 1. Efecto del tratamiento enzimático sobre las proteínas de soja y guisante. 1: standard de masa molecular, 2: APS, 3: APS-TG, 4: APS-EP, 5: APG, 6: APG-TG, 7: APG-EP.

Propiedades Viscosimétricas

El agregado proteínas, ya sea no modificadas como modificadas enzimáticamente, produjo un aumento de la viscosidad de pico (PV) y de la viscosidad final (FV) de la pasta durante el proceso de gelatinización de los almidones ensayados (**Tabla 2**). Estos aumentos fueron mayores en los geles de mandioca que en los de maíz. Asimismo, el agregado de proteína al almidón de maíz produjo una disminución drástica de la temperatura de *pasting*, mientras que en mandioca no se produjeron cambios dramáticos, excepto cuando APG modificado con EP fue incorporado.

Las mezclas de almidón de maíz y mandioca con APS modificado enzimáticamente mostraron valores mayores de PV respecto a las dispersiones conteniendo aislado no modificado.

Por otro lado, el aislado de soja modificado con TG produjo mayores viscosidades finales respecto a los que contenían estas proteínas no modificadas. Las mezclas de almidón de maíz y almidón de mandioca conteniendo aislados modificados con EP mostraron menores valores de viscosidad final

respecto a los que contenían aislados no modificados, indicando una disminución de la viscosidad con la reducción de la masa de las proteínas.

Tabla 2. Efectos de la incorporación de los aislados de proteínas modificados y no modificados sobre la viscosidad de pico (PV) y la viscosidad final (F) sobre las propiedades de *pasting* del almidón de maíz (M) y mandioca (T).

Muestra	PV (cP)	FV (cP)	PT (*ºC*)	BD (cP)	SB (cP)
M	373	299	90,0	112	38
M-APG	795	939	78,7	222	366
M-APG_EP	571	475	79,5	232	136
M-APG_TG	775	831	78,7	238	294
M-APS	487	969	77,9	46	530
M-APS_EP	664	758	67,3	207	301
M-APS_TG	769	1307	74,3	81	618
T	635	697	69,8	182	243
T-APG	1607	1434	71,5	662	489
T-APG_EP	870	823	60,2	292	245
T-APG_TG	1411	1280	71,5	556	424
T-APS	1292	1660	72,7	299	666
T-APS_EP	1461	989	70,7	832	360
T-APS_TG	1770	1791	70,7	641	662

PV: viscosidad de pico, FV: viscosidad final, PT: temperatura de *pasting*, BD: *breakdown*, SB: *setback*.

El efecto producido por los APG modificados enzimáticamente fue opuesto al mostrado por los APS modificados: el pico de viscosidad y la viscosidad final de las mezclas de maíz y mandioca conteniendo APG-TG y APG-EP fueron menores al de las mezclas preparadas con aislados sin modificar.

El *setback* (SB) de las pastas incrementó con la adición de proteínas, sin embargo, los aislados modificados con EP presentaron valores significativamente más bajos, posiblemente debido a la interferencia que pueden producir moléculas pequeñas, como los péptidos, en la reorganización de la amilosa. Por el contrario TG produjo modificaciones leves en los valores de SB (**Tabla 2**), y en algunos casos aumentó la tendencia a la retrogradación de la amilopectina

Reometría

Las pastas de almidón y almidón- proteínas gelatinizadas se dejaron reposar por 24 h para permitir la completa formación del gel de amilosa. Las propiedades viscoelásticas de los geles obtenidos se analizaron mediante análisis mecánico-dinámico (**Tabla 3**).

Todas las muestras analizadas presentaron valores de G' (representa la capacidad de almacenar energía durante la deformación) mayores que los de G" (representa la capacidad de disipar energía durante la deformación), indicando un comportamiento esencialmente elástico.

Los geles de almidón de maíz mostraron valores de G' y G" mayores y valores de tan d menores que los geles de mandioca. Esto indica que los primeros fueron más consistentes y elásticos que los segundos.

La adición de APG incrementó tanto el modulo elástico como el módulo de pérdida de los geles. En particular, el incremento de G´ fue mucho mayor en los geles de mandioca. La incorporación de APS incrementó el modulo elástico y el de pérdida de los geles de mandioca, y produjo un aumento de la componente viscosa (G") de los geles de almidón de maíz.

La adición de proteínas de soja modificadas con TG produjo un aumento extra de G' y G" en los geles. Por otro lado, los geles conteniendo APG_TG mostraron una disminución de los módulos respecto de los geles conteniendo aislado de guisante no modificado. Las proteínas de soja y guisante hidrolizadas por la proteasa mostraron una disminución de G' y G" en geles de maíz y mandioca. Esto concuerda

con la posible interferencia de moléculas pequeñas en la reorganización de la amilosa durante el proceso de enfriamiento de las pastas.

Tabla 3. Efectos de la incorporación de los aislados de proteínas modificados y no modificados sobre el módulo de almacenamiento (G´), el módulo de pérdida (G´´) y la tangente del ángulo de desfasaje (tan δ) de los geles de almidón de maíz (M) y mandioca (T)

	G' (Pa)			G´´ (Pa)			tan δ		
M	74,7	±	8,0	9,0	±	0,4	0,122	±	0,016
M-APG	120,5	±	2,9	20,6	±	1,1	0,171	±	0,006
M-APG_EP	49,3	±	2,0	8,6	±	0,5	0,174	±	0,010
M-APG_TG	101,3	±	5,3	18,3	±	0,5	0,181	±	0,005
M-APS	73,8	±	3,1	13,9	±	1,1	0,188	±	0,007
M-APS_EP	67,5	±	2,7	11,1	±	0,3	0,165	±	0,005
M-APS_TG	107,6	±	5,4	18,2	±	0,9	0,169	±	0,009
T	10,2	±	0,2	4,0	±	0,1	0,390	±	0,007
T-APG	41,2	±	6,0	9,9	±	0,4	0,245	±	0,027
T-APG_EP	15,7	±	0,7	5,3	±	0,1	0,335	±	0,011
T-APG_TG	30,9	±	2,7	8,2	±	0,4	0,267	±	0,013
T-APS	56,5	±	5,5	10,6	±	1,0	0,188	±	0,007
T-APS_EP	34,0	±	1,5	6,2	±	0,3	0,184	±	0,006
T-APS_TG	58,1	±	3,9	12,0	±	0,2	0,207	±	0,010

El agregado de ambos aislados proteicos (tanto no modificados como modificados enzimáticamente) a los geles de almidón de maíz produjo un aumento de tand, lo que implica que las proteínas incrementaron en mayor medida la componente viscosa de los geles. El efecto contrario fue observado por la adición de ambos aislados a los geles de mandioca, lo que produjo geles con mayor capacidad de almacenar energía (más elásticos) y menor capacidad de disipar energía (menos viscosos).

Sinéresis

Los geles preparados con almidón de mandioca, con o sin la adición de proteínas, no mostraron separación de fase líquida durante su almacenamiento, mientras que los geles de maíz si lo hicieron luego de 7 días de almacenamiento. La adición de APS produjo una disminución de la sinéresis, debido a la capacidad de estas proteínas para retener agua. La adición de aislado proteico de soja modificado con TG produjo un aumento de sinéresis respecto de los geles conteniendo APS no modificado enzimáticamente. Además, los geles de almidón de maíz y aislado proteico de soja modificado con EP (APS-EP) también mostraron un incremento de sinéresis respecto de los geles con APS no modificados. La adición de APG no modificó el porcentaje de agua liberada por los geles de almidón de maíz. Asimismo, cuando se agregó aislado proteico de guisante modificado con TG (APG-TG) a los geles de almidón de maíz, no se observaron cambios en la sinéresis. Por otro lado, los geles conteniendo aislado proteico de guisante modificado con EP (APG-EP) mostraron un alto porcentaje de agua liberada. Los efectos nocivos de los péptidos sobre la estructura de los geles, junto a una menor capacidad para retener agua de las proteínas hidrolizadas, explican la gran cantidad de agua liberada por los geles con proteínas tratadas con la proteasa.

CONCLUSIONES

El tratamiento con transglutaminasa disminuyó la solubilidad de las proteínas de soja y guisante en agua (pH 6,5) debido a la agregación de subunidades como quedó demostrado por SDS-PAGE. Por el contrario, la incubación con la proteasa alcalina incrementó la solubilidad de las proteínas de soja y guisante en agua (pH 6,5) como consecuencia del alto grado de hidrólisis de las cadenas peptídicas.

El proceso de *pasting* de los almidones de maíz y mandioca fue significativamente modificado por la adición de proteínas de soja y guisante. Las proteínas produjeron un aumento de la viscosidad máxima y la viscosidad final de la pasta.
La adición de aislados de proteínas incubados con proteasa produjo una disminución de la viscosidad final durante el proceso de *pasting* de ambos almidones con respecto a las mezclas de almidón y proteínas sin tratar.
Los geles obtenidos de almidón de maíz fueron más consistentes y elásticos que los producidos con mandioca. La incorporación de proteínas afectó de diferente modo el perfil reológico de los geles: en el caso de maíz, la incorporación de proteínas produjo geles con una mayor componente viscosa, pero cuando las proteínas fueron incorporadas en geles de mandioca, se produjo un aumento de la componente elástica de la matriz.
La incorporación de proteínas con alto grado de hidrólisis (tratadas con proteasa) disminuyó dramáticamente la consistencia de los geles de maíz y mandioca, además de incrementar la cantidad de agua liberada durante el almacenamiento de los geles de maíz.
Estos resultados permiten concluir que las modificaciones estructurales de las proteína, mediante tratamiento enzimático, puede ser una alternativa para modificar las propiedades de *pasting* de los almidones de maíz y mandioca y el perfil reológigo de sus geles, para solucionar problemas relacionados con el procesamiento de productos elaborados a partir de una matriz almidón gelificado

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC) y CYTED (PANXTODOS-P106AC0301) por el financiamiento otorgado. PD Ribotta agradece su beca postdoctoral a la Generalitat Valenciana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bonet, A, Blaszczak W, Rosell CM. 2006. Formation of homopolymers and heteropolymers between wheat flour and several protein sources by transglutaminase catalyzed crosslinking. Cereal Chemistry, 83: 655-662.

Endres, JG. 2001. Soy Protein Products Characteristics, Nutritional Aspects, and Utilization. The Endres Group, Inc.Fort Wayne, Indiana.

InfoStat. 2002. InfoStat/Profesional, versión 1.1. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Kim SY, Park PS-W, Rhee KC. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38: 651–656.

Lim HS, Narsimhan G. 2006. Pasting and rheological behavior of soy protein-based pudding. LWT-Food Sci Tech, 39: 343–349.

Marco C, Pérez GT, Ribotta PD, Rosell CM. 2007. Effect of microbial transglutaminase on the protein fractions of rice, pea and their blends. Journal of the Science of Food and Agriculture, 87(14): 2576-2582Basman, A., Koksel, H. and Ng, P. K. W. 2002. Effects of transglutaminase on SDS-PAGE patterns of wheat, soy and barley proteins and their blends. J. Food Sci. 67: 2654-2658.

Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Motoki M, Ando H, Urneda K, Matsura A. 1989. Polymerisation of several proteins by Ca2+, independent transglutaminase derived from micro-organisms, Agricultural and Biological Chemistry 53 (1989), pp. 2619–2623.

Nunes MC, Batista P, Raymundo A, Alves MM, Sousa I. 2003. Vegetable proteins and milk puddings. Col Surf B: Biointerfaces, 3: 21-29.

Nunes MC, Raymundo A, Sousa I. 2006. Gelled vegetable desserts containing pea protein, κ-carrageenan and starch. Eur Food Res Technol, 222: 622–628.

Ribotta PD, Colombo A, León AE, Añón MC. 2007. Effects of soy protein on physical and rheological properties of wheat starch. Starch/Starke, 59: 614 - 623.

Quality Parameters of Concentrated Sweetened Milk with different levels of lactose

Parámetros de calidad de dulce de leche con diferentes niveles de lactosa

Richards NSPS (1), Trevisan AP (1), Parodia CG (1)

(1) Universidade Federal de Santa Maria, RS – Brasil
neila@pq.cnpq.br

ABSTRACT

The market for dairy products renews itself every day with new tendencies regarding taste, diet and light versions. The addition of the lactase enzyme is a promising tendency in the food industry, enabling the development of new products without lactose, or with low levels of lactose, in their composition, for people with lactose intolerance and, also, to prevent crystallization of lactose in the products. The purpose of this study was to determine the physical and chemical characteristics and compare the sensory attributes of fresh concentrated sweetened milk (FCSM) with different levels of lactose and check the preference of consumers. Three samples of FCSM were used: two were produced from milk with lactose content reduced by enzymatic method (42.5% - treatment 1 and 85% - treatment 2) and one of commercial concentrated sweetened milk (default - treatment 3). The samples were formulated in accordance with the standard of FCSM of the Dairy Plant of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The physical and chemical parameters evaluated were: acidity, fat, moisture, ash and protein. The sensory evaluation was performed with 80 non-trained tasters divided in between students and employees of the UFSM. Each taster compared the three samples with the standard sample, and gave values from 1 ("much worse") to 5 ("much better") for each one of the following sensory attributes: color, aroma, texture, taste, overall appearance and residual taste. The tasters also ordered the samples according to their preference. As for total acidity and fat content, no significant difference between samples was noted. Regarding humidity, there was significant difference between samples, and the sample 3 (default) presented the highest level, exceeding the limit established by the Brazilian legislation. There was no significant difference between the levels of ash and protein of the samples, and the values obtained were all in accordance with the Brazilian legislation. In the sensory analysis, the attributes of color, aroma, flavor and residual taste showed no significant difference between treatments, however, treatment 1 had a slight preference over the other treatments. Regarding texture, significant difference among the three treatments was observed, and treatment 1 was the preferred one. As for the overall appearance, a significant difference was observed, and the treatments 1 and 3 obtained higher averages than treatment 2. In the Sorting Test, treatments 1 and 3 were preferred by consumers, obtaining the best scores and differing significantly from treatment 2. The conclusion was that reducing the lactose content of the milk practically did not change the physical and chemical characteristics of FCSM, which was in accordance with the local standards. Regarding the sensory characteristics, we can infer that the treatment with 42.5% of hydrolysis was the best. Therefore, the production of these products can be a good alternative for industries that will be able to offer a differentiated product, expanding its consumer market.

RESUMEN

El mercado de productos lácteos se renueva cada día con nuevas tendencias en relación al sabor, y a versiones dietética y light. La adición de la enzima lactasa es una prometedora tendencia en la industria alimentaria, permitiendo el desarrollo de nuevos productos sin lactosa, o con bajos niveles de lactosa, en su composición, para las personas con intolerancia a la lactosa y, también, para impedir la cristalización de la lactosa en los productos. El objetivo de este estudio fue determinar las características físicas y químicas y comparar los atributos sensoriales del dulce de leche fresco (DLF) con diferentes niveles de lactosa y analizar la preferencia de los consumidores. Tres muestras de DLF fueron utilizados: dos se produjeron a partir de leche con su contenido de lactosa reducido por método enzimático (42,5% - el tratamiento 1 y 85% - el tratamiento 2) y uno de dulce de leche comercial (por

default - el tratamiento 3). Las muestras fueron elaboradas de acuerdo con el padrón de DLF de la Planta de Lácteos de la UFSM. Los parámetros físico-químicos evaluados fueron: acidez, grasa, humedad, cenizas y proteínas. La evaluación sensorial se realizó con 80 probadores no entrenados, divididos entre estudiantes y empleados de la Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Cada probador comparó las tres muestras con la muestra padrón, y dio notas de 1 (mucho peor) a 5 (mucho mejor) para cada uno de los siguientes atributos sensoriales: color, aroma, textura, sabor, apariencia general y sabor residual. Los probadores también ordenaron las muestras de acuerdo a su preferencia. En relación a la acidez total y al contenido de materia grasa, no se observó diferencia significativa entre las muestras. En relación a la humedad, hubo una diferencia significativa entre las muestras, y la muestra 3 (default) presentó el más alto nivel, superior al límite establecido por la legislación brasileña. No hubo diferencias significativas entre los niveles de cenizas y proteínas de las muestras, y los valores obtenidos fueron de acuerdo con la legislación brasileña. En el análisis sensorial, los atributos de color, aroma, sabor y sabor residual no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, el tratamiento 1 tiene una ligera preferencia sobre los otros tratamientos. En relación a la textura, la diferencia significativa entre los tres tratamientos se observó, y el tratamiento 1 fue el preferido. En relación a la apariencia general, una diferencia significativa fue observada, y los tratamientos 1 y 3 obtuvieron promedios más altos que el tratamiento 2. En el Test de Clasificación, los tratamientos 1 y 3 fueron preferidos por los consumidores, obteniendo las mejores puntuaciones y se diferenciando significativamente del tratamiento 2. La conclusión fue que la reducción del contenido de lactosa de la leche prácticamente no ha cambiado las características físicas y químicas del DLF, que estaba en conformidad con las normas locales. En relación a las características sensoriales, podemos inferir que el tratamiento con 42,5% de hidrólisis es el mejor. Por lo tanto, la producción de estos productos puede ser una buena alternativa para las industrias, que serán capaces de ofrecer un producto diferenciado y, de esa manera, ampliar su mercado de consumo.

KEYWORDS: Fresh Concentrated Sweetened Milk, lactose hydrolysis, sensory evaluation

PALABRAS CLAVE: dulce de leche, hidrólisis de la lactosa, evaluación sensorial

INTRODUCTION

Concentrated Sweetened Milk is defined as the product, with or without the addition of other food substances, obtained by concentration and heating, at normal or reduced pressure, of milk or reconstituted milk, with or without the addition of solids of lactic origin and/or cream and with the addition of Sacarose (partially substituted or not) (Brasil 1997). It has a high nutritional value due to the presence of proteins and minerals, apart from the high energetic content. It is less perishable than milk and of great sensorial acceptance (Genske *et al.* 2006). It is produced and commercialized mainly in Argentina, Brazil and Uruguay (Food Ingredients 2000). In Brazil, it represents an excellent chance of growth of the dairy industry because, apart from guaranteeing a good financial margin and a ready market, and its ever increasing consumption, the majority of the dairy industries already have the necessary infrastructure necessary for its production (Santos 2007). The national outcome of Concentrated Sweetened Milk, during the last five years is around 34 metric tons per year (Machado and Viotto 2007).

Concentrated Sweetened Milk is widely used as an ingredient for elaborating foods such as candies, cakes, biscuits, ice cream, and is also consumed directly in meals as a dessert or spread on bread, toast or cheese slices (Demiate *et al.* 2001). The Concentrated Sweetened Milk market renews it each day, with new trends regarding flavor, diet and light versions of the product and formulas prepared with special ingredients as, for example, the lactase enzyme (Santos 2007). The addition of lactase enzyme causes hydrolysis of the lactose into two monossacharides: glucose and galactose, originating products with reduced lactose content (Campbell 2000, Beyer 2002). This is a sufficiently promising trend for the food industry, as it enables the development of new products without lactose in its composition (Longo 2006) or with a reduced content of this carbohydrate, for people with intolerance to lactose, as well as preventing the crystallization of the lactose during the production of ice cream, and of leavened products like yoghurt, condensed milk and Concentrated Sweetened Milk (Carminatti 2001, Santiago *et al.* 2004, Oliveira 2005).

The intolerance towards lactose is the incapacity to digest lactose, milk's main carbohydrate. It is very common and affects people of all ages. It is caused by a deficiency of lactase in the organism, the enzyme that digests the sugar in milk. The lactose that is not hydrolyzed into galactose and glucose remains in the intestine and acts osmotically, attracting water to the intestine. The colonic bacteria leaven the non-digested lactose, generating short chain fatty acids, carbon dioxide and hydrogen gas, resulting in swelling, flatulence, belly cramps and diarrhea (Beyer 2002). The severity of these symptoms depends on the amount ingested and the amount of lactose that each person can tolerate (Trevisan *et al.* 2007). It is esteemed that about 70% of the adult population of the world presents intolerance towards lactose (Beyer 2002, Schlimme and Buchheim 2002).

The crystallization of lactose in Concentrated Sweetened Milk is an inevitable problem, due to the low solubility of the lactose allied to the addition of sacarose in a supersaturated lactose solution, where agitation and cooling are taking place (Machado and Viotto 2007). This crystallization occurs after some time of storage and produces a grainy texture, and is one of the main defects of the Concentrated Sweetened Milk (Mahaut *et al.* 2004), and of the reduction of the product's shelf life (Santos 2007).

In view of the constant increase in the amount of people that are intolerant towards lactose, it is extremely important to search for alternatives that would make the consumption of Concentrated Sweetened Milk possible for these people as well as preventing the above mentioned defects of the product increasing, therefore, its consumption and shelf life, as well as evaluating the acceptance of these new products amongst consumers.

MATERIAL AND METHODS

Material

Samples

Two Concentrated Sweetened Milk samples were produced in the Dairy Plant School (UFSM), using pasteurized milk of the UNI brand, with the lactose content reduced by 42.5% and 85% by means of an enzymatic method. The third sample, used as a standard, was the commercial Concentrated Sweetened Milk of the UNI brand.

Lactase

To obtain the desired hydrolysis degree of the lactose, an enzyme supplied by a company named Prozyn was used, originated from *Kluyveromyces lactis* leavenings.

Methods

Preparation of the samples

The preparation of the samples initiated with the reduction of the lactose content in the milk, according to Trevisan (2008) and Trevisan *et al.* (2007). In both treatments, pasteurized milk had been placed in sterilizable bottles and left in a water-bath at a controlled temperature of 32 *ºC*. After the temperature (32 *ºC*) was reached, the enzyme was added until a concentration of 0.8 g/L was obtained. In treatment 1, for the milk to be able to reach 42.5% of hydrolysis, it remained at 32 *ºC* for 50 minutes. In treatment 2, the milk was heated during 6 hours to be able to reach an 85% degree of hydrolysis.

After the reduction of the lactose levels, the samples were cooled and taken to the Dairy Plant School where the Concentrated Sweetened Milks were elaborated. The normal formula (ingredients and raw material) of the commercial brand of Concentrated Sweetened Milk (UNI) was used for comparison (sample 3 and standard).

Physicochemical analyses

The analyses were carried out in accordance with techniques recommended by the Ministry of Agriculture, Cattle Raising and Supply (2003) and by Brasil (2006). The parameters that were measured were: total titrable acidity and contents of: fat, humidity, ashes and protein.

Sensorial evaluation

The sensorial evaluation was carried out in the Laboratory of Sensorial Analysis of the UFSM, in individual cabins. The objective of the sensorial evaluation was to compare the Concentrated Sweetened Milk samples produced with reduced lactose levels with the standard sample (normal lactose text). The Concentrated Sweetened Milk was tested by scholars, teachers and employees of both sexes, with varied ages, totalizing 50 testers. The samples were served in white porcelain containers, codified with three random digits.

During the sensorial evaluation, salt-crackers and mineral water for mouth rinsing were supplied in between each evaluation of the Concentrated Sweetened Milk samples (Ferreira 2000). An evaluation card (Multiple Comparison Test), in which each tester would have to compare the 2 samples with reduced lactose levels and one standard sample, with the standard sample, were distributed, where values from 1 to 5 would have to be awarded to each one of the following sensorial attributes: color, aroma, texture, flavor, global appearance and residual flavor, where the number 1 was equal to "much worse that the standard", number 2 was equal to "worse than the standard", number 3 was equal to "equal to the standard", number 4 was equal to "better than the standard" and 5 number was equal to "much better than the standard". An ordinance test was also carried out, in which each tester was requested to order the samples according to his preference, attributing value 1 (one) for the most preferred sample and 3 (three) for the less preferred sample (Dutcosky 2007).

Statistical analyses

The results were analyzed using the Statistic 7.0 program. The data was submitted to the analysis of variance (ANOVA) and the averages compared between themselves with the use of a Tukey Test, to the level of 5% of probability of error (Banzatto and Kronka 1995). The ordinance test was carried out based on Dutcosky (2007).

RESULTS AND DISCUSSION

In relation to the Total Titrable Acidity, there was no significant difference in between the samples of Concentrated Sweetened Milk with different lactose levels. The values that were obtained, below 14ºD, indicate that there was an efficient neutralization of the milk before the processing. The samples also did not differ significantly between themselves regarding the fat content, probably because the same raw material was used for the elaboration of all the Concentrated Sweetened Milk samples. In this requisite, the samples presented values that were similar to the standards fixed by the Brazilian legislation (Brasil 1997) for Concentrated Sweetened Milk with cream, in which the fat content is above 9,0g/100g of the product (**Table 1**).

Table 1. Physicochemical Composition of Concentrated Sweetened Milk Samples with Different Lactose Contents.

Samples	Titrable Acidity (ºD)	Fat (g/100g)	Humidity (g/100g)	Ashes (g/100g)	Protein (g/100g)
1	13.5 a*	16.25 a	26.94 b	1.28 a	5.39 a
2	14.0 a	17.25 a	25.15 c	1.31 a	5.38 a
3	13.0 a	17.00 a	31.71 a	1.18 a	5.13 b
Legislation (Law nº 354/97)	---	Greater than 9.0	Max. 30.0	Max. 2.0	Min. 5.0

*Treatments with averages followed by the same letters within the same column do not differ statistical between themselves when analyzed by the Tukey test with a level of 5% of probability of error.

Now, when comparing the humidity content, there was significant difference in between the samples. Sample 3 (Standard) presented the highest humidity level, exceeding, in fact, the standards established by the local legislation, that presents a maximum of 30% (Brasil 1997). Samples 1 (42.5% hydrolysis) and 2 (85% hydrolysis) differed in between themselves, but were in accordance with the local legislation (**Table 1**).

There was no significant difference in between the results obtained for leached ashes levels and proteins levels of the samples and they are all in accordance with the standards of the local legislation (Brasil 1997), that fixes a maximum value of 2.0g of leached ashes and a minimum of 5.0g of protein per 100g of the product (**Table 1**).

The results of the Multiple Comparison and Ordinance Tests are presented in **Tables 2** and **3**, respectively. In relation to the attributes of color, aroma, flavor and residual flavor, there was no significant difference in between the samples. However, sample 1, with 42.5% of hydrolysis, presented a slight tendency of preference. The treatments with low lactose level presented a darker

color, being that the sample with 85% of hydrolysis was the darkest, and for this reason, in the requisite color, was the one that obtained the lowest average amongst the treatments.

Table 2. Sensorial notes of the Concentrated Sweetened Milk with different lactose contents.

Attributes	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Color	3.2 a*	2.8 a	3.0 a
Aroma	3.4 a	3.2 a	3.1 a
Texture	3.6 a	2.7 c	3.1 b
Flavor	3.5 a	3.1 a	3.2 a
Global Appearance	3.2 a	2.7 b	3.2 a
Residual Flavor	3.2 a	3.2 a	3.2 a

*Treatments with averages followed by the same letters in the horizontal line do not differ statistical between themselves in the Tukey test with a level of 5% of probability of error.

Table 3. Results of the Ordinance Test as to the preference for each sample of Concentrated Sweetened Milk.

Testers	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Total (50 P)	82 a*	125 b	93 a

*Treatments with averages followed by the same letters in the horizontal line do not differ statistical between themselves in the Tukey test with a level of 5% of probability of error.

In relation to the attribute of aroma, there was a slight preference for the samples with reduced lactose levels that presented a sharper aroma when compared with the standard sample.
In relation to the texture, there was a significant difference between the treatments, being that the preferred sample was the one with reduced level of 42,5%, followed by the standard sample and by the sample with reduced level of 85%. This can be justified by the fact that Concentrated Sweetened Milk with reduced lactose levels present more glucose, as a result of the hydrolysis of the lactose, that produces glucose and galactose, and according to Demiate *et al.* (2001), the addition of glucose contributes towards the texture and brightness of the product. Treatment 2, due to the high amount of glucose, presented a relatively firm texture, not pleasing some testers, but this "problem" can be contoured with the correction of the formula, reducing the amount of glucose added at the moment of the preparation of the product.
In relation to the flavor, although there was no significant difference between the treatments, there was a slight preference for sample 1 that presented a reduction of 42.5% of the lactose content.
In relation to the general appearance of the Concentrated Sweetened Milk, there was a significant difference due to treatments 1 and 3 having obtained average scores better than the average obtained by treatment 2 that was slightly inferior. This fact might have occurred due to the firm texture of this sample that, as was already mentioned, could be creamier with the correction of the formula. The residual flavor did not differ significantly, presenting the same average in the three samples.
Treatments 1 and 3 were better classified by the testers, differing significantly from treatment 2. Although there was no significant difference between treatments 1 and 3, it can be perceived by the notes that were obtained, that there is a slight preference for treatment 1.

CONCLUSIONS

In a general way the formulas developed with reduced levels of lactose were in accordance with the physicochemical standards fixed by the local legislation. The formulas proposed in this work presented satisfactory sensorial characteristics, and treatment 1, with 42.5% of hydrolysis, was the one that obtained the best results. As a conclusion, it can be said that the use of milk with low lactose levels can lead to the development of products with equal or even superior attributes when compared to those products elaborated with normal milk. Therefore, the production of Concentrated Sweetened Milk can be a good alternative for the dairy industries, as they will be able to offer a differentiated product, extending its market of consumption to people with intolerance towards lactose and also to the more demanding consumer, by improving some attributes of its product.

REFERENCES

Banzatto DA, Kronka SN. 1995. Experimentação agrícola. 3 ed. Jaboticabal: Funep. 247 pag.

Beyer PL. 2002. Terapia clínica nutricional para distúrbios do trato gastrointestinal baixo. In: MahanLK, Escott-Stump S (ed.). Krause alimentos, nutrição & dietoterapia. 10ªed. São Paulo: Roca. pag 643-670.

Brasil. 1997. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria N.0 354, de 4 de setembro de 1997. Disponível em: http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1229 . Acesso em: 02 out. 2007.

Brasil. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Aprovado pela Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Brasília-DF.

Brasil. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº 68, de 14 de dezembro de 2006. Brasília-DF.

Campbell MK. 2000. Bioquímica. Porto Alegre: Artmed Editora. 3a ed. 751pag.

Carminatti CA. 2001. Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis*. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Demiate IM, Konkell FE, Pedroso RA. 2001. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso – Composição química. Ciênc. Tecnol. Aliment. 21: 1-7, jan.-abr.

Dutcosky SD. 2007. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Ed. Universitária Champagnat. 2ª ed. 239pag.

Ferreira VLP (Coord.). 2000. Análise sensorial – Testes discriminativos e afetivos. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pag. 73-77.

Food Ingredients. 2000. Caderno de Tecnologia de Alimentos e Bebidas. Mar./abr.

Genske PM, Imianovsky U, Volkman H, Reiter MGR. 2006. Avaliação microbiológica e sensorial de doces de leite de diferentes procedências. In: XXIII Congresso Nacional de Laticínios, 2006. Anais... Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. 61: 88-91, jul.-ago.

Longo G. 2006. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Machado LMP, Viotto WH. 2007. Estudo sobre a cristalização da lactose em doce de leite pastoso elaborado com diferentes concentrações de soro de queijo e amido de milho modificado. In: XXIV Congresso Nacional de Laticínios, 2007. Anais... Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. 62: 16-21, jul.-ago.

Mahaut M, Brule GY, Jeantet R. 2004. Productos lácteos industriales. Zaragoza : Acribia, S.A. 177pag.

Oliveira CCM de. 2005. Produção de β-galactosidase por levedura recombinante – Desenvolvimento de um sistema de produção estável. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga.

Santiago P, Marquez LDS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. 2004. Estudo da produção de β-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24: 567-572, out.-dez.

Santos J. 2007. Doce de leite: oportunidade de crescimento para indústria de laticínios. Indústria de Laticínios, São Paulo, ano XII, n. 69, p.24-29, mai-jun.

Schlimme E, Buchheim W. 2002. La leche y sus componentes: Propriedades químicas y físicas. Zaragoza: Acribia S.A. 121pag.

Trevisan A P. 2008. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise de lactose em leite pasteurizado. 59p. Dissertação de Mestrado (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Trevisan A P, Richards NSPS, Parodia CG. 2007. Parâmetros de qualidade de doces de leite com diferentes teores de lactose. In: 1 ºCongresso Catarinense do Leite, 2007, Pinhalzinho. Anais do 1 ºCongresso Catarinense do Leite. Pinhalzinho: Prefeitura Municipal de Pinhalzinho. 1: 49-49.

Películas de gelatina plastificadas con glicerol: propiedades macroscópicas y microestructurales

Gelatine film plasticizer with glycerol: macroscopic and microstructural properties

Rivero S (1), García MA (1), Pinotti A (1,2)

(1) CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP- CONICET. CCT. 47 y 116
La Plata, C.P: 1900
(2) Facultad de Ingeniería, UNLP 1 y 47 La Plata
e-mail: sgrive@cidca.org.ar

RESUMEN

La gelatina es un hidrocoloide ampliamente usado en el campo de los materiales para el desarrollo de envases biodegradables. Las películas de gelatina son rígidas y susceptibles a la ruptura, características que son mejoradas con la adición de plastificantes.

Los objetivos de este trabajo fueron: caracterizar las propiedades reológicas de las soluciones filmogénicas, desarrollar películas de gelatina con diferentes concentraciones de glicerol, y analizar el efecto de la adición del plastificante sobre las propiedades de barrera, térmicas y mecánicas.

Para la formulación de las películas se prepararon soluciones de gelatina de origen bovino al 7,5% (p/v), se adicionó glicerol como plastificante (P) las concentraciones ensayadas fueron: 10, 20, 30, 40, 60, 80, y 100 g de glicerol por cada 100 g de gelatina. La caracterización de las propiedades reológicas de las soluciones filmogénicas se realizó en un viscosímetro rotacional Viscotester 550 ThermoHaake. Las curvas de flujo de las soluciones formadoras de películas presentaron un comportamiento reopéctico independientemente de la concentración de plastificante utilizado. El modelo de Ostwald de Waele ajustó satisfactoriamente los datos experimentales. Las películas se obtuvieron por moldeo y secado a 37 °C y luego se acondicionaron a 65% de humedad relativa y 20 *ºC*. El contenido de humedad de las películas aumentó con la concentración de glicerol de 11.44 a 44.61%. La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó de acuerdo con la norma ASTM E96. Los valores de WVP de las películas de gelatina con plastificante variaron entre 1,76 y 2,35 x 10^{-10} g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1}; las formulaciones con 10 y 20 g de glicerol presentaron las mejores propiedades de barrera. Las propiedades térmicas se analizaron en un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC) modelo Q100. Los termogramas mostraron la disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g) con la adición de glicerol y estos resultados se correlacionaron con las propiedades físicas de las películas. La resistencia a la tracción (MPa) y la elongación porcentual (%), se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – *Stable Micro Systems* mediante ensayos de tracción. Las películas de gelatina plastificadas, presentaron una respuesta correspondiente a una matriz flexible para concentraciones de glicerol mayores que 40 g / 100 g de proteína.

En este estudio se evaluó la concentración óptima de plastificante (20 g glicerol/ 100 g gelatina) que permitió mejorar las propiedades de barrera sin detrimento de las propiedades mecánicas y a su vez relacionar estas propiedades macroscópicas con las propiedades microestructurales estudiadas a través de la calorimetría diferencial de barrido.

ABSTRACT

Gelatin is a hydrocolloid widely used in the field of materials for the development of biodegradable packaging. Gelatin films are rigid and susceptible to rupture, features that are improved with the addition of plasticizers.The objectives of this study were to characterize the rheological properties of the filmogenic solutions, to develop gelatin films with different glycerol concentrations and to analyze the effect of the plasticizer addition on the barrier, thermal and mechanical properties.Filmogenic, solutions of bovine gelatin 7.5% (w / v) were prepared. Glycerol was added as plasticizer (P), the concentrations assayed were: 10, 20, 30, 40, 60, 80, and 100 g of glycerol per 100 g of gelatin. The characterization of the rheological properties of the solutions was performed in a Viscotester 550

ThermoHaake rotational viscometer. Flow curves of solutions showed a rheopectic behavior regardless the concentration used. Ostwald de Waele model fitted the experimental data satisfactorily.
The films were obtained by drying at 37 °C and then conditioned at 65% relative humidity and 20 *ºC*. The moisture content of the films increased with the concentration of glycerol from 11.44 to 44.61%. The water vapor permeability (WVP) was determined according to ASTM E96. The WVP values of gelatin films with plasticizer ranged between 1.76 and 2.35 x 10^{-10} g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1}; the formulations with 10 and 20 g of glycerol showed the best barrier properties. The thermal properties were analyzed in a Differential Scanning Calorimeter (DSC) Q100 model. The termogramas showed the decrease of the glass transition temperature (Tg) with the addition of glycerol; these results were correlated with the physical properties of the films. Tensile strength (MPa) and elongation percentage (%) were determined in a TA.XT2i - Stable Micro Systems texture through tensile tests. Plasticized gelatin films showed a response corresponding to a flexible matrix for glycerol concentrations higher than 40 g / 100 g of protein. This work allowed to evaluate the optimal concentration of plasticizer to improve barrier properties without detriment of the mechanical properties and to correlate these macroscopic properties with the microstructure studied by DSC.

PALABRAS CLAVE: *gelatina, glicerol, películas biodegradables, temperatura de transición vítrea, propiedades mecánicas.*

KEYWORDS: *gelatin, glycerol, biodegradable films, glass transition temperature, mechanical properties.*

INTRODUCCIÓN

La gelatina es un hidrocoloide ampliamente usado en el campo de los materiales para el desarrollo de envases biodegradables. Es habitual que las películas de biopolímeros sufran fracturas durante su manejo dado que presentan una matriz rígida susceptible a la ruptura, características que pueden ser mejoradas con la adición de plastificantes. (Arvanitoyannis *et al.* 1998).

Los plastificantes reducen las fuerzas intermoleculares establecidas entre las cadenas polipeptídicas de la gelatina generando una mayor movilidad de las mismas, lo que mejora la flexibilidad de las películas (Sothornvit y Krochta 2001, Thomazine *et al.* 2005, Mendieta-Taboada *et al.* 2008) y ayuda a mantener su integridad. El glicerol posee buena afinidad por las matrices proteicas, y ha sido ampliamente estudiado como aditivo en la formulación de películas de gelatina (Audic y Chaufer 2005).

El conocimiento de la microestructura de las películas es de gran importancia ya que determina sus propiedades fisicoquímicas, de barrera y mecánicas, las que dependen del estado del polímero. La temperatura de transición vítrea (T_g) es un parámetro crítico para seleccionar las condiciones de procesamiento y almacenamiento de las películas, y definir sus posibles aplicaciones industriales (Langmaier *et al.* 2008, Mendieta-Taboada 2008).

Los objetivos de este trabajo fueron: caracterizar las propiedades reológicas de las soluciones filmogénicas, desarrollar películas de gelatina con diferentes concentraciones de glicerol y analizar el efecto del plastificante sobre las propiedades de barrera, térmicas y mecánicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon soluciones filmogénicas de gelatina de origen bovino (G) con una concentración de 7,5% (p/v). Se utilizó glicerol como plastificante cuya concentración varió entre 0 y 100 g /100 g de gelatina.

Las películas de gelatina con y sin plastificante se obtuvieron por moldeo de las soluciones filmogénicas en placas de acrílico. El secado se realizó en estufa a 37°C, y el acondicionamiento de las mismas se realizó a una humedad relativa (HR) del 65% y a 20 *ºC*.

Caracterización reológica de la soluciones filmogénicas

El comportamiento de flujo de las soluciones se analizó en un viscosímetro Viscotester 550 ThermoHaake (Haake, Germany) a 25 *ºC*. Se realizaron ensayos rotacionales con un sensor RV1 de cilindros concéntricos perfilados. El comportamiento reológico fue ajustado matemáticamente utilizando el modelo de Ostwald de Waele ($\tau = k\,\dot{\gamma}^{n}$), siendo k el índice de consistencia, n el índice de

comportamiento y $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación. La viscosidad aparente fue determinada a una velocidad de deformación de $500s^{-1}$.

Caracterización fisicoquímica de las películas

El espesor de las películas se determinó utilizando un medidor electrónico de espesores Check Line DCN-900 (New York, USA) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos. Los valores informados corresponden al promedio de al menos 15 medidas. El contenido de humedad de las películas se determinó por secado en estufa a 105 ± 1 *ºC* hasta alcanzar un peso constante.

Difracción de rayos-X

Los patrones de difracción de rayos X de las películas de gelatina se obtuvieron usando un equipo X'Pert Pro P Analytical Model PW 3040/60 (The Netherlands), en el rango 3- 60º.

Propiedades térmicas de las películas

Las propiedades térmicas de las películas de gelatina fueron determinadas usando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) modelo Q100 (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Las muestras se pesaron en cápsulas de aluminio selladas herméticamente, usando una cápsula vacía como referencia. Los análisis de DSC se realizaron en un intervalo de temperaturas de -80 a 200 *ºC*. Los parámetros vinculados al proceso se determinaron con el Universal Analysis V1.7F software (TA Instruments).

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La permeabilidad al vapor de agua se determinó según una modificación del método de la ASTM E96 (Rivero *et al.* 2009). Las películas se colocaron en celdas de acrílico, y luego en recipientes herméticos. Las muestras se sometieron a un gradiente de 75% de HR que corresponde a una fuerza impulsora de 1753.55 Pa, expresada como presión parcial de vapor de agua a 20°C. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica y éste se graficó en función del tiempo (h). Los datos se analizaron mediante una regresión lineal calculándose la permeabilidad al vapor de agua (WVP) en g Pa^{-1} s^{-1} m^{-1} de las películas desarrolladas considerando el espesor de las mismas.

Propiedades mecánicas

La resistencia a la tracción (MPa) y la elongación porcentual (%) se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – *Stable Micro Systems* (Inglaterra) mediante ensayos de tracción con un sistema de pinzas de tensión A/TG según la norma ASTM D882-91 (1996). Para los ensayos se utilizaron probetas de 6 cm de longitud y 0.7 cm de ancho obtenidas de las películas. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas por el software Texture Expert Exceed.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y los resultados fueron comparados por el Método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación de 0,05 utilizando el paquete estadístico Systat (versión 10, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización reológica

Tabla1. Parámetros obtenidos del modelado de las curvas de comportamiento de flujo de soluciones de gelatina con diferentes concentraciones de glicerol.

Contenido de glicerol (g / 100 g de gelatina)	Coeficiente de correlación (r^2)	Índice de consistencia (k)	Índice de flujo (n)	Viscosidad aparente a 500 s^{-1} (mPa.s)
0	0,9979	0,0040±0.0002	1,24±0,05	20,01±0,64
20	0,9996	0,0039±0.0001	1,21±0,10	21,54±0,98
40	0,9987	0,0052±0.0001	1,24±0,04	27,06±1,65
60	0,9982	0,0072±0.0003	1,27±0,01	31,64±1,75
80	0,9980	0,0092±0.0004	1,27±0,15	36,48±1,54
100	0,9989	0,0116±0.0005	1,25±0,03	36,23±1,71

El modelo de Ostwald de Waele ajustó satisfactoriamente los datos experimentales. En la **Tabla 1** se muestran los coeficientes de correlación, los índices de consistencia, los índices de flujo y los valores obtenidos de las viscosidades aparentes medidas a 500 s^{-1} de las soluciones filmogénicas. El agregado de glicerol en la formulación produjo un aumento de la viscosidad aparente de 20 a 36 mPa.s. Concentraciones superiores a 60 g de glicerol/100 g no modificaron significativamente el valor de la dicha viscosidad.

Caracterización fisicoquímica de las películas

Las películas de gelatina fueron transparentes y de apariencia uniforme. Las mismas fueron fácilmente removidas de las placas de acrílico y el espesor promedio de las mismas se encontró en el rango de 70 a 100 μm. El glicerol usado como agente plastificante no experimentó liberación desde la matriz, independientemente de la concentración utilizada, estos resultados indicaron una buena miscibilidad entre el plastificante y la matriz de gelatina.

El efecto del agregado de glicerol, sobre el contenido de humedad de las películas varió desde 10,3 a 44,6% para películas sin plastificante y con el agregado de 100 g de glicerol/ 100 g gelatina, respectivamente. Este comportamiento puede ser explicado considerando el hecho de que el glicerol es un agente con un carácter netamente higroscópico.

Propiedades Térmicas

Las propiedades térmicas de las películas se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la **Figura 1** se observan los termogramas para películas con y sin glicerol, la T_g se determinó a partir del cambio en la capacidad calorífica en la segunda corrida de acuerdo con el rango de temperaturas ensayado. Las películas de gelatina sin plastificante presentaron un valor de T_g de 137,5 *ºC*, mientras que la temperatura de transición vítrea de las películas con plastificante disminuyó de 125 *ºC* a 22 *ºC* para concentraciones de glicerol variando entre 10 g y 100 g por cada 100 g de gelatina.

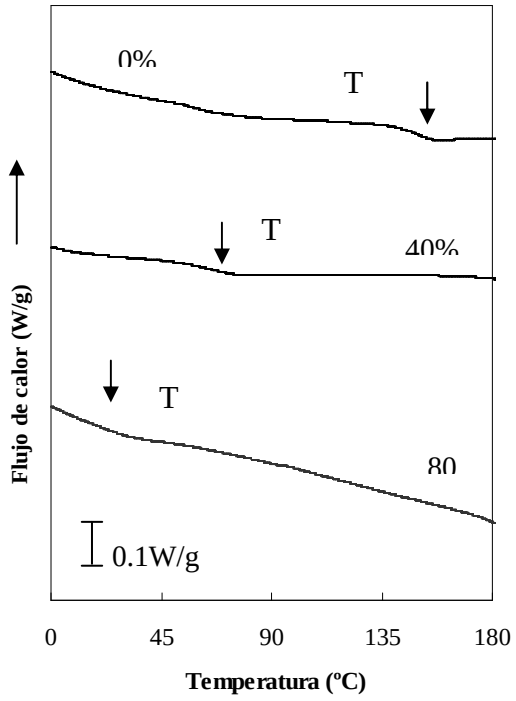


Figura 1. Termogramas de la segunda corrida obtenidos por DSC para películas de gelatina con y sin glicerol.

Difracción de Rayos X

La **Figura 2** muestra los difractogramas de películas con y sin agregado de plastificante. El espectro de difracción de la película de gelatina sin glicerol presentó un amplio pico localizado en la región de 2θ=20,5–21,5 y otro pico en la región de 2θ=8,0. La adición de glicerol provocó un desplazamiento de la posición del primer pico (2θ=8,0). Se observó un mayor corrimiento del pico entre 0 y 40 g de

glicerol/100 g de gelatina, siendo menos marcada esta tendencia a concentraciones superiores a 60 g de glicerol. Langmaier *et al.* (2008) propusieron que estos cambios estructurales podrían atribuirse a efectos del plastificante, tales como su elevada afinidad por el agua y la interferencia que produce en la interacción polimérica.

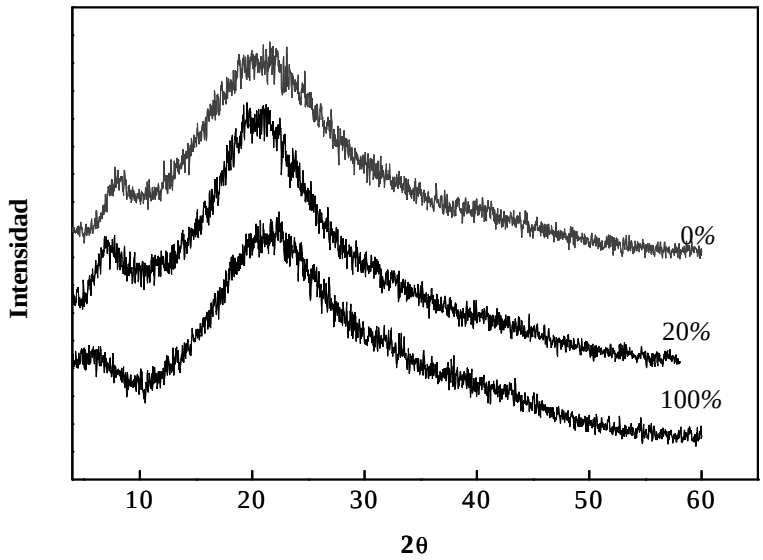


Figura 2. Espectros de difracción de rayos X de películas de gelatina sin plastificar y plastificadas con 20 y 100 g de glicerol/100g de proteína.

Permeabilidad al vapor de agua

La **Figura 3** muestra la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas desarrolladas. Los valores de WVP para películas formuladas con concentraciones inferiores a 40 g de glicerol /100 g proteína fueron significativamente más bajos ($P < 0,05$) que los obtenidos para películas de gelatina sin glicerol. Los valores de WVP aumentaron de $3,21 \times 10^{-10}$ a $3,87 \times 10^{-10}$ g s^{-1} $m^{-1}Pa^{-1}$ para mayores concentraciones de plastificante. Cuq *et al.* (1997) atribuyó el comportamiento del glicerol a su peso molecular y su hidrofilicidad, facilitando su solubilización y permeabilidad a través de las películas.
Los mayores valores de permeabilidad al vapor de agua se registraron para concentraciones de glicerol superiores a 60 g/100 g de gelatina. Los valores de WVP de películas con 60, 80 y 100 g de glicerol no mostraron diferencias significativas ($P>0,05$), (**Figura 3**). Varios investigadores encontraron una tendencia análoga para películas plastificadas con glicerol (Cho y Rhee 2002, Cao *et al.* 2007).

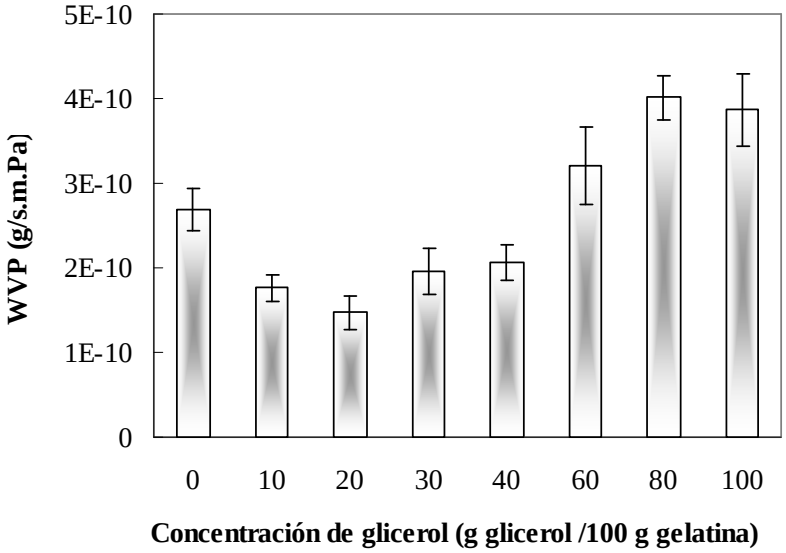


Figura 3. Permeabilidad al vapor de agua de películas de gelatina en función del contenido de glicerol.

Propiedades Mecánicas

Las películas de gelatina sin glicerol presentaron un patrón de comportamiento a la tracción correspondiente a una matriz rígida con altos valores de resistencia a la tracción (MPa) y bajos valores de deformación (%). Cao *et al.* (2009) trabajando con películas de gelatina tipo B encontraron una tendencia similar. Otros investigadores hallaron un comportamiento análogo al observado en este trabajo para películas de hidrocoloides hidrofílicos como el caseinato de sodio o mezclas de gelatina-almidón. (Audic y Chaufa 2005, Arvanitoyannis *et al.* 1998).

La **Figura 4** muestra los perfiles de comportamiento mecánico de los materiales ensayados. Concentraciones de 10 y 20 g de glicerol/100 g de proteína exhibieron valores de elongación en el rango de 4,7 a 21,4% respectivamente. Mientras que para las películas con 40 g de glicerol/100 g de proteína, la resistencia a la tracción disminuyó 7,5 veces y los valores de elongación aumentaron 32,5 veces respecto las películas de gelatina sin plastificar. Thomazine *et al.* (2005) encontraron similares resultados para películas de gelatina plastificadas con mezclas de glicerol y sorbitol. A modo de comparación, los materiales desarrollados con 40 g de glicerol / 100g de gelatina obtuvieron valores de resistencia a la tracción y de elongación similares a los hallados por Smith (1986) para películas de polietileno de baja densidad (LDPE). Las propiedades mecánicas de las películas de gelatina con 60, 80 y 100 g de glicerol/100g de gelatina no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$), alcanzando una elongación porcentual de 190% para la mayor concentración de plastificante. Esta meseta alcanzada en los resultados indicaría que el glicerol habría llegado al límite de saturación de la matriz polimérica, comportamiento también descripto por Audic y Chaufa (2005) para películas de caseinato de sodio plastificadas.

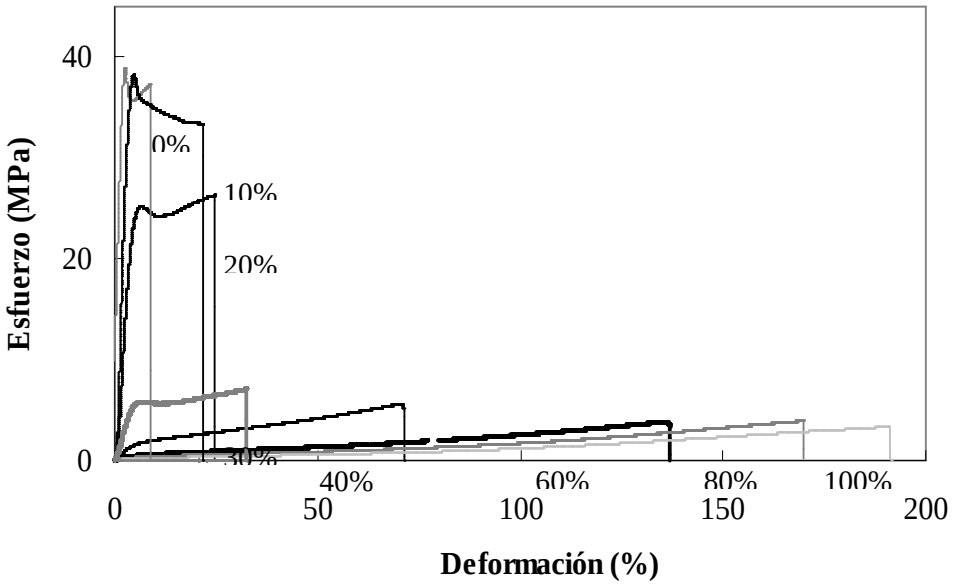


Figura 4. Perfiles de comportamiento mecánico de películas de gelatina con y sin plastificante.

CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la concentración óptima de plastificante que permitió mejorar las propiedades de barrera sin detrimento de las propiedades mecánicas. Los menores valores de WVP se obtuvieron con las películas de gelatina con 20 g de glicerol/100 g de gelatina. Las propiedades mecánicas fueron mejoradas con el agregado de glicerol en la formulación. La T_g del polímero tuvo un descenso abrupto con el agregado de plastificante hasta alcanzar un valor contante alrededor de 20 *ºC* para concentraciones superiores a 60 g de plastificante. Los análisis a través de rayos-X y DSC permitieron concluir que las películas de gelatina presentaron un cambio estructural con concentraciones superiores a 60 g de glicerol, ya que los valores de WVP, las propiedades mecánicas y la T_g permanecieron prácticamente constantes a las concentraciones de glicerol anteriormente

mencionadas. Puede concluirse que se pudo establecer una correlación entre la microestructura y las propiedades térmicas, de barrera y mecánicas de las películas desarrolladas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arvanitoyannis I, Nakayama A, Aiba S. 1998 Edible films made fromhydroxipropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. Carbohy Polym; 36:105-119.

Audic JL, Chaufer B. 2005 Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. Euro Polym J; 41:1934-1942.

ASTM. 1995Standard test methods for water vapor transmission of material, E96- 95. Annual book of ASTM. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, PA.

ASTM 2001. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D638-01. Annual book of ASTM, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

Cao N, Fu Y, He J. 2007 Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. Food Hydrocolloids, 21: 1153-1162.

Cao N, Yang X, Fu Y. 2009 Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. Food Hydrocolloid; 23:729-735.

Cho SY, Rhee C. 2002 Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. Lebensm-Wiss Technol, 35: 151-157.

Cuq B, Gontard N, Cuq JL, Guilbert S. 1997 Select functional properties of fish myofibrilar protein-based films as affect by hydrophilic plasticizer. J Agr Food Chem; 45(3):622-626.

Langmaier F, Mokrejs P, Kolomaznik K, Mladek M. 2008 Plasticizing collagen hydrolysate with glycerol and low-molecular weight poly (ethylene glycols). Termochim Acta; 469: 52-58.

Mendieta-Taboadaa O, Sobral PJA, Carvalho RA, Habitante AMBQ. 2008 Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). Food Hydrocolloid; 22: 1485-1492.

Rivero S, García MA, Pinotti A.2009 Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. J Food Eng; 90: 531-539.

Sothornvit R, Krochta, JM. 2001 Plasticizer effect on mechanical properties of lactoglobulin films. J Food Eng; 50:149-155.

Thomazine MA, Carvalho RA, Sobral PJA. 2005 Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. J Food Sci; 70 (3):172-176.

Smith S.A. Polyethylene, low density. 1986 In Bakker M. (Ed) The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology. New York: John Wiley & Sons, p. 514-523.

Efecto del agregado de enzimas y oxidantes sobre la calidad de pan de molde elaborado con mezclas trigo-soja

Effects of enzymes and oxidants addition on soy-wheat bread quality

Roccia P (1), Ribotta PD (1), Perez GT (1), León AE (1)

(1) CONICET – Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
Av. Valparaíso s/n, Ciudad Universitaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, CP5000, Córdoba.
proccia@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

La incorporación de altos niveles de harina de soja en el pan, mejoran su calidad nutricional pero produce efectos negativos sobre la formación del gluten, las propiedades de la masa y la calidad final del pan. Diferentes aditivos pueden ser utilizados para contrarrestar estas deficiencias. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia tres enzimas, pentosanasa (Pn), glucosa oxidasa (Gox) y transglutaminasa (Tg); y dos oxidantes, ácido ascórbico (Aa) y azodicarbonamida (Ada); en las características de la masa y la calidad final de panes con alto contenido proteico. La formulación utilizada fue harina de trigo 85%, harina de soja 15%, agua (absorción farinográfica), levadura 3%, sal 1%, azúcar 2,5%, enzimas y oxidantes (Pn 0,006 y 0,012%, Gox 0,001 y 0,01%, Tg 0,05 y 0,3%, Aa 0,015 y 0,02%, Ada 0,0015 y 0,002%). Se determinaron los parámetros farinográficos y de extensión uniaxial de las masas. Se midió el volumen específico de los panes, el color de la corteza y se realizó el análisis de imagen de la miga para determinar los parámetros fracción de área de alvéolo y uniformidad. Además, se estudió la firmeza y masticabilidad de la miga mediante el análisis de perfil de textura. En general, los aditivos aumentaron la absorción de agua y la estabilidad de la masa respecto al control, sin embargo Pn disminuyó la estabilidad y en su mayor dosis produjo un aumento en el grado de debilitamiento de la masa. La incorporación de aditivos a la masa disminuyó en general su extensibilidad y aumentó su resistencia, sólo la masa con Pn 0,012% mostró mayor extensibilidad que el control. La incorporación de Pn generó el mayor volumen de pan, además Gox y Ada en bajas dosis lo aumentaron significativamente, mientras que Tg en dosis altas y Aa lo disminuyeron. El análisis de imagen mostró correlación significativa entre la fracción de área de alvéolo y la uniformidad de la miga con el volumen de pan, lo que indica que aquellos aditivos que tuvieron un mayor porcentaje de área de alvéolo también mostraron mayor volumen de pan, pero menor uniformidad de alvéolos. La firmeza y la masticabilidad de la miga mostraron una fuerte asociación con el volumen de pan. Panes con Pn disminuyeron la firmeza inicial de la miga, mientras que el agregado de Aa y Tg la aumentaron. Pn disminuyó los valores de L* y b*, lo que se manifestó en una corteza de pan más oscura respecto al control, mientras que Tg 0,3% y Aa 0,020% mostraron mayor luminosidad. En conclusión, la incorporación de Pn, Gox 0,001% y Ada 0,0015% mejoraron la calidad final de panes fortificados con harina de soja, siendo Pn el aditivo con mayor efecto positivo tanto en las características de la masa como en el volumen y la calidad del pan.

ABSTRACT

The incorporation of high levels of soy flour to wheat bread improves the nutritional quality of bread but produce negative effects in the gluten formation, dough properties and final quality of bread. Several additives can be used to counteract these deficiencies. The objective of this word was study the influence of three enzymes, pentosanase (Pn), glucose oxidase (Gox) and transglutaminase (Tg); and two oxidants, ascorbic acid (Aa) and azodicarbonamide (Ada) in the dough properties and the final quality of high nutritional breads. The basic bread-dough formulation consisted of: 85% wheat flour, 15% soy flour, 3% compressed yeast, 1% sodium chloride, 2.5% sugar and water based on a farinograph. Additives were added in the following doses: Tg 0.05 and 0.3%; Gox 0.001 and 0.01%; Pn 0.006 and 0.012%; Aa 0.015 and 0.020%; Ada 0.0015 and 0.0020% on a flour basis. A control sample was prepared without additives incorporation. Farinograph parameters and uniaxial extensión of dough were determined. The final bread quality was obtained by measuring specific volume, image analysis and texture profile analysis of bread crumb and crust color. In general, the additives increased

the water absorption and the dough stability, however, Pn decreased the stability and high doses of this enzyme increased significantly the softening degree of dough. Additives incorporation decreased the dough extensibility and increased the resistance, although, Pn 0.012% improved the dough extensibility respect to the control sample. Pn addition produced the highest bread volume, also, low doses of Gox and Ada increased significantly the bread volume, whereas Tg 0.3% and Aa decreased it. The image analyses showed a significant correlation between cell fraction and crumb uniformity with the bread volume, showing that those additives which presented high cell fraction besides presented high bread volume but showed less crumb uniformity. The firmness and crumb chewiness showing a strong association with bread volume. Pn addition decreased the initial crumb firmness, while Tg and Aa incorporation decreased it. Pn showed low values of L* and b* parameters producing a crust color darker than the control bread, in contrast, Tg 0.3% and Aa 0.020% produced more light crust color. In conclusion, the Pn, Gox 0.001% and Ada 0.0015% addition improved the final quality of bread fortified nutritionally with soy flour, showing that Pn is the best additive to improve the dough properties, bread volume and quality of bread.

PALABRAS CLAVE: *pan, trigo, soja, enzimas, oxidantes.*

KEYWORDS: *bread, wheat, soy, enzymes, oxidants.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos los requerimientos de los consumidores se han dirigido en la búsqueda de alimentos de mayor calidad nutricional y con propiedades benéficas para la salud. La harina de soja ha sido reconocida como un excelente medio para fortificar nutricionalmente los productos de cereales tales como pan, galletitas y pastas entre otros, debido no sólo a la alta proporción y calidad de sus proteínas ricas en aminoácidos esenciales y de alta digestibilidad sino también a los efectos benéficos que tienen estas harinas en la salud, efectos preventivos en enfermedades coronarias, osteoporosis y en síntomas menopáusicos y pos menopáusicos en mujeres (Brouns 2002, Anderson *et al.* 2001). Sin embargo las propiedades únicas que presentan las proteínas del trigo al ser mezcladas con agua, en la formación de una masa elástica y extensible capaz de retener el dióxido de carbono durante la fermentación y posterior cocción, se ven afectadas por la incorporación de productos de soja a la masa (Fleming y Sosulski 1978, Ribotta *et al.* 2005).

Es ampliamente difundido el uso de aditivos en panificación a fin de paliar las deficiencias de calidad de las harinas y mejorar la funcionalidad de harinas de trigo mezcladas con productos derivados de leguminosas. Las pentosanasas (Pn) son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los polisacáridos no almidonosos específicamente sobre los pentosanos (arabinoxilanos, AX). La hidrólisis al azar de las cadenas de AX disminuye el grado de polimerización y modifica la estructura y funcionalidad de los AX. Las Pn son ampliamente usadas en panificación debido a su efecto positivo en las propiedades de manejo de la masa, en el volumen y en la calidad final del pan (Courtin y Delcour 2002).

La glucosa oxidasa (Gox) es una enzima que cataliza la oxidación de β-D-glucosa a δ-D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno. La gluconolactona es hidrolizada a ácido glucónico por un mecanismo no enzimático. El peróxido de hidrógeno producido oxida los grupos tiol de las proteínas del gluten formando puentes disulfuro (Haarasilta y Pullinen 1992) lo que puede producir un incremento en la fuerza de la masa. Vemulpalli *et al.* (1998) informaron que el peróxido de hidrógeno (producido por Gox) causa la formación de un gel de pentosanos solubles en agua, que aumenta la consistencia de la masa. Durante el proceso de panificación, la adición de Gox produce un cambio en la textura de la masa afectando su consistencia y aumentando el volumen de pan (Martinez-Anaya y Jiménez 1998).

La transglutaminasa (Tg) es una aciltransferasa que cataliza entrecruzamientos intra e intermolecular de proteínas a través de la formación de una unión peptídica entre residuos de lisina y glutamina sin afectar el valor nutricional de la lisina (Seguro *et al.* 1996). Tanto las gliadinas como las gluteninas de alto peso molecular (Larré *et al.* 2000) podrían ser sustrato de la enzima. En el gluten esta enzima induce la formación de polímeros de alto peso molecular y produce modificaciones en la elasticidad (Losche 1995) y en la fuerza de la masa (Gerrard *et al.* 1998). Basman *et al.* 2002 informaron que Tg causó la polimerización de una o más fuentes de proteínas a través de la formación de entrecruzamientos intermoleculares y que las proteínas de soja fueron un buen sustrato de esta enzima.

En la elaboración del pan se utilizan oxidantes para mejorar las propiedades de amasado, la retención de óxido carbónico, el volumen de las piezas y la estructura de la miga. El ácido L-threo ascórbico o Vitamina C (Aa) es ampliamente usado como mejorador en panes elaborados con trigos pan, esto es debido a la oxidación del ácido L-ascórbico a ácido dehidro-ascórbico (DAA) el cual se transforma en agente oxidante (Grosch y Wieser 1999). La explicación más aceptable es que los agentes oxidantes transforman los grupos sulfhidrilos de las moléculas de proteínas en puentes disulfuro, aunque el mecanismo de acción de Aa no está completamente esclarecido. En masas elaboradas con trigo-soja (hasta un 50% de sustitución) este oxidante aumentó la resistencia al mismo tiempo que disminuyó su extensibilidad (Maforimbo *et al.* 2006). Otro agente oxidante utilizado en panificaciones largas es azodicarbonamida (Ada), en panes de trigo este aditivo produjo mejoras tanto en el volumen del pan como en las características de la miga (Ribotta *et al.* 1999).
A pesar de la vasta información publicada sobre la utilización de estos aditivos en panificación, muy poco se conoce sobre su utilización en masas y panes elaborados con mezclas de harinas de trigo y soja, por ello el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la influencia tres enzimas, pentosanasa (Pn), glucosa oxidasa (Gox) y transglutaminasa (Tg); y dos oxidantes, ácido ascórbico (Aa) y azodicarbonamida (Ada); en las características de la masa y la calidad final de panes con alto contenido proteico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las harinas de trigo comercial y de soja desgrasada fueron provistas por compañías locales (Tiranti SA, Argentina y Complementos Proteicos SA, respectivamente). Se realizaron las siguientes determinaciones: humedad, proteína cruda, fibra alimentaria, lípidos y cenizas, de acuerdo a los métodos aprobados por la AACC, 44-19, 46-12, 32-05, 30-26 y 08-01 respectivamente. La levadura prensada y el resto de los ingredientes utilizados en la formulación de las masas fueron provistos por compañías locales. Las enzimas y oxidantes utilizados como aditivos en este trabajo fueron: Transglutaminasa microbiana (Tg) (transglutaminase active WMA, Ajinomoto, Japón) con una actividad de 100 U/g; Glucosa oxidasa (Gox) (Gluzyme Mono 10000 BG, Novozymes, Dinamarca) con una actividad 10000 U/g; 1,4-endoxilanasa (Pn) (Pentopan Mono BG, Novozymes, Dinamarca) con una actividad 2500 U/g; Acido ascórbico (Aa) (Todo Droga, Argentina); y Azodicarbonamida (Ada) (Adamix, Granotec, Argentina).

Estudios reológicos

Las harinas de trigo y de soja fueron mezcladas en una proporción 85:15 y los aditivos fueron incorporados en las siguientes dosis: Tg 0,05 y 0,3%; Gox 0,001 y 0,01%; Pn 0,006 y 0,012%; Aa 0,015 y 0,020%; Ada 0,0015 y 0,0020% en base harina. Se preparó una masa control sin el agregado de aditivos.
Se empleó un farinógrafo Brabender para determinar: absorción de agua (Ab), tiempo de desarrollo de la masa (TD), estabilidad (Es) y grado de debilitamiento (GD), según el método 54-21 (AACC, 1995).
Se realizaron ensayos de extensión uniaxial de las masas utilizando un texturómetro TA.XT2i (Stable Microsystems, RU). A las diferentes mezclas se les agregó agua (según absorción farinográfica) y se amasó en una amasadora Philips HR 1495 mixer (Philips, Argentina). Luego del amasado se prensó la masa en forma de tiras y se la dejó reposar por 40 min. Luego de este tiempo se realizó el ensayo de extensión uniaxial de Kieffer extendiendo la masa a 3,3 mm/s hasta su ruptura. La resistencia a la extensión (Rm, máxima resistencia), extensibilidad (Ex, extensibilidad máxima) y área bajo la curva (Ar) fueron automáticamente calculados de las gráficas de fuerza versus distancia utilizando el software Texture Expert 1.22 (Stable Micro Systems, RU).

Procedimiento de panificación

El proceso de elaboración de panes seguido en este estudio fue el descripto en Normas IRAM (método número 15858-1 (IRAM 1996), con una mínima modificación en el tiempo de cocción de las piezas. La formulación base fue la siguiente: 100% harina trigo:soja (proporción 85:15), 3% levadura prensada, 1% sal, 2,5% azúcar, 0,5% estearoil lactilato de sodio (SSL, Alpha Emulsionantes, Argentina), 0,003% α-amilasa (Bel' Ase A75) y agua según absorción farinográfica (500 BU). Las enzimas y oxidantes fueron adicionados según las dosis arriba descriptas. Los ingredientes fueron mezclados en una amasadora Argental L-20 (Argental, Argentina). Se prepararon suspensiones de

levadura en agua y soluciones de sal-azúcar en agua las cuales fueron incorporadas separadamente al resto de los ingredientes sólidos. La masa resultante (~ 27 °C) fue llevada a la cámara de fermentación (primera fermentación) por 80 min a 30 °C y 70% de humedad relativa con dos *punches* (proceso parcial de desgasificación) intermedios (primer *punch* a los 45 min, segundo *punch* a los 60 min). Luego la masa fue laminada para remover el gas en una laminadora Mi-Pan (Mi-Pan, Argentina) y luego dividida en piezas de 150 g, moldeadas y devueltas a la cámara de fermentación por 75 min (segunda fermentación). Después de este tiempo, las piezas fueron horneadas a 215 °C por 24 min.

Evaluación de la calidad de pan

El análisis de calidad de pan fue determinado evaluando el volumen específico de pan, la estructura de la miga de pan (análisis de imagen), la firmeza de la miga (análisis de perfil de textura) y el color de la corteza.

Volumen específico de pan. Las piezas de pan fueron pesadas 2 h después del horneado y el volumen específico fue determinado en volumenómetro por desplazamiento de las semillas de colza. El volumen específico (VE) de los panes fue expresado como la relación volumen/peso (cm^3/g).

Característica estructural de la miga. Se obtuvieron imágenes digitales a partir de rodajas (4 por pieza) de las hogazas de pan mediante un scanner HP Photosmart Premier 6.5. Las imágenes fueron analizadas con un analizador de imágenes (Image J 1.38n, National Institute of health, EUA). Las imágenes fueron convertidas a imágenes de 8-bits (256 niveles de gris) y se seleccionó una sección rectangular de la parte central de la miga para su evaluación. Estas secciones de las rodajas fueron binarizadas, obteniéndose imágenes donde la matriz de la miga es blanca, y los alvéolos son negros. Las imágenes binarizadas fueron analizadas con el software Image J 1.38n y se determinaron la relación celda (alvéolos)/área total (fracción de área, FA) y la uniformidad (U) de celdas (relación entre el número de celdas de tamaño menor a 4 mm^2 y el número de celdas de tamaño mayor a 4 mm^2). Según Zghal *et al.* (2001), altos valores de esta relación indican mayor uniformidad en la estructura de la miga.

Análisis de perfil de textura. El ensayo de perfil de textura (TPA) se llevó a cabo utilizando un texturómetro TA.XT2i (Stable Microsystems, RU) equipado con una celda de 5 kg y utilizando una sonda cilíndrica de 3,6 cm de diámetro. Luego del horneado, los panes se dejaron enfriar por 2 h y se cortaron obteniendo tres rodajas de 2,5 cm de espesor. Las rodajas fueron sometidas a un doble ciclo de compresión en el texturómetro. A partir de las gráficas fuerza versus tiempo se determinó la firmeza inicial de la miga (la fuerza en g requerida para comprimir la muestra) y la masticabilidad (relacionada con la cantidad de energía requerida para desintegrar el alimento sólido hasta tragarlo), mediante el software Texture Expert 1.22.

Color de la corteza. Se midió el color de la corteza de los panes con un espectrofotómetro Minolta 508d, utilizando 8-mm de apertura, iluminación D65 y un ángulo de observación de 10°. Se tomaron cuatro panes de cada lote de muestra y se realizaron tres lecturas de cada uno. Se analizaron los parámetros L* (luminosidad), a* (rojo-verde) y b* (amarillo-azul).

Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio ± la desviación estándar.

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el Método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación de 0,05. Las correlaciones entre los parámetros medidos fueron evaluadas por el método de Pearson y los valores de coeficiente de correlación informados son significativos para un $p \leq 0,05$. Estos análisis se realizaron mediante el programa INFOSTAT (Infostat 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La harina de soja ha sido reconocida como un excelente medio para fortificar productos de cereales debido a su alto contenido de lisina y sus propiedades benéficas para la salud. La **Tabla 1** muestra la composición química de las harinas de trigo y soja. Normalmente, los panes elaborados con harina de trigo tienen entre 8 y 9% de proteínas, la incorporación de harina de soja en la proporción que se usa en este trabajo incorpora entre un 7 y 8% de proteínas extras. La harina de soja posee además un alto contenido de fibra alimentaria y de minerales, como muestra el alto valor de cenizas encontrado. Esto mejora sustancialmente el valor nutricional de los productos en que se incorpora.

Tabla 1. Composición química de las harinas de trigo y soja.

	Humedad (%)	Proteínas (%)	Fibra alimentaria (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)
Harina de trigo	12,4±0,1	11,6±0,2	5,7±0,4	0,9±0,6	0,5±0,0
Harina de soja	7,8±0,0	53,1±0,8	19,9±0,1	0,7±0,0	7,1±0,0

Se informan los valores promedios ± la desviación estándar.

Efecto de los aditivos en las propiedades reológicas de la masa

La incorporación de enzimas y oxidantes afectó las propiedades farinográficas de la masa (**Tabla 2**). En general, la absorción de agua (Ab) aumentó con la incorporación de aditivos respecto de la masa control; la enzima Pn produjo el mayor incremento, otros autores informaron que en masas de trigo esta enzima produjo una disminución de Ab (Wang *et al.* 2003, Jiang *et al.* 2005). En estudios previos sobre mezclas de gluten vital-aislado proteico de soja (GV-ISP) se demostró que la incorporación de mayores cantidades de agua mejoraba las propiedades elásticas de la masa alcanzando los valores observados para GV (gluten vital) contrarrestando el efecto negativo de la incorporación de proteína de soja en la formación de la red de gluten (Roccia *et al.* 2009). De acuerdo a estos resultados, el aumento en la absorción de agua de la masa provocado por el agregado de Pn puede mejorar sus propiedades elásticas.

Tabla 2. Efecto de los aditivos en los parámetros farinográficos de la masa trigo-soja.

	Ab (%)	TD (min)	Es (min)	GD (UF)
Control	66,9	10,0	13,5	41
Tg 0,05%	67,1	9,8	13,5	36
Tg 0,3%	66,9	9,7	15,1	32
Gox 0,001%	67,6	10,0	14,0	34
Gox 0,01%	67,8	9,5	□20,0	11
Pn 0,006%	68,5	8,8	9,6	39
Pn 0,012%	68,6	9,7	9,3	50
Aa 0,015%	67,1	12,2	15,0	42
Aa 0,02%	67,2	11,3	15,5	32
Ada 0,0015%	67,4	10,3	14,6	34
Ada 0,002%	67,5	10,3	12,5	36

Ab: Absorción de agua; TD: tiempo de desarrollo; Es: estabilidad; GD: grado de debilitamiento

La adición de Aa produjo un incremento en el tiempo de desarrollo (TD), mientras que Pn 0,006% lo disminuyó. La estabilidad (Es) y grado de debilitamiento de la masa (GD) fueron los parámetros farinográficos más afectados por la incorporación de aditivos. En general, los aditivos disminuyeron GD. Sin embargo, Pn 0,012% lo aumentó considerablemente y ambas dosis de Pn, produjeron masas menos estables al sobre amasado. En contraste, la mayor dosis de Gox aumentó la Es por encima del valor límite de medida y produjo un muy bajo debilitamiento de la masa (11UF), lo que indica que esta enzima provocó una elevada estabilidad al sobre amasado. Estos resultados concuerdan con los efectos observados por Hamer y Hosseney (1998) en masas sobre oxidadas.

Los parámetros de extensibilidad uniaxial fueron afectados por la adición de enzimas y oxidantes a la masa trigo-soja (**Figura 1**). En general los aditivos aumentaron la resistencia a la extensión (Rm) y produjeron masas menos extensibles, sólo el agregado de Pn 0,012% aumentó la extensibilidad (Ex) respecto al control. En estudios previos se observó que el agregado de diferentes niveles de soja a la masa de trigo provocó el aumento de la resistencia y la disminución de la extensibilidad, lo cual tuvo efecto negativo en la calidad de las masas (Ribotta *et al.* 2008, Roccia *et al.* 2009). En el presente trabajo, la adición de la mayor dosis de Pn contrarrestó el efecto de deterioro que produjo la incorporación de la proteína de soja en la formación de la red de gluten.

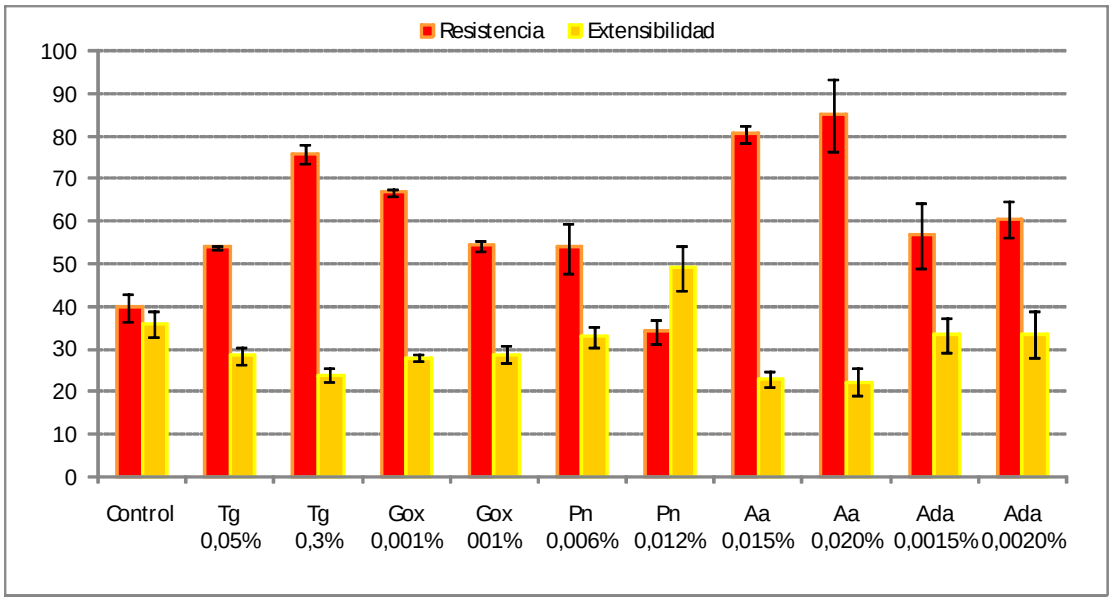


Figura 1. Efecto de los aditivos en la resistencia (g) y la extensibilidad (mm) de la masa.

Influencia de la incorporación de aditivos en la calidad panadera

La adición de enzimas y oxidantes a la masa trigo-soja tuvo diferentes resultados, negativos y positivos, en el volumen específico de pan (VE) (**Tabla 3**). El VE incrementó significativamente con la adición de Pn; resultados similares fueron observados por otros autores en panes elaborados con harinas de trigo-soja (Ribotta *et al.* 2008) y en panes de trigo (Jiang *et al.* 2005). Este efecto positivo de la pentosanasa es, probablemente, debido a las mejoras producidas por esta enzima en las propiedades reológicas, elasticidad y extensibilidad, de las masas anteriormente descriptas. La adición de bajas concentraciones de Gox (0,001%) también aumentó significativamente VE, mientras que altas dosis de Gox lo disminuyeron. Similares efectos fueron observados para panes de trigo por Bonet *et al.* (2006), quienes reportaron que un excesivo reforzamiento de la red de gluten producido por altas concentraciones de glucosa oxidasa influyó negativamente en la capacidad de retención de gas de las masas. El VE disminuyó con el incremento en la dosis de Tg, lo que muestra que esta enzima actuó en detrimento del volumen de pan, en coincidencia con Basman *et al.* (2003), quienes reportaron un efecto negativo de la enzima transglutaminasa en el volumen de los panes elaborados con diferentes niveles de sustitución de harina de soja. Acido ascórbico y azodicarbonamida son dos oxidantes que han sido estudiados como posibles reemplazantes del bromato de potasio en panes de trigo (Ribotta *et al.* 1999). En este estudio la incorporación de Aa en panes de trigo-soja disminuyó significativamente el VE respecto a la muestra control, este efecto negativo puede ser explicado por la alta resistencia a la extensión (Rm) de las masas elaboradas con Aa que no permite un óptimo desarrollo de volumen de la pieza de masa durante las etapas de fermentación y horneado. Otros autores obtuvieron resultados similares por el agregado de Aa a las masas (Maforimbo *et al.* 2006), aunque no elaboraron pan de harina de trigo-soja con incorporación de Aa en este estudio. Si bien Ada no modificó significativamente las propiedades reológicas de la masa, su adición en bajas dosis (0,0015%) produjo un aumento significativo en VE. Estos resultados coinciden con estudios previos en donde el agregado de Ada al pan de trigo aumentó el VE respecto al control (Ribotta *et al.* 1999), sin embargo no se encontraron estudios previos del agregado de este aditivo en panes trigo-soja.

El VE correlacionó significativamente con los parámetros reológicos Ab, Ex y Rm (r= 0,80; 0,74 y -0,71 respectivamente), es decir un aumento en la absorción de agua y en la extensibilidad de la masa produjeron un efecto positivo en el VE. Por otro lado un aumento en la resistencia de estas masas afectó negativamente el VE.

El análisis de imagen permitió visualizar los cambios en la estructura de la miga provocados por el agregado de aditivos. La FA (fracción de área) aumentó con el aumento en el VE (r= 0,66), es decir, que panes con mayor volumen específico presentaron una mayor proporción de área de alveolos en la fracción de miga analizada. La **Tabla 3** muestra que Aa presentó los menores valores en FA. Aquellos

panes con menor VE presentaron una estructura de miga más uniforme (U) (r= -0,63). Así, Aa en ambas dosis y Tg 0,05% presentaron los mayores valores de U, por otro lado Tg 0,3% no solo presentó bajos VE sino que además no modificó los parámetros estructurales de la miga. Si bien Ada 0,015% aumentó significativamente VE, también produjo un aumento significativo de U y una disminución en FA. El efecto positivo de este oxidante se verificó no solo en la obtención de mayores volúmenes de pan sino también en la mejora de las características estructurales de la miga de panes trigo-soja. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos en panes de trigo con el agregado de Ada por Ribotta *et al.* (1999). También puede observarse (**Tabla 3**) que ambas dosis de Pn y la menor dosis de Gox aumentaron el VE pero no modificaron significativamente la estructura de la miga.

Tabla 3. Influencia de los aditivos en el volumen específico del pan y la estructura de la miga.

		Estructura de la miga	
	VE (cm^3/g)	FA (mm)	U
Control	$3,40^{bc}$	32^{c}	6^{ab}
Tg 0,05%	$3,08^{b}$	29^{bc}	11^{c}
Tg 0,3%	$2,67^{a}$	29^{bc}	6^{ab}
Gox 0,001%	$4,12^{ef}$	29^{bc}	6^{ab}
Gox 0,01%	$3,70^{cd}$	29^{bc}	7^{ab}
Pn 0,006%	$4,35^{f}$	33^{c}	5^{a}
Pn 0,012%	$4,42^{f}$	30^{bc}	5^{a}
Aa 0,015%	$2,31^{a}$	23^{a}	23^{d}
Aa 0,02%	$2,64^{a}$	27^{b}	10^{b}
Ada 0,0015%	$3,91^{de}$	28^{b}	12^{c}
Ada 0,002%	$3,73^{cde}$	32^{c}	7^{ab}

VE: volumen específico de pan; FA: fracción de área de alvéolo; U: uniformidad de la miga.
Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas con p□0,05.

Altos valores de firmeza (F) y masticabilidad (M) de la miga están asociados con una mala calidad de pan. La F y M mostraron una fuerte asociación con VE (r= -0,98 y r= -0,89 respectivamente). Así panes en los que se obtuvieron los mayores VE (Pn, Gox 0,001% y Ada 0,0015%) presentaron una disminución de la firmeza inicial de la miga, mientras que el efecto contrario fue observado en aquellos con menor VE (Aa y Tg) (**Figura 2**).

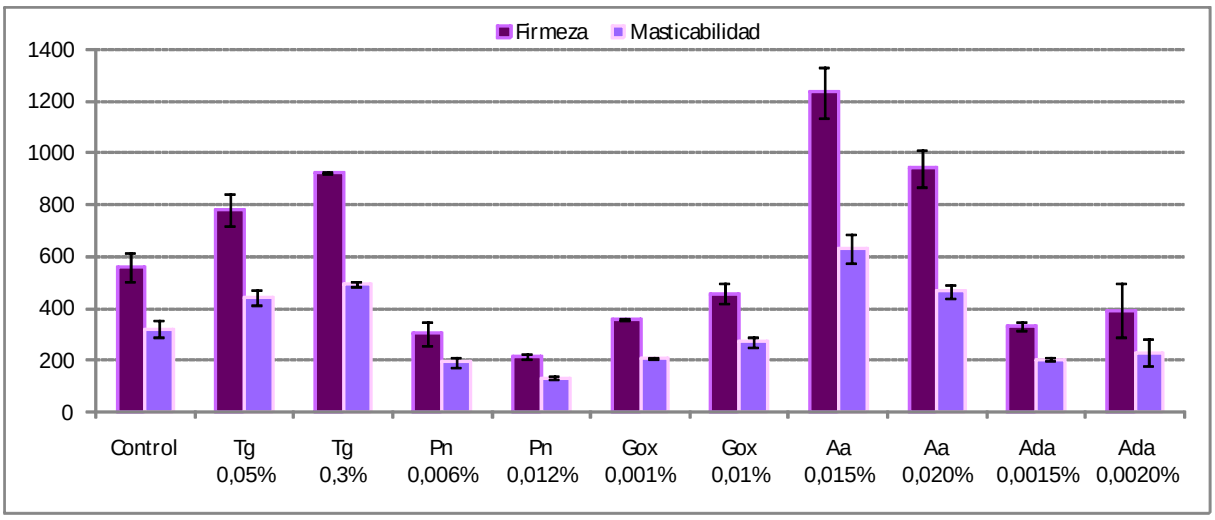


Figura 2. Influencia de los aditivos en la firmza (g) y masticabilidad (adimensional) de la miga de pan (TPA).

La coloración de la corteza se vio afectada por el agregado de aditivos (**Figura 3**). La Pn disminuyó los valores de L* y b* produciendo una corteza de pan más oscura respecto al control, mientras que Tg y Aa en sus mayores dosis mostraron mayor luminosidad (L*). Aunque no se conoce el mecanismo por el cual los aditivos influyen en los cambios de la coloración de la corteza, es posible que estos pueden deberse a un mayor desarrollo de reacciones de pardeamiento tipo Maillard, favorecidas por

una mayor evaporación de agua superficial en panes con mayores volúmenes específicos durante el proceso de horneado.

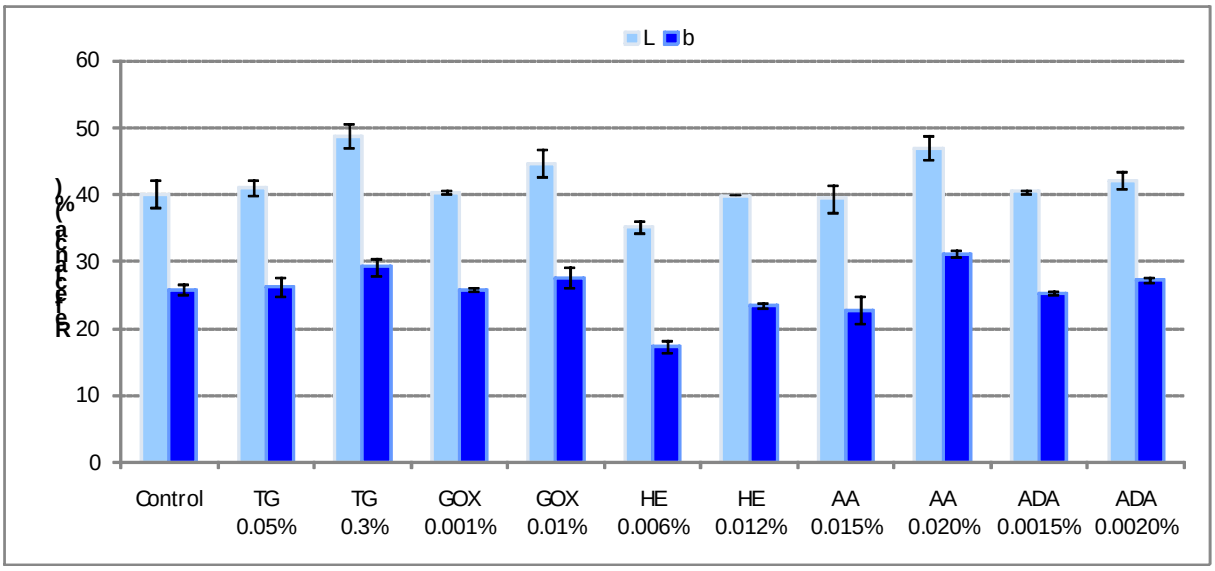


Figura 3. Efecto del agregado de aditivos en los parámetros de color de la corteza del pan. L*: luminosidad; b*: amarillo-azul.

CONCLUSIONES

La incorporación de harina de soja a la masa aumentó el valor nutricional del pan de trigo aportando una mayor proporción de proteínas con mejor balance de aminoácidos, mayor cantidad de minerales y agregando valor funcional extra por su alto contenido en fibra alimentaria.

Si bien el agregado de algunos aditivos produjo efectos positivos contrarrestando el deterioro producido por las proteínas de soja en la masa, otros aditivos tuvieron efectos negativos y disminuyeron la calidad de los panes (volumen y estructura de miga). La adición de transglutaminasa y ácido ascórbico no sólo no lograron contrarrestar el efecto negativo producido por la incorporación de harina de soja sino que además profundizaron el deterioro de calidad de los panes, mientras que glucosa oxidasa y azodicarbonamida en bajas dosis y endoxilanasa mejoraron las propiedades viscoelásticas de la masa y la calidad de los panes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del presente trabajo a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), CYTED (PANXTODOS-106AC0301), y el CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association of Cereal Chemists (AACC). 1995. Methods, 44-19, 46-12, 08-01, 30-26, 54-21. Approved methods of the AACC. St. Paul, USA: American Association of Cereal Chemists.

Anderson JW, Smith BM, Moore KA, Hanna TJ. 2001. Soy foods and health promotion. In: Watson RR. CRC Press editors. Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion. Florida: Boca Raton, chap. 9, pag 117-134.

Basman A, Köksel H, Ng PKW. 2003. Utilization of transglutaminase to increase the level of barley and soy flour incorporation in wheat flour breads. Journal of Food Science, 68(8):2453-2460.

Basman A, Köksel H, Ng P. 2002. Effect of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flour. European Food Research and Technology, 215(5):419-424.

Bonet A, Rosell CM, Caballero PA, Gómez M, Pérez-Munuera I, Lluch MA. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. Food Chemistry, 99(2):408-415.

Brouns F. 2002. Soya Isoflavones: a new and promising ingredient for the health foods sector. Food Research International, 35:187-193.

Courtin CM, Delcour JA. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. Journal of Cereal Science, 35(3): 225-243.

Fleming S, Sosulski F. 1978. Microscopy evaluation of bread fortified with concentrated plant proteins. Cereal Chemistry, 55:373-382.

Gerrard JA, Fayle SE, Wilson AJ, Newberry MP, Ross M, Kavale S. 1998. Dough properties and crumb strength as affected by microbial transglutaminase. Journal of Food Science, 63:472-475.

Grosch W, Wieser H. 1999. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. Journal of Cereal Science, 29:1-16.

Haarasilta S, Pullinen T. 1992. Novel enzyme combination. A new tool to improve baking results. Agro-Food-Industry Hi-Tech (Italy), 3:12-13.

Hamer RJ, Hoseney, RC. 1998. Interactions: The keys to cereal quality. St. Paul, USA: American Association of Cereal Chemists.

IRAM 15858-1, 1996. Cereales. Ensayo de panificación experimental. Instituto Argentino de Normalización y certificación. Diciembre, 1996.

Jiang Z, Li X, Yang S, Li T, Tan S. 2005. Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from Thermotoga maritima. Food Research International, 38:37-43.

Larré C, Denery-Papini S, Popineau Y, Deshayes G, Desserme C, Lefebvre J. 2000. Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. Cereal Chemistry, 77(2):121-127.

Losche IK. 1995. The world of ingredients. Enzymes in Baking, may-june: 22-25.

Maforimbo E, Nguyen M, Skurray GR. 2006. The effect L-ascorbic acid on the rheological properties of soy-wheat dough: a comparison of raw and physically modified soy flours. Journal of Food Engineering, 72(4):339-345.

Martínez-Anaya MA, Jiménez T. 1998. Physical properties for enzyme-suplemented dough and retlationship with bread quality parameters. LWT-Food Science and technology, 206:134-142.

Ribotta PD, Pérez GT, Añón MC, León AE. 2008. Optimization of additive combination for improved soy-wheat bread quality. Food Bioprocess and Technology, Article in Press, http://www.springerlink.com

Ribotta PD, Arnulphi SA, León AE, Añón MC. 2005. Effect of soybean addition on the rheological properties and breadmaking quality. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85:1889-1896.

Ribotta PD, Morcillo M, León AE. 1999. Efecto de distintos oxidantes sobre la calidad de panes elaborados por el método tradicional argentino. Agriscientia, 16:3-10.

Roccia P, Ribotta PD, Pérez GT, León AE. 2009. Influence of soy protein on rheological properties and water retention capacity of wheat gluten. LWT-Food Science and technology, 42 (1): 358-362.

Seguro K, Kumazawa Y, Kuraishi C, Sakamoto H, Motoki M. 1996. The e-(g-glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source for lysine for rats. The Journal of Nutrition, 126(10):2557-2562.

Vemulapalli V, Miller KA, Hoseney RC. 1998. Glucose oxidase in breadmaking systems. Cereal Chemistry, 75:439-442.

Wang M, Hamer RJ, van Vliet T, Gruppent H, Marseille H, Weegels PL. 2003. Effect of water unextractable solids on gluten formation and properties: mechanistic considerations. Journal of Cereal Science, 37, 55-64.

Zghal M, Scanlon M, Sapirstein H. 2001. Effects of flour strength, baking absorption, and processing conditions on the structure and mechanical properties of bread crumb. Cereal Chemistry, 78(1), 1-7.

Incorporación de emulsionantes en panes a base de harinas de arroz, maíz y soja

Incorporation of emulsifiers to breads made of rice, corn and soy flours

Sciarini, LS (1), de Lamballerie, M (2), Pérez, GT (1), Ribotta, PD (1), León, AE (1)

(1) CONICET - Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Córdoba, Argentina.
(2) ENITIAA- BP 82 225 44 322 Nantes Cedex 3, Francia
Av. Valparaíso y Rogelio Martínez, 5000-Córdoba, Argentina
e-mail: losciarini@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de la incorporación de emulsionantes sobre la calidad de panes libres de gluten. La formulación consistió en harina de arroz (40 g), harina de maíz (40 g), harina de soja inactiva (20 g) y agua destilada (150 g en base harina), margarina, sal y levadura. Los aditivos utilizados fueron SSL (1 g) o DATEM (1 g). Las masas se fermentaron por una hora y se hornearon 40 min a 220 *ºC*. Los panes se dejaron enfriar por 2 h antes de llevar a cabo los ensayos. Las masas fueron caracterizadas mediante un barrido de frecuencia. Se determinó volumen específico (VE) de los panes. Para estudiar el efecto del envejecimiento, fueron almacenados por 24 y 72h. A los panes con 2, 24 y 72h luego del horneado, se les determinó actividad de agua y se tomaron fotos de las rodajas para realizar un análisis de imagen; además, fueron liofilizados para determinar la tasa de retrogradación de la amilopectina utilizando calorimetría diferencial de barrido. Los módulos G' y G'' mostraron un comportamiento dependiente de la frecuencia para las tres formulaciones estudiadas. A una frecuencia de 1Hz, las masas con DATEM arrojaron los mayores valores de G' y tan δ, y los menores fueron para el control ($p<0.05$). Los panes con emulsionante tuvieron mayor VE con respecto al control, con valores de 1,96 cm^3/g para el control, 2,17 cm^3/g para los panes con SSL y 2,19 cm^3/g para los panes con DATEM. La actividad del agua inicial fue mayor para los panes con SSL, seguida por los panes con DATEM y el menor valor para el control ($p<0,05$). A 24 y 72h, no hubo diferencias entre las tres formulaciones. Para la estructura de la miga, no se observaron diferencias significativas en el área total de celdas ni en el tamaño promedio de las mismas. La estructura tampoco presentó diferencias con el transcurso del tiempo de almacenamiento, aunque se presentaron fracturas en la superficie de las mismas luego de 72h. Para los panes con DATEM, el pico de retrogradación de la amilopectina sufrió un corrimiento hacia mayores temperaturas, indicando la formación de estructuras más estables. Estos panes fueron los que presentaron menores valores de ΔH, lo que está relacionado con el menor grado de retrogradación de los mismos. Los resultados muestran que los emulsionantes mejoran la calidad de los panes, aumentando su VE y disminuyendo su retrogradación. Los panes con incorporación de DATEM presentaron las mejores características tecnológicas.

ABSTRACT

In this work, the effect of emulsifiers on gluten free breads was evaluated. Bread formulation included 40 g of rice flour, 40 g of corn flour, 20 g of defatted, inactive soy flour and 150 g of distilled water. Shortening, salt and compressed yeast were added. The emulsifiers studied were SSL (sodium stearoyl lactylate) and DATEM (diacetyl tartaric acid esters of monodiglycerides). Batters were fermented for 1 h and baked for 40 min at 220 *ºC*. Breads were cooled to room temperature for 2 h before bread analysis. Batters were characterized by a frequency sweep. Bread specific volume (BSV) was determined. Breads were stored for 24 and 72 h. Water activity and image analysis were performed to breads 2, 24 and 72 h after baking. They were also freeze-dried in order to determine amylopectin retrogradation rate by DSC (differential scanning calorimetry). G' and G'' showed a frequency-dependent behaviour in all samples studied. At a frequency of 1 Hz, batters with DATEM had the greatest G' and tan δ values, and the lowest ones were for control batters ($p<0.05$). Breads with emulsifier showed higher SBV when compared to the control, with 1.96 cm^3/g for control, 2.17 cm^3/g for SSL and 2.19 cm^3/g for DATEM. Initial a_w (2 h) was highest for SSL breads, followed by DATEM breads and by control ($p<0.05$). At higher storage times (24 and 72 h), there were not significant

differences among samples. Regarding crumb structure, differences were not observed among samples for total air area or for cell size. Crumb structure did not change with storage time, although crust fracture was observed in breads with 72 h of storage. For DATEM bread, amylopectin retrogradation peak was found at higher temperatures with regard to other samples, indicating the formation of more stable structures during storage. This bread showed the lowest ΔH values, which is related to a lower starch retrogradation rate. These results show that emulsifier addition improve bread quality, enhancing BSV and lowering amylopectin retrogradation rate. Breads with DATEM showed the best technological properties.

PALABRAS CLAVE: *panes libres de gluten, emulsionantes, calidad, envejecimiento.*

KEYWORDS: *gluten-free breads, emulsifiers, quality, staling*.

INTRODUCCIÓN

La celiaquía es una enteropatía crónica que se caracteriza por la inflamación de la mucosa del intestino delgado, resultado de una intolerancia genética a las proteínas de gluten de trigo, cebada, centeno y otros cereales que se incorporan con la dieta (Murray 1999). Esta respuesta inmunológica inadecuada puede causar la atrofia de las vellosidades intestinales, que lleva a la mala absorción de nutrientes (Ribotta *et al.* 2004). Los síntomas generales de la enfermedad incluyen diarrea, pérdida de peso y fatiga (Freeman *et al.* 2002). Eliminando el consumo de alimentos que contienen estos cereales se produce una recuperación clínica e histológica del paciente; por ende, el único tratamiento disponible en la actualidad es atenerse una dieta libre de gluten de por vida.

El gluten es la fracción proteica presente en la mayoría de los cereales, y está constituido por las proteínas de reserva del grano. Es el responsable de las propiedades elásticas y extensibles necesarias para producir panes de buena calidad. Debido a sus características tecnológicas y nutricionales, los productos a base de cereales, especialmente el pan, son componentes básicos en la dieta de numerosos países. Los pacientes celíacos no están exentos del consumo de pan, por lo que hay una gran demanda de panes libres de gluten. Sin embargo, los panes sin gluten disponibles en el mercado son de baja calidad, mostrando una miga seca y un sabor pobre (Gallagher *et al.* 2003), además de una baja calidad tecnológica, mostrando un volumen bajo, una miga muy firme y una alta velocidad de endurecimiento. Diferentes ingredientes se han incorporado a estos panes a fin de imitar las propiedades viscoelásticas del gluten (Ribotta *et al.* 2004), proveyéndoles estructura y una mejor capacidad de retención de gas a las masas y mejorando su calidad nutricional, ya que en general son ricos en almidón y deficientes en otros macro y micronutrientes.

Los productos aptos para celíacos generalmente son más caros que los elaborados con trigo, por lo que las pérdidas económicas producidas por su endurecimiento son proporcionalmente mayores. El endurecimiento de la miga durante el almacenamiento está gobernado por múltiples factores, dentro de los que se destaca la retrogradación que sufre el almidón. El término “retrogradación” se ha utilizado para describir los cambios que ocurren en el almidón luego de la gelatinización, desde un estado inicialmente amorfo hasta un estado más ordenado y cristalino (Liu *et al.* 2007).

Los emulsionantes son ingredientes lipídicos que funcionan tanto como estabilizadores de la masa, -cuando el emulsionante interactúa con la fracción proteica de la misma-, como suavizantes de la miga -cuando se acomplejan con el almidón gelatinizado durante el horneado- (Goesaert *et al.* 2005). Han sido utilizados en la industria de la panificación desde hace más de 60 años con el objetivo de retardar el endurecimiento de la miga (Pisesookbunterng y D’Appolonia, 1983). Este efecto se relaciona con la habilidad de los emulsionantes para formar complejos insolubles con la amilosa durante el horneado. Este complejo no participaría en la recristalinización del almidón. Además, los emulsionantes reducen la absorción de agua por parte del almidón y su solubilización durante la gelatinización (Eliasson y Gudmundsson 1996, Roach y Hoseney 1995). De esta manera, la movilidad de los polímeros que forman parte del almidón se ve restringida, así como también la lixiviación de la amilosa, resultando en un menor grado de cristalinización durante el almacenamiento (Gray y BeMiller 2003).

Además, mediante su agregado, los emulsionantes logran que la masa tolere mejor el trabajo realizado sobre ella durante el batido y la fermentación, y mejorar la estructura de la miga, obteniéndose un alveolado más fino y uniforme (Stampfli y Nersten 1995). Retienen también el dióxido de carbono

incorporado durante el batido, y disminuyen su liberación durante el horneado (Daniels y Fisher 1976).
El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la incorporación de emulsionantes sobre la calidad de masas y panes libres de gluten y determinar su efecto sobre la tasa de retrogradación de la amilopectina durante el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de panes

Los panes se realizaron a partir de 40 g de harina de arroz, 40 g de harina de maíz, 20 g de harina de soja inactiva, deslipidizada y 150 g de agua destilada. Se incorporaron 2,2 g de sal, 2,2 g de margarina y 3,3 g de levadura fresca. Como aditivos, se utilizaron 1 g de SSL (estearoil 2-lactilato de sódio) o de DATEM (éster de monoglicéridos de ácido diacetil tartárico). Los ingredientes se mezclaron por 1 min a 130 rpm (KitchenAid, St. Joseph, EUA), y luego 2 min a 200 rpm. Se pesaron 75 g de la masa resultante en moldes individuales de aluminio, y se sometieron a una fermentación de 1 h a 30 *ºC* y 85% de humedad (Hengel, Le Coteau, Francia). Luego, se hornearon a 220 *ºC* durante 40 min (MIWE, Arnstein, Alemania). Los panes fueron desmoldados y luego se los dejó enfriar durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, fueron almacenados por 24 y 72 h en bolsas Ziploc a temperatura ambiente (25 *ºC*).

Análisis sobre masas

Para el análisis reológico, las masas se prepararon de la misma manera que para la fabricación de panes, pero sin la incorporación de levadura. Luego de la fabricación, las masas se dejaron reposar por 15 min. El análisis reológico se llevó a cabo utilizando un reómetro de esfuerzo controlado (AR 1000-N Rheometer, TA Instruments, Crawley, UK). Las masas se colocaron en el reómetro, removiéndose el exceso. Para evitar la evaporación del agua durante el ensayo, los bordes expuestos fueron recubiertos con vaselina. Antes de comenzar con el ensayo, la muestra se dejó reposar por 5 min, para permitir su relajación antes de la medición. La temperatura durante el ensayo fue controlada utilizando un baño termostatizado (Tempette Junior TE-8J, Techné, Scientrier, Francia). Se llevó a cabo un barrido de deformación con el fin de establecer la región de comportamiento viscoelástico de las masas. Luego, se realizó un barrido de frecuencia de 0,1 a 10 Hz, y a una deformación de 0,1%. Para ambos ensayos se utilizó una geometría cono-plato (60 mm de diámetro y un ángulo de 4º).

Análisis sobre panes

Volumen específico (VE). El Volumen se determinó utilizando el método de desplazamiento de semillas de colza. Se pesaron los panes 2 h después del horneado y se calculó su volumen específico.
Actividad de agua (a_w). Se molieron los panes e inmediatamente se les determinó la actividad de agua (Aqua lab 3 TE Instrument, Decagon, Washington, EUA). La a_w fue medida 2, 24 y 72 h luego de horneados.
Humedad. Los panes con diferente tiempo de almacenamiento (2, 24 y 72 h) fueron molidos, y se pesaron 2 g en platos de aluminio y se secaron en estufa con ventilación por 24 h a 100 *ºC*.
Análisis de imagen. Los panes fueron cortados en rodajas de 15 mm y fotografiados. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa ImageJ. Como parámetros, se obtuvieron el% de área de la rodaja ocupado por aire, el tamaño promedio de los alvéolos y el número de alvéolos por unidad de superficie.
Determinación de la retrogradación del almidón. Los panes almacenados por 2, 24 y 72 h fueron molidos, congelados a -18 *ºC* y liofilizados. Luego se molieron hasta alcanzar granulometría constante (250μm). Para determinar la retrogradación del almidón, se utilizó un microDSC (Setaram Instrumentation, Caluire, Francia). Se pesaron 0,6 g de agua destilada y se agregaron 0,15 g de muestra. Se cerró herméticamente la cápsula y se la dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se corrieron desde 20 a 120 *ºC*, a una velocidad de 1,2 *ºC*/min. Como referencia se utilizó una cápsula con agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades de las masas

Reología. En la **Tabla 1** se presentan los valores medios de los módulos de almacenamiento y pérdida (G' y G'', respectivamente), y tan δ para las masas de las formulaciones analizadas, a una frecuencia

de 1 Hz. Los módulos G' y G'' de todos los batidos mostraron un comportamiento dependiente de la frecuencia. G' fue mayor que G'' a todas las frecuencias estudiadas. A una frecuencia de 1 Hz, las masas con DATEM arrojaron los mayores valores de G' y tan δ, y los menores fueron para la masa control. En la **Figura 1** se grafican los valores de G' y G'' de las muestras estudiadas en función de la frecuencia.

Tabla 1. Valores de G' y tan δ de las masas control y con la incorporación de DATEM y SSL a una frecuencia de 1 Hz.

Muestra	G' (Pa)*	tan δ
Control	4288,5±60,1	0,169±0,006
SSL	4777,5±144,9	0,182±0,005
DATEM	4936,5±406,5	0,195±0,005

(*)promedio ± desvío estándar

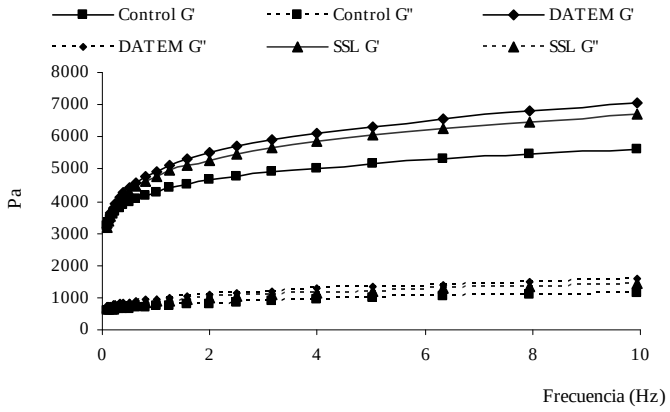


Figura 1. Comportamiento viscoelástico de las masas control y con incorporación de DATEM y SSL (0,1% de deformación).

Existen en la bibliografía numerosos trabajos de incorporación de DATEM sobre masas a base de trigo, aunque muy poco se ha llevado a cabo sobre masas libres de gluten. Así, en masas de trigo, se ha informado que el DATEM facilita la interacción de los lípidos con las proteínas y el almidón (Jacobsberg *et al.* 1976). Tu y Tsen (1978) postularon que los emulsionantes aniónicos se unen a las gluteninas de trigo durante el amasado, formando complejos glutenina-emulsionante. Mediante el uso de FT-IR (espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier) se ha identificado el enlace entre el grupo carbonilo del DATEM y los residuos glutamina de las gluteninas (Hähnel *et al.* 1994, citado por Aamodt *et al.* 2003). Estas interacciones serían las responsables del reforzamiento de la estructura de las masas de trigo con incorporación de DATEM.

En el sistema analizado en este trabajo se observa un efecto de reforzamiento similar de los emulsionantes sobre los batidos. La mayor fracción proteica del arroz está constituida por glutelinas. Éstas son extremadamente insolubles en agua en estado nativo, debido a su hidrofobicidad y a los puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro presentes entre ellas (Hamada 1996, Juliano 1985). Las proteínas de soja están constituidas casi en su totalidad por albúminas y globulinas, altamente solubles en agua (Chuan-He *et al.* 2006). La incorporación de los emulsionantes aniónicos facilitaría la interacción entre ambos grupos de proteínas –hidrofóbicas e hidrofílicas– gracias a la presencia, en su estructura, de grupos polares y apolares. Esta interacción entre las proteínas lograría un reforzamiento de la masa, que se traduce en mayores valores de los módulos elástico y viscoso, y de tan δ.

Análisis sobre panes

Volumen específico (VE). El agregado de emulsionantes tuvo un efecto positivo aumentando el VE de los panes en relación al control. Los valores de VE fueron de 1,96; 2,19 y 2,17 cm^3/g para el pan control, con DATEM y con SSL, respectivamente. Las diferencias entre los panes con DATEM y SSL no fueron significativas. Los emulsionantes se utilizan en la panificación con múltiples propósitos,

entre los cuales se destaca mejorar la retención de gas, que resulta en mayores volúmenes específicos (Stampfli y Nersten 1994).

Actividad de agua (a_w). Se observaron diferencias en la a_w de los diferentes panes luego del horneado (**Tabla 2**); el mayor valor fue para los panes con SSL y el menor para el control ($p<0,05$). Luego de 24 y 72 h no se observaron diferencias entre las muestras. Pisesookbunterng y D'Appolonia (1983) y Xu *et al.* (1992) sugirieron que en los panes con emulsionante, éste se adsorbe a la superficie del almidón impidiendo que absorba agua en la misma proporción que en los panes control (sin incorporación de emulsionantes). Esta agua libre estaría disponible para su migración desde la miga hacia la costra, aumentando, por ende, el valor de actividad de agua del pan.

Humedad. No se observaron diferencias significativas en la humedad de las distintas muestras 2 y 24 h luego del horneado (**Tabla 2**). Luego de 72 h de almacenamiento, los panes con DATEM presentaron menor contenido de agua ($p<0,05$).

Tabla 2. Actividad del agua y contenido de humedad de los panes control y con incorporación de DATEM y SSL; 2, 24 y 72 h luego del horneado.

Muestra	2 h		24 h		72 h	
	a_w *	%H	a_w	%H	a_w	%H
Control	0,976±0,003	48,887±0,853	0,981±0,002	48,180±0,050	0,979±0,001	50,967±1,077
DATEM	0,979±0,001	49,130±0,925	0,984±0,002	48,077±1,164	0,982±0,002	46,887±0,234
SSL	0,985±0,004	49,653±0,873	0,982±0,012	48,554±0,531	0,980±0,004	50,009±0,339

(*) promedio ± desvío estándar

Retrogradación de la amilopectina. El ΔH de la retrogradación de la amilopectina luego de 72 h de almacenamiento fue menor para los panes con DATEM, lo que sugiere una menor tasa de retrogradación de la amilopectina para estas muestras. Para estos mismos panes, la Tp fue mayor y el ancho de pico, menor, lo que indicaría la formación de estructuras más estables y homogéneas durante el almacenamiento (**Tabla 3**). Se ha descripto en la bibliografía que los emulsionantes interaccionan con la amilosa lixiviada durante el proceso de gelatinización, aumentando la concentración del complejo amilosa-lípido. Cuando se agrega suficiente cantidad de emulsionante, toda la amilosa se encuentra acomplejada, incrementándose su interacción con la amilopectina, reduciéndose la tasa de retrogradación de la misma (Stampfli y Nersten 1995). La eficacia del emulsionante para retardar la retrogradación depende de su capacidad para acomplejarse con la amilosa, siendo el DATEM y los monoglicéridos destilados los que mayor capacidad presentan (Krog *et al.* 1989).

Tabla 3. Propiedades térmicas de los panes control y con incorporación de DATEM y SSL 72 h luego del horneado.

Muestra	ΔH (J/g sólido) *	T_o (*ºC*)	T_p (*ºC*)	Ancho de pico (*ºC*)
Control	2,395±0,139	40,877±2,869	49,507±0,951	22,470±0,198
SSL	2,898±0,260	36,845±1,336	47,725±0,686	23,445±1,605
DATEM	1,909±0,263	41,820±0,594	50,470±0,311	19,680±0,297

ΔH: entalpía de retrogradación de amilopectina; T_o: temperatura de inicio, T_p: temperatura de pico.
(*) promedio ± desvío estándar

Análisis de imagen. En la **Tabla 4**, se observa que el área de la rodaja ocupada por aire osciló entre valores de 38,7 y 40,4%; mientras que el número de celdas/cm^2 varió entre 60,9 y 64,3. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. La estructura tampoco presentó diferencias en el transcurso del almacenamiento, aunque se presentaron fracturas en la superficie de las rodajas luego de 72 h.

Tabla 4. Parámetros de análisis de imagen para los panes control y con incorporación de DATEM y SSL.

Muestra	Tamaño promedio de alvéolos (cm2) *	% área de rodaja ocupada por aire	Número alvéolos/cm2
Control	0,015±0,001	38,7±0,7	60,9±2,9
DATEM	0,017±0,002	40,4±1,5	62,2±1,9
SSL	0,016±0	40,4±1,1	64,3±1,2

(*)promedio ± desvío estándar

CONCLUSIÓN

Los resultados muestran que la incorporación de emulsionantes aumenta los valores de los módulos elástico y viscoso, lo que está relacionado con panes de mayor VE. La incorporación tanto de DATEM como de SSL disminuye la retrogradación de la amilopectina. Los panes con incorporación de DATEM presentaron las mejores características tecnológicas, obteniéndose panes frescos durante más tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aamodt A, Magnus EM, Færgestad EM. 2003. Effect of flour quality, ascorbic acid, and DATEM on dough rheological parameters and hearth loaves characteristics. Food Chemistry and Toxicology, 68(7): 2201-2210.

Chuan-He Tang, Hui Wu, Zhang Chen, Xiao-Quan Yang. 2006. Formation and properties of glycinin-rich and b-conglicinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. Food Research International 39(1):87-97.

Daniels DGH, Fisher N. 1976. Release of carbon dioxide from dough during baking. Journal of the Science of Food and Agriculture, 27(4): 351-357.

Eliasson AC, Gudmundsson M. 1996. Starch: Physicochemical and functional aspects. En A.-C. Eliasson (Ed.), Carbohydrates in food (pp. 431–503). Nueva York, NY: Marcel Dekker.

Freeman H, Lemoyne M, Pare P. 2002. Coeliac disease. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, 16 (1): 37-49.

Gallagher E, Gormley TR, Arendt EK. 2003. Crust and crumb characteristics of gluten free breads. Journal of Food Engineering, 56(2-3): 153-161.

Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke WS, Courtin CM, Gebruers K, Delcour JA. 2005. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality Trends in Food Science and Technology, 16: 12-30.

Gray JA, BeMiller JN. 2003. Bread staling: Molecular basis and control. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2: 1-20.

Hähnel W, Jussofie I, Weitemeyer C, Müller F. 1994. Infrarotspektroskopische untersuchungen zur wirkung von emulgatoren in hefebackwaren I: Modellversuche zur wirkung von emulgatoren auf gluten und aminosäuren. Fat Science and Technology, 96(2): 60-4.

Hamada JS. 1996. Separation and molecular mass distribution of rice proteins by size-exclusion high-performance liquid chromatography in a dissociating buffer. Journal of Chromatography A, 734: 195-203.

Jacobsberg FR, Worman SL, Daniels NWR. 1976. Lipid binding in wheat-flour doughs: the effect of DATEM emulsifier. Journal of the Science of Food and Agriculture, 27: 1064-1070.

Juliano BO. 1985. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. En: Juliano, B.O. (Ed.), Rice Chemistry and Technology, segunda ed. AACC, MN, EEUU, pp. 59-174.

Krog N, Olesen SK, Toernaes H, Joensson T. 1989. Retrogradation of the starch fraction of wheat bread. Cereal Foods World, 34(3):281-285.

Liu H, Yu L, Chen L, Li L. 2007. Retrogradation of corn starch after thermal treatment at different temperatures. Carbohydrate Polymers, 69: 756-762.

Murray JA. 1999. The widening spectrum of celiac disease. American Journal of Clinical Nutrition. 69: 354-365.

Pisesookbunterng W, D'Appolonia BL. 1983. Bread staling studies. I: Effect of surfactants on moisture migration from crumb to crust and firmness values o bread crumb. Cereal Chemistry, 60(4): 298-300.

Ribotta PD, Ausar SF, Morcillo MH, Pérez GT, Beltramo DM, León AE. 2004. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 1969-1974.

Roach RR, Hoseney RC. 1995. Effect of certain surfactants on the starch in bread. Cereal Chemistry, 72: 578-582.

Stampfli I y Nersten B. 1995. Emulsifiers in bread making. Food Chemistry, 52, 353-360.

Tu CC, Tsen CC. 1978. Effects of mixing and surfactants on microscopic structure of wheat glutenin. Cereal Chemistry, 55(1): 87-95.

Xu A, Chung K, Ponte JG. 1992. Bread crumb amylograph studies. I. Effects of storage time, shortening, flour lipids, and surfactants. Cereal Chemistry, 69(5): 495-501.

Incorporación de glucosa oxidasa y lactosuero en panes libres de gluten

Addition of glucose oxidase and whey protein to gluten free breads

Sciarini LS, Pérez GT, Ribotta PD, León AE

(1) CONICET - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
Av. Valparaíso y Rogelio Martínez, Ciudad Universitaria, 5000- Córdoba, Argentina
losciarini@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la incorporación de proteínas y enzimas sobre las propiedades de las masas y los panes libres de gluten. Los panes se elaboraron con harina de arroz (45%), fécula de mandioca (45%) y harina de soja activa (10%), 65% agua destilada, 2% de sal, 2% de margarina, 3% de levadura fresca y 0,01% de leudante químico. Como aditivos, se incorporaron: 5% de lactosuero o 0,003% de glucosa oxidasa (GOX). Los ingredientes se batieron y se sometieron a un proceso de doble fermentación. Las masas se hornearon por 30 min a 180°C. A partir de las masas, se realizó una extracción de proteínas con: buffer TRIS/HCl 0,5 M pH 8,8 y buffer TRIS/HCl + 2% SDS. Las diferentes fracciones se separaron por SDS-PAGE. El proceso de fermentación de las masas y la estructura de la miga de los panes fueron evaluados por análisis de imagen. Se determinó volumen específico (VE) de los panes y la dureza de la miga a las 2 h, 24 h y 72 h luego del horneado. El VE de los panes varió entre 2,85 y 3,07 cm^3/g, aunque las diferencias no fueron significativas respecto al control. La dureza inicial de la miga fue menor para el control, mientras que la velocidad de endurecimiento de la miga (calculada como la pendiente entre los valores de dureza luego de 2h y 72h) fue mayor para los panes control, y el menor valor para aquellos con incorporación de GOX. Las migas de los panes control y con GOX presentaron alvéolos de menor tamaño que la de los panes con suero, y esta última presentó menor número de celdas/cm^2. El área ocupada por aire representó un 28,5%, 31,6% y 33,6% ($p<0,05$) del área total de la rodaja del pan control, con GOX y con suero, respectivamente. La dureza inicial de la miga correlacionó negativamente con el número de celdas por mm^2 observado después de la segunda fermentación de la masa ($r= -0,995$; $p= 0,02$). El perfil electroforético de las proteínas mostró una banda de alto peso molecular en las masas con GOX debido a la formación de polímeros de mayor tamaño por acción de la enzima. Los resultados muestran que la incorporación de GOX disminuyó la tasa de endurecimiento, obteniéndose una miga fresca durante más tiempo. La adición de GOX favorece la formación de una red proteica que refuerza la estructura de las masas de estos panes carentes de la red de gluten.

ABSTRACT

The aim of this work was to assess the effect of added protein and enzymes on gluten-free batter and bread properties. Batters and breads were made of rice flour (45%), cassava starch (45%) and active soy flour (10%), 65% distilled water, 2% salt, 2% shortening, 3% compressed yeast and 0.01% leavening agent. As additives, 5% whey protein concentrate or 0.003% glucose oxidase were added. Ingredients were mixed together and were subjected to a double-proofing process. Resulting batters were baked 30 min at 180 *ºC*. Protein extraction was performed from batters. TRIS/HCl 0.5 M pH 8.8 buffer and TRIS/HCl + 2% SDS buffer were used as solvents. Soluble protein fractions were separated by SDS-PAGE. Fermentation process and bread crumb structure were evaluated by an image analysis. Bread specific volume (BSV) was determined, and crumb texture was measured 2, 24 and 72 h after baking. BSV varied between 2.85 and 3.07 cm^3/g, although there were not significant differences among samples. Initial crumb hardness was lower for control breads, while staling rate (calculated as the slope initial-final hardness) was highest for control breads and lowest for GOX breads. Control and GOX crumbs presented smaller cell sizes regarding whey crumb and the last had fewer cells/cm^2. Air surface represented 28.5%, 31.6% and 33.6% ($p<0.05$) of slice total area for control, GOX and whey crumbs, respectively. Initial crumb hardness correlated negatively with cell number/mm^2 in batters after the second fermentation step ($r= -0.995$; $p= 0.02$). In SDS-PAGE gel, a high molecular weight band was observed in GOX batters due to the formation of larger polymers by enzyme action. These

results show that GOX incorporation decreased crumb staling rate, resulting in a fresh crumb for larger periods of time. GOX addition induces the formation of a protein matrix that reinforces batter structure of these lacking gluten network breads.

PALABRAS CLAVE: *panes libres de gluten, glucosa oxidasa, lactosuero, calidad.*

KEYWORDS: *gluten free bread, glucose oxidase, whey proteins, quality.*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad más común provocada por la ingesta de cereales es conocida como celiaquía, que se presenta en individuos genéticamente susceptibles cuando consumen alimentos que contienen proteínas provenientes del trigo y otros cereales como cebada, centeno, kamut y espelta, e híbridos entre ellos, como el triticale. Se caracteriza por la atrofia de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado, lo que conlleva la mala absorción de nutrientes (Thompson 2001, Chirdo *et al.* 2002). Las proteínas causantes de esta enfermedad son las prolaminas y otras que pertenecen al grupo de proteínas del gluten (Lähdeaho *et al.* 1995). El único tratamiento para esta enfermedad es llevar una dieta libre de gluten de por vida (Feighery 1999), que permite una recuperación clínica e histológica.

La prevalencia de la celiaquía en el mundo se estima en 1/300 adultos (Collin *et al.* 1997), aunque estudios recientes (Mustalahti *et al.* 2002) sugieren que ésta es incluso más alta (1 en 100). Sin embargo, la incidencia varía de acuerdo al grupo étnico del que se trate, siendo la raza blanca la más afectada (Ciclitira y Moodie 2003). En Argentina, el último estudio realizado arrojó un índice de 1/167, concordante con los indicadores de las áreas de Europa relacionadas genéticamente con nuestra población (Gómez 2000). Esto significa que aproximadamente 225.000 personas en nuestro país están obligadas a consumir alimentos libres de gluten. Sin embargo, los panes libres de gluten carecen de una matriz proteica continua, por lo que generalmente son de calidad tecnológica pobre, mostrando un bajo volumen específico, una miga compacta y dura y una alta velocidad de endurecimiento. Diferentes proteínas han sido incorporadas a los panes libres de gluten con el fin de obtener una matriz que actúe como la red de gluten en los panes de trigo (Ribotta *et al.* 2004, Moore *et al.* 2004). Trabajos previos (Moore *et al.* 2006) han demostrado que la incorporación de diferentes fuentes proteicas en combinación con la enzima transglutaminasa favorece la formación de una red continua capaz de mejorar la calidad tecnológica del pan. Sin embargo, se encuentra en la bibliografía cierta resistencia a la utilización de la transglutaminasa como aditivo alimenticio, debido a que existe la posibilidad de que ésta genere los epitopes responsables de la celiaquía (Gerrard y Sutton 2005), motivo por el cual su uso en el procesamiento de cereales no es seguro para pacientes celíacos (Cabrera-Chávez y Calderón de la Barca 2008). La glucosa oxidasa (GOX) es una enzima que cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual oxida grupos sulfhidrilos favoreciendo la formación de puentes disulfuro entre las proteínas, entrecruzándolas (Gujral y Rosell 2004, Rasiah *et al.* 2005).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la incorporación de proteínas y enzimas sobre las propiedades de las masas y los panes libres de gluten.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de los panes

Los panes se elaboraron con harina de arroz (45 g), fécula de mandioca (45 g) y harina de soja activa (10 g), 65 g de agua destilada, 2 g de sal, 2 g de margarina, 3 g de levadura fresca y 0,01 g de leudante químico. Como aditivos, se incorporaron: 5 g de concentrado proteico de lactosuero (80% de pureza) o 0,003 g de glucosa oxidasa (GOX). Los ingredientes se batieron por 3 min a alta velocidad y se sometieron a una primera fermentación de 30 min de duración en una estufa con humedad controlada (FAC, modelo CDH, Pilar, Argentina, 30 *ºC*, 85% humedad). Pasado este tiempo, la masa fue batida por 1 min a baja velocidad. Se pesaron 60 g de masa en moldes individuales de aluminio, y se los llevó a una segunda fermentación por 30 min bajo las mismas condiciones. Luego de este tiempo, las masas se hornearon 30 min a 180 °C. Se retiraron del horno y se dejaron enfriar por 2 h. Se almacenaron en bolsas de polietileno a 25 *ºC* por 24 y 72 h.

Ensayos sobre masas

Extracción de proteínas. Se realizaron extracciones de proteínas a partir de la masa en diferentes períodos: luego del batido, al finalizar la primera fermentación y al final de la segunda. Se utilizaron buffer TRIS/HCl 0,5 M pH 8,8 y buffer TRIS/HCl+2%SDS como soluciones de extracción. La relación masa:solvente fue de 1:10 (p/v). Se agitaron los tubos por 30 min y se centrifugaron por 20 min a *3000x g*. Las fracciones proteicas del sobrenadante se separaron por SDS-PAGE, bajo condiciones no reductoras, con el fin de evaluar la evolución de esta fracción durante la fermentación de la masa.

Cambios estructurales durante la fermentación. Para evaluar la evolución de ambos procesos de doble fermentación de las masas, éstas se observaron bajo la lupa (7,5x) y se tomaron fotos cada 5 min durante los 30 min que dura cada paso de la fermentación. Se analizaron las imágenes obtenidas utilizando el software ImageJ (1.41o). Se obtuvieron los siguientes parámetros: número de alvéolos por unidad de superficie, tamaño promedio de alvéolos y porcentaje de área de la masa ocupada por aire.

Ensayo de penetración de las masas. La fuerza de penetración de las diferentes masas fue determinada utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra). Las masas se hicieron de la misma manera que para la obtención de panes, y se pesaron 40 g de masa en frascos plásticos. El ensayo se llevó a cabo tanto al final de la primera fermentación como al final de la segunda. Para las mediciones, se utilizó la sonda de 25 mm de diámetro, y se comprimió la masa hasta que la sonda penetró en las mismas. La fuerza de penetración fue tomada como un indicador de la consistencia de las masas.

Ensayos sobre los panes

Volumen específico. Los panes fueron pesados 2 h luego de retirados del horno. El volumen se determinó por desplazamiento de semillas de colza. Se calculó entonces el volumen específico (VE) de los diferentes panes.

Textura de la miga. La textura de la miga fue evaluada por medio de un Análisis de Perfil de Textura (TPA) utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra), sobre panes recién horneados (2 h) y almacenados (24 y 72 h). Los panes se cortaron longitudinalmente utilizando un regulador con el fin de obtener rodajas de 15 mm de espesor. El ensayo se realizó a una velocidad de 5 mm/s hasta que la miga se comprimió a un 40% de su altura original. La *tasa de endurecimiento* se calculó como la pendiente de la curva entre valores de dureza inicial y final.

Estructura de la miga. Se tomaron fotos de las rodajas, y se evaluó su estructura por medio análisis de imagen utilizando el software ImageJ (1.41o). Se obtuvieron los siguientes parámetros: número de alvéolos por unidad de superficie, tamaño promedio de alvéolos y porcentaje de área de la rodaja ocupada por aire.

Color de corteza y miga. El color de la corteza y de la miga se determinó utilizando un espectrofotómetro (CM-500d Minolta, Osaka, Japón). Para determinar el color de la miga, se cortaron piezas de 2 cm x 2 cm y 1 cm, y se presionaron para eliminar el contenido de aire de las mismas. Para realizar la determinación del color de la corteza, se tomaron tres mediciones en la parte superior de los panes.

Análisis estadístico

Los ensayos se llevaron a cabo, al menos, por duplicado, informándose su valor promedio ± desvío estándar. Los datos se trataron estadísticamente mediante un Análisis de Varianza y los resultados se compararon por el Método de Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher. Se utilizó el programa Infostat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Masas

Los geles resultantes de las electroforesis (**Figura 1**) no muestran diferencias en el perfil electroforético de las proteínas extraídas de las masas después del batido, de la primera fermentación y de la segunda. Se observó, sin embargo, la presencia de una banda de alto peso molecular en las masas con GOX que no se observa en las masas control. Ésta sería el resultado de la acción polimerizante de la enzima glucosa oxidasa. Gujral y Rosell (2004) también informaron la modificación de las proteínas de arroz mediante la incorporación de GOX, obteniendo polímeros de mayor peso molecular y con

solubilidad reducida. Rasiah *et al.* (2005), trabajando con harina de trigo, demostraron que la incorporación de GOX a las masas resulta en el entrecruzamiento de las albúminas y las otras proteínas de trigo presentes. Las proteínas de soja se componen en su totalidad por albúminas y globulinas (Chuan-He *et al.* 2006), que actuarían como sustrato de la enzima en estas masas.

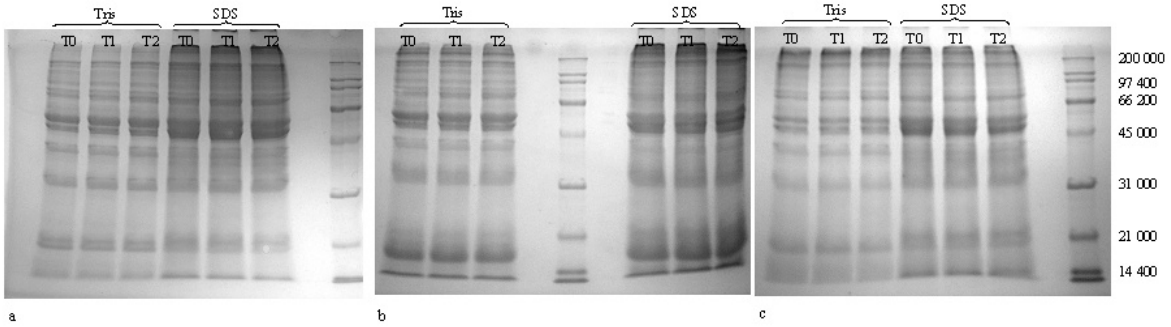


Figura 1. Electroforesis bajo condiciones no reductoras de las proteínas extraídas con buffer TRIS/HCl y con TRIS/HCl+SDS. T0: extracción luego del batido, T1: extracción al final de la primera fermentación, T2: al final de la segunda fermentación. a) masa control, b) masa con suero, c) masa con GOX.

Para las tres masas se observó que la fuerza de penetración disminuyó en la segunda fermentación en relación a la primera. No hubo diferencias significativas entre las diferentes muestras luego de la primera fermentación ($p>0,05$). Al final de la segunda fermentación, se observó que la fuerza para las masas con suero disminuyó en relación a las masas control y con GOX ($p<0,05$) (**Figura 2**).

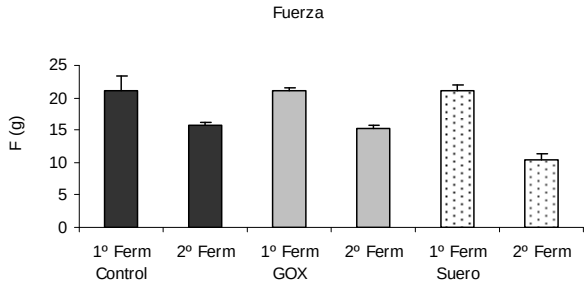


Figura 2. Fuerza de penetración para las masas control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero luego de la primera y la segunda fermentación.

Al realizar el análisis de imagen de las masas durante la fermentación (**Figuras 3**, **4** y **5**), se observó que al finalizar la segunda fermentación éstas presentaron menor cantidad de alvéolos por unidad de superficie en comparación a la primera fermentación, y éstos fueron de mayor tamaño. El área ocupada por gas también fue mayor en comparación con el final de la primera fermentación. Las masas con suero presentaron el mayor porcentaje de superficie ocupada por aire, seguida por las masas con GOX. El concentrado proteico de lactosuero está compuesto en su mayoría por albúminas y globulinas, con alta capacidad espumante, que sería responsable de la mayor incorporación de aire en estas masas. Este mayor contenido de aire estaría relacionado con la menor fuerza de penetración que presentó la masa con suero.

Las masas con GOX presentaron mayor cantidad de celdas por unidad de superficie y fueron de menor tamaño en relación a las otras masas, tanto en la primera como en la segunda fermentación. Fueron seguidas en esta tendencia por las masas control, siendo las masas con suero las que menor número de alvéolos por unidad de superficie presentaron, y fueron de mayor tamaño. Sin embargo, luego de la segunda fermentación, el número de alvéolos de las masas con GOX disminuyó en un 60% respecto a la cantidad de alvéolos presentes al finalizar la primera fermentación, obteniéndose una estructura formada por menor número de alvéolos, de mayor tamaño. Las masas con suero sufrieron una disminución del 54% y las masas control, de un 48%. El mayor porcentaje de disminución en el numero de alvéolos observada en las masas con GOX se debería a la presencia de polímeros de alto peso molecular que se forman por la acción catalítica de la enzima, que le brindan estructura a estas

masas, permitiendo una redistribución del aire durante el batido entre ambas fermentaciones, evitando la pérdida del mismo.

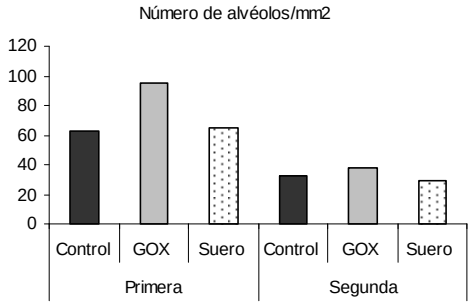


Figura 3. Número de alvéolos por unidad de superficie para las masas control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero, al finalizar la primera y la segunda fermentación.

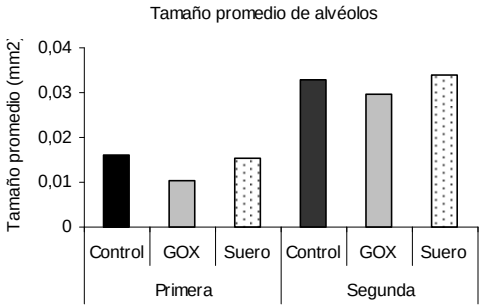


Figura 4. Tamaño promedio de alvéolos de las masas control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero luego de la primera y la segunda fermentación.

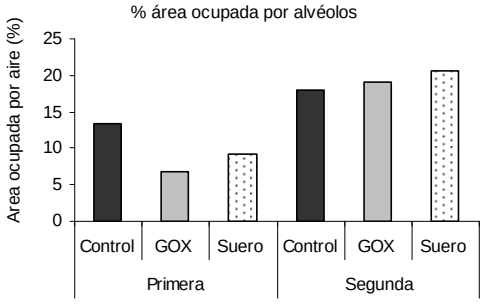


Figura 5. Porcentaje del área ocupado por aire para las masas control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero luego de la primera y la segunda fermentación.

Panes

En la **Tabla 1** se observan los valores de VE, dureza, tasa de endurecimiento y contenido de agua (g de agua/g de sólido) de los panes estudiados. El VE de los panes varió entre 2,85 y 3,07 cm^3/g, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre las formulaciones. La mayoría de la bibliografía describe los efectos de la GOX sobre panes de trigo a nivel de estructura de la miga, pero no se ha observado efecto sobre el volumen específico de los panes (Rasiah *et al.* 2005).

La dureza inicial de la miga se situó entre 153,8 y 209,7 g, siendo el mayor valor para los panes con suero ($p<0,05$). Esta dureza correlacionó negativamente con el número de celdas/área observado durante la segunda fermentación de la masa ($r= -0,99$; $p= 0,02$), aunque no correlacionó con la cantidad total de aire presente en la rodaja. Durante el almacenamiento, las muestras se comportaron de manera diferente: la tasa de endurecimiento fue mayor para los panes control, y los panes con GOX fueron los que más lentamente se endurecieron (**Figura 6**).

Tabla 1. Volumen específico (VE), dureza inicial, tasa de endurecimiento y contenido de agua para los panes control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero.

Muestra	Volumen específico (cm^3/g)	Dureza inicial (g)	Tasa de endurecimiento	g agua/g sólido
Control	2,93±0,15	153,79±20,64	498,67	0,799±0,007
GOX	3,07±0,15	187,98±32,88	330,29	0,829±0,001
Suero	2,85±0,05	209,68±39,28	477,80	0,804±0,007

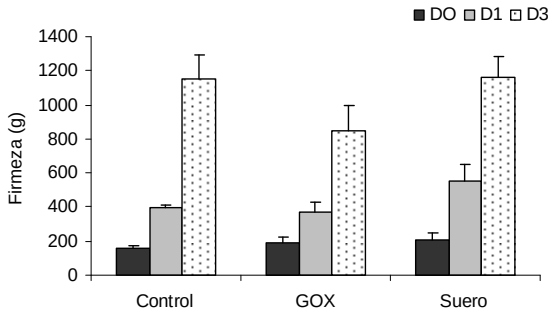


Figura 6. Firmeza de la miga de los panes control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero 2, 24 y 72 h luego de horneados.

El análisis de imagen de las rodajas de pan determinó que el área ocupada por aire fue menor para el pan control, seguida por los panes con GOX, y fue mayor para los panes con suero ($p<0,05$). Los panes con suero presentaron una estructura de miga más abierta, con menor cantidad de alvéolos/área , y de mayor tamaño. Los panes control, por el contrario, mostraron un alto número de celdas por unidad de superficie, y de tamaño reducido, obteniéndose una miga compacta. La miga de los panes con suero presentó pocos alvéolos de mayor tamaño, pero la pared de los mismos resultó gruesa, resultando en mayores valores de dureza para estos panes (**Tabla 2**).

Tabla 2. Porcentaje del área total ocupada por aire, número de alvéolos/cm^2 y tamaño promedio de los alvéolos para las rodajas de los panes control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero.

Muestra	% de área ocupada por aire	Nº Alvéolos/cm^2	Tamaño promedio de alvéolos (cm^2)
Control	28,35±0,9	167,2±2	0,006±0
GOX	31,6±0	138,9±3,8	0,008±0,001
Suero	33,6±0,3	75,9±9,4	0,013±0,002

Tabla 3. Valores de L^*a^* y b^* de la miga y la costra de los panes control y con incorporación de glucosa oxidasa (GOX) y suero.

		L^*	a^*	b^*
COSTRA	Control	75,10±0,35	5,03±0,66	27,21±1,26
	Suero	68,43±0,49	9,39±0,70	32,18±0,70
	GOX	77,51±0,45	3,91±0,55	25,13±1,02
MIGA	Control	78,93±0,49	1,18±0,15	23,08±0,55
	Suero	79,88±0,36	1,43±0,09	25,67±0,82
	GOX	78,19±1,06	1,03±0,33	21,48±1,07

En la **Tabla 3** se presentan los valores de L^*, a^* y b^* de las cortezas y las migas de los panes analizados. Como se observa para el color de la corteza, el valor L fue mayor para los panes con GOX, seguido por el pan control, y el menor valor fue para los panes con suero. Este menor valor es producto de la reacción de Maillard debido a la presencia de las proteínas del lactosuero. Por otro lado,

el sustrato de la GOX es la glucosa, por lo que la misma reacción de Maillard se vería disminuida en estos panes. Por contra parte, los panes con suero presentaron una miga con valores de L^* mayores que las migas control y con GOX. Los valores de a^* y b^* presentaron la misma tendencia en corteza que en miga. Los panes con GOX fueron menos rojos y menos amarillos (menores valores de a^* y b^*, respectivamente) en relación al control, mientras que los panes con suero fueron más rojos y más amarillos (mayores valores de a^* y b^*).

CONCLUSIÓN

Los resultados muestran que la incorporación de GOX a la masa produjo una mayor distribución del aire con la formación de gran número de burbujas pequeñas durante el batido y la fermentación. Este efecto se reflejó en panes con una estructura de miga más homogénea. Los panes con GOX presentaron una menor tasa de endurecimiento de la miga, obteniéndose una miga fresca durante más tiempo. Por otra parte, la incorporación de suero no tuvo efectos positivos sobre la textura de la miga, y redundó en la formación de una miga con estructura demasiado abierta y heterogénea.

La adición de GOX favorece la formación de una red proteica que refuerza la estructura de las masas de estos panes carentes de la red de gluten. Esta red sería la responsable de retener mayor proporción de agua durante el horneado y de dificultar su redistribución durante el almacenamiento, responsable en gran parte del endurecimiento de la miga.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cabrera-Chávez F, Calderón de la Barca AM. 2008. Letter to the editor. Journal of Cereal Science, 48: 878.

Ciclitira PJ, Moodie SJ. 2003. Coeliac disease. Practice and Research Clinical Gastroenterology, 17(2): 181-195.

Collin P, Reunala T, Rasmussen M, Kyrönpalo S, Pehkonen E, Laippala P, Mäki M. 1997. High incidence and prevalence of adult coeliac disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 32(11):1129-1133.

Chirdo FG, Zwirner NW, Rumbo M, Fossati CA. 2002. In vitro presentation of gliadin-derived peptides by different cell lines. Clinica Chimica Acta, 317(1): 151-158.

Chuan-He Tang, Hui Wu, Zhang Chen, Xiao-Quan Yang. 2006. Formation and properties of glycinin-rich and b-conglicinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. Food Research International 39(1):87-97.

Feighery C. 1999. Celiac disease. British Medical Journal, 319(7204): 236-239.

Gerrard JA, Sutton KH. 2005. Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for celiac disease. Trend in Food Science and Technology, 16: 510-512.

Gómez JC. 2000. Prevalencia de enfermedad celíaca (EC) en La Plata, Provincia de Buenos Aires. Estudio epidemiológico en población general adulta.
http://users.copetel.com.ar/slpgartner/ar/index/prevalencia.htm

Gujral HS, Rosell CM. 2004. Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. Food Research International 37: 75-81.

Lähdeaho M, Vainio E, Lehtinen M, Parkkonen P, Partanen J, Koskimies S, Mäki M. 1995. Activation of celiac disease immune system by specific a-gliadin peptides. Cereal Chemistry. 72: 475-479.

Moore MM, Schober T J, Dockery P, Arendt EK. 2004. Textural comparisons of gluten-free and wheat-based doughs, batters, and breads. Cereal Chemistry, 81(5): 567-575.

Moore MM, Heinbockel M, Dockery P, Ulmer HE, Arendt EK. 2006. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. Cereal Chemistry, 83(1): 28-36.

Mustalahti K, Lohiniemi S, Collin P, Vuolteenaho N, Laippala P, Markku, M. 2002. Gluten-free diet and quality of life in patiens with screen-detected celiac disease. Effective Clinical Practice, 5(3): 105-113.

Rasiah IA, Sutton KH, Low FL, Lin HM, Gerrard JA. 2005. Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. Food Chemistry, 89: 325-332.

Ribotta PD, Ausar SF, Morcillo MH, Pérez GT, Beltramo DM y León AE. 2004. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 1969-1974.

Thompson T. 2001. Wheat starch, gliadin and the gluten free diet. Journal of the American Dietetic Association, 101(12): 1456-1459.

Efectos de diferentes matrices sobre la liberación de Rebaudiósido en el mate

Effect of diferent matrices in Rebaudioside release in the maté

Scipioni GP, Ferreyra JD, Acuña MG.

FCEQyN - CIDET - Universidad Nacional de Misiones
Félix de Azara 1554 - 3300 - Posadas - Misiones - Argentina
gpatriciascipioni@yahoo.com.ar

RESUMEN

El producto denominado yerba mate saborizada o aromatizada se obtiene por adición de sustancias edulcorantes o saborizantes a la yerba mate elaborada. El agregado se realiza generalmente en forma directa. Los edulcorantes tienen una solubilidad considerable en agua caliente y esto hace que su liberación tenga lugar en los primeros mates.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto sobre la liberación del edulcorante natural rebaudiósido desde una matriz elaborada con polvo de yerba mate y polímeros adherentes como almidón, maltodextrina y goma arábiga.

Las matrices se prepararon mezclando 20 g de polvo de hoja de yerba mate (tamaño de partícula menor a 40 mesh) con 0,8 g de rebaudiósido; concentraciones del 5 y 10% en peso (respecto del polvo) de cada uno de los adherentes y 60 ml de agua. La pasta obtenida se mantuvo en baño maría a temperatura de 60 *ºC* durante 10 minutos y luego por igual período en baño de ultrasonido. El material se distribuyo en una capa de espesor inferior a 1 cm y se secó en estufa a la misma temperatura. Una matriz similar se preparó con polvo de yerba mate y el edulcorante sin el agregado de los polímeros. Porciones de 5 g del material molido y tamizado se mezclaron con 50 g de yerba mate elaborada. Un blanco se preparó por adición directa a la yerba mate de 0,2 g de rebaudiósido. A continuación se simuló una mateada y se recogieron 5 alícuotas de 100 ml. En cada alícuota se determinó la cantidad de rebaudiósido extraído por HPLC, en un cromatógrafo Shimadzu LC-20 AT equipado con columna zorbax amino de 4,6 * 250 mm y detector UV de arreglo de diodos (210 nm). La fase móvil utilizada fue acetonitrilo: agua en proporción 80:20 y pH 5. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El análisis de los datos obtenidos mostró que el 50% del edulcorante es extraído con agua caliente en la primera fracción del mateado simulado (130 ml) cuando la adición del edulcorante se realiza en forma directa. Las matrices de polvo de yerba mate, almidón y polvo, goma arábiga y polvo presentaron un comportamiento similar siendo necesarios volúmenes mayores, de 250 ml en promedio, para extraer el 50% del edulcorante. La matriz constituida con polvo y maltodextrina mostró un retardo considerable en la liberación del 50% del rebaudiósido con volúmenes superiores a 300 y 400 ml respectivamente (concentraciones de 5 y 10% de aglomerante).

Se puede concluir que el uso de matrices retarda la liberación del edulcorante, siendo la maltodextrina la que tiene el mayor efecto en la liberación de rebaudiósido durante una mateada.

ABSTRACT

Yerba maté is also consumed, resides its tradicional way, with the addition of sweeteners and flavors. The addition is generally carried out directly. Sweeteners are very soluble in hot water and consequently its concentration is high in the first mates and low in the last one. The aim of this research was to study the release of the sweetener rebaudioside A from a matrix elaborated with yerba maté powder and the agglutinants tapioca starch, arabic gum and maltodextrine. Matrices were prepared mixing 20 g of yerba mate leaves powder (which have a particle size minor than 40 mesh) with 0.8 g of rebaudioside A; an agglutinant concentration of 5 and 10% w/w (refered to the powder) and 60 mL of water. The mix was maintained at 60 *ºC* during 10 min and then it was introduced in an ultrasonic bath during 10 min. Then it was dried in an oven at 60 *ºC*. In order to dry the material was put in a tray with a thickness of 1 cm. One matrix was prepared without the agglutinant. Fractions of 5 g of material (previously grounded and sieved) were mixed with 50 g of yerba maté. In other experience 0.2 g of rebaudioside A was added directly to the yerba maté and it was used as a blank

experience. Simulating the maté consumption, 5 fractions of 100 mL were obtained. Rebaudioside A was determined using a HPLC technique, with a zorbax-amino column of 4.6x250 mm and an UV with diode array (210 nm) detector. An acetonitrile/water in a concentration 80:20 in volume and pH 5 was used as mobile phase. Assays were carried out in triplicate. Fifty percent of the rebaudioside A was extracted in the first 130 mL when it was directly added. Slightly defferences at the outlet rate of rebaudioside A were found between the material using starch and arabic gum and without agglutinant. It was necessary to use about 250 mL to extract 50% of the rebaudioside A. When the 5 and 10% maltodextrine mixture was used, it was necessary 300 and 400 mL of solution, respectively, to extract 50% of the rebaudioside A. It is concluded that the use of a matrix delayed the sweetener extraction and the maltodextrine was agglutinant which had the best delayed effect.

PALABRAS CLAVE: *edulcorante, yerba mate, matriz, aglomerantes.*

KEYWORDS: *yerba maté, sweeterner, matrix, agglutinant.*

INTRODUCCIÓN

Una de las formas de consumo de la yerba mate elaborada es la denominada yerba mate saborizada o aromatizada. Este producto se obtiene agregando edulcorantes, saborizantes o hierbas aromáticas a la yerba mate. Generalmente estos compuestos son mezclados en forma directa. Los edulcorantes son moléculas polares con capacidad de interactuar con el agua, efecto que se ve favorecido al incrementarse la temperatura, haciendo que su concentración resulte elevada en los primeros mates y muy baja en los últimos. Para extraer una cantidad mas uniforme de las sustancias adicionadas, se utilizan matrices que retardan la salida de los componentes. Se han desarrollado numerosas aplicaciones que emplean esta tecnología, desde la encapsulación de aromas y sabores hasta pigmentos naturales para ser adicionados a los alimentos. Los materiales que atrapan a los compuestos son polímeros de origen natural o que han sido modificados parcialmente. Entre ellos se encuentran la goma arábiga, de origen natural, que se obtiene de diferentes especies de acacias. Es un polisacárido complejo, se encuentra bajo la forma de sales de Ca^{+2}, Mg^{+2} y K^{+}, mezclado con pequeñas cantidades de proteínas (Treta *et al.* 2006). Se utiliza en mezclas como material de adherencia para controlar la liberación de aromas y componentes volátiles (Yoshii *et al.* 2001, Pua *et al.* 2007). La maltodextrina es un polímero de glucosa obtenido a partir del almidón de maíz, trigo o patata. Está compuesto por 1% de dextrosa, 3% de maltosa y 96% de triosas y polisacáridos, es el carbohidrato de elección en los alimentos con bajo aporte de calorías, por su gran solubilidad y rápida absorción.

Este trabajo tiene por finalidad utilizar una matriz formada con polvo de la yerba mate y un aglomerante (goma arábiga, almidón de mandioca y maltodextrina al 5 y 10%) como material de adherencia, para controlar la liberación del edulcorante natural rebaudiósido A.

El polvo de yerba mate constituye un material de descarte con escasas aplicaciones. Su uso en la elaboración de matrices permitiría disminuir residuos de la industria yerbatera a la vez que utilizar cantidades reducidas de otros aglutinantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En la formulación de las matrices se utilizó polvo de hoja de yerba mate proveniente de un molino yerbatero de la Provincia de Misiones. El material presentó un tamaño de partícula menor a 40 mesh (0,425 mm). El edulcorante rebaudiósido A (Rb), se obtuvo del proyecto denominado "Obtención y Purificación de esteviósidos a partir de la *Stevia Rebaudiana Bertoni*" de la Universidad Nacional de Misiones, con una pureza del 99%. Las sustancias aglomerantes empleadas (goma arábiga, almidón de mandioca y maltodextrina) fueron de calidad comercial.

Determinación de la cantidad de edulcorante a ser utilizado

Para establecer la cantidad de edulcorante a entrampar, se consideró la concentración de sacarosa que es necesario agregar a una bebida para lograr un endulzado intenso (10 g/100 ml) y el poder edulcorante del rebaudiósido A (250). La cantidad calculada correspondió a 0,2 g por cada 50 g de yerba mate y 500 ml de agua. De acuerdo a la zona en que se consume el mate, esta concentración se podría regular añadiendo al mate una menor cantidad de la matriz que contiene el edulcorante.

Preparación de la matriz

La preparación de la matriz se realizó mezclando 20 g de polvo de yerba mate; 0,8 g de rebaudiósido A (Rb) y 60 ml de agua destilada (matriz de polvo sin aglomerante). La mezcla se colocó en baño termostatizado a 60 *ºC* durante 10 min con agitación. Luego se sometió a ultrasonido por otros 10 minutos, se distribuyó en cajas de petri y se secó en estufa durante 24 hs a la misma temperatura. Concluido el secado, la matriz fue molida en molino de cuchillas y tamizada. La fracción retenida en el tamiz de malla 40 (425 mm) se utilizó en las experiencias. Este procedimiento se siguió en la preparación de las diferentes matrices con cada uno de los aglomerantes mezclados con polvo de yerba mate, en cantidades de 1 g y 2 g de goma arábiga (GA); maltodextrina (MD) y almidón de mandioca (AM), fracción que representó un 5% y 10% en peso del polvo utilizado. Los porcentajes de estos adherentes fueron determinados en base a investigaciones previas (Yoshii *et al.* 2001, Secouard *et al.* 2003, Pua *et al.* 2007). La composición de las diferentes matrices se puede observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Formulación de las matrices utilizadas en las experiencias.

Experiencia Nº	Cantidad de Polvo (g)	Rebaudiosido (g)	Tipo de aglomerante	Cantidad de aglomerante (g)
1	0	0,2	Adición directa	0
2	20	0,8	Goma arábiga	1
3	20	0,8	Goma arábiga	2
4	20	0,8	Almidón de mandioca	1
5	20	0,8	Almidón de mandioca	2
6	20	0,8	Maltodextrina	1
7	20	0,8	Maltodextrina	2
8	20	0,8	Sin aglomerante	0

Ensayos de extracción

Para estudiar la velocidad de salida del edulcorante, se simuló una mateada. Se colocaron en un vaso de precipitado 50 g de yerba mate y 5 g de la matriz molida y tamizada que contenía el edulcorante (0,2 g). A la mezcla se le adicionaron 100 ml de agua a 70 $\pm$ 2 *ºC* para humedecer completamente. Luego se agregaron porciones de 30 a 40 ml de agua a la misma temperatura, se dejó reposar durante 20 s y se extrajo la fracción acuosa por medio de una bombilla plástica conectada a un sistema de vacío (kitasato). La extracción se continuó hasta completar 100 ml. De esta forma se obtuvieron 5 fracciones diferentes (IRAM 20540-1 1997, Ramallo *et al.* 1998). El procedimiento se repitió con las matrices preparadas con los diferentes adherentes al 5 y 10%. Un ensayo testigo se realizó por adición directa del edulcorante (0,2 g de rebaudiósido A) a los 50 g de yerba mate.

Determinación del rebaudiósido A y de sólidos solubles

La determinación del rebaudiósido A se efectuó por cromatografía líquida HPLC (Kolb 2001): una alícuota centrifugada de cada fracción del extracto se inyectó en un cromatógrafo Shimadzu LC-20 AT prominiense equipado con columna zorbax amino de 4,6*250mm (5 micras) y detector UV de arreglo de diodos. La concentración se determinó por el método de patrón externo a 210 nm utilizando como fase móvil acetonitrilo:agua en proporción de 80:20 en volumen y pH 5.

Los sólidos solubles totales extraídos se obtuvieron trasvasando una alícuota del extracto a un pesafiltro de peso conocido. El material se llevó a estufa hasta peso constante (aproximadamente 24 h) y la cantidad de sólidos solubles se determinó por diferencia de peso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 2** muestra los valores medios obtenidos de la concentración del edulcorante en función del volumen de extracción en las diferentes experiencias. En todos los casos las concentraciones del edulcorante fueron disminuyendo al incrementarse el volumen extraído. La concentración más alta se logró en los primeros 100 ml en la experiencia 1, donde el agregado de Rb se realizó en forma directa. Se observó una disminución apreciable de la cantidad de edulcorante extraída cuando se empleo una matriz en cuya formulación se incluyo una sustancia adherente. Este comportamiento justificaría el uso de la misma para entrampar al compuesto y controlar su liberación durante el consumo del mate.

Tabla 2. Valores medios de rebaudiósido A (g/l) en función del volumen de extracción.

Experiencia	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
Agregado directo	0,75	0,28	0,18	0,12	0,06
Polvo con 5% de GA	0,55	0,30	0,17	0,10	0,06
Polvo con 10% de GA	0,46	0,26	0,16	0,10	0,08
Polvo con 5% de AM	0,48	0,29	0,17	0,10	0,08
Polvo con 10% de AM	0,45	0,23	0,15	0,10	0,07
Polvo con 5% de MDx	0,43	0,30	0,19	0,12	0,08
Polvo con 10% de MDx	0,36	0,24	0,18	0,12	0,08
Polvo sin aglomerante	0,67	0,36	0,18	0,10	0,08

El polvo de yerba mate sin aglomerante presentó un valor intermedio (experiencia 8).
En las alícuotas siguientes, las diferencias no fueron tan acentuadas. En las **Figuras 1** y **2** se puede ver las variaciones de concentración del rebaudiósido A en función del volumen de extracción para los dos niveles de concentración de aglomerante, 5% y 10% respectivamente.

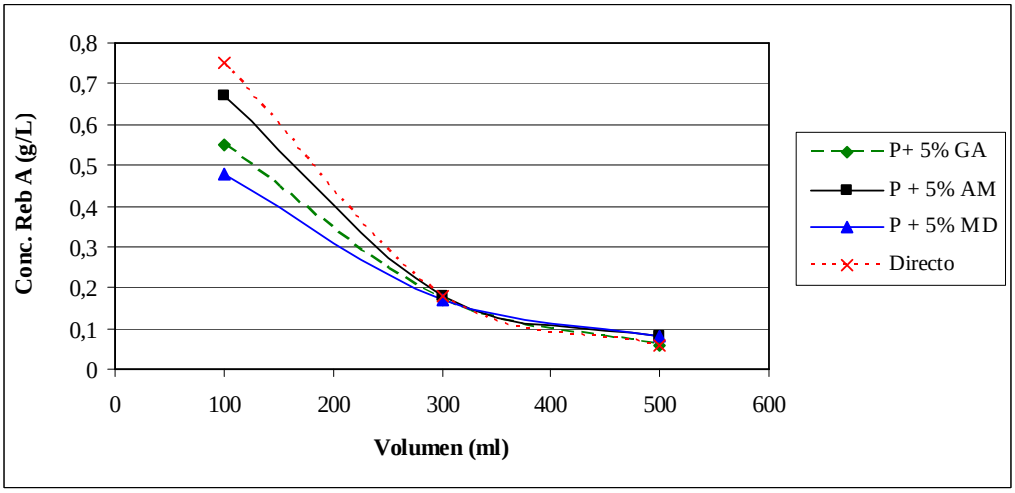


Figura 1. Concentración de rebaudiósido A extraída durante una mateada (matrices con 5% de aglomerante).

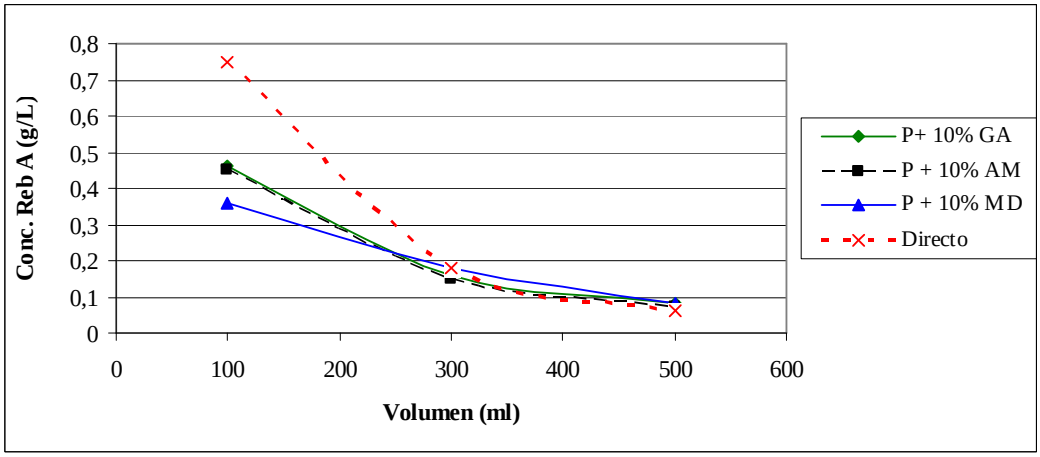


Figura 2. Concentración de rebaudiósido A extraída durante una mateada (matrices con 10% de aglomerante).

Al comparar las distintas matrices se puede observar que existen escasas diferencias en la cantidad extraída del edulcorante en los primeros 100 a 200 ml al variar el porcentaje y tipo de aglomerante. A partir de los 300 ml de extracción estas diferencias no son apreciables.
Un modelo que describe el comportamiento de variables que se acercan asintóticamente a un valor máximo, es el modelo de Pilosof *et al.* (1985) dado por la ecuación 1.

$$p = \frac{av}{b+v} \qquad (1)$$

Esta ecuación se adapta muy bien para explicar la extracción de los solubles en yerba mate (Sabbatella *et al.* 2004), donde **p** representa el peso en g del soluto extraído, **υ** es el volumen extraído en cada fracción en ml, **a** es una constante que proporciona el peso total en g del soluto extraído y **b** es otra constante que da el volumen en ml necesario para extraer la mitad del soluto.
Los valores de las constantes **a** y **b** obtenidos para las diferentes experiencias se pueden observar en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Constantes del modelo de Pilosof.

Experiencia	a	b
Agregado directo	0,179	142,0
Polvo con 5% de GA	0,166	193,6
Polvo con 10% de GA	0,156	237,1
Polvo con 5% de AM	0,166	238,5
Polvo con 10% de AM	0,142	218,1
Polvo con 5% de MDx	0,186	318,0
Polvo con 10% de MDx	0,174	377,2
Polvo sin aglomerante	0,179	142,0

El valor mas bajo de **b** se registró en la experiencia 1, indicando que el agregado en forma directa del Rb permite una salida más rápida durante la mateada. Un comportamiento opuesto se obtuvo con el uso de una matriz constituida con polvo de yerba mate y 10% de maltodextrina, donde **b** presentó el valor mayor, indicando que la matriz libera en forma controlada al edulcorante. La **Figura 3** muestra el ajuste de los datos experimentales al modelo planteado (en todos los casos P<0,001). En la misma se representa la liberación del Rb desde las muestras que contenían matrices preparadas con un 5% de aglomerante. Un comportamiento similar se observó durante la extracción desde las muestras que contenían matrices con 10% de adherente. La cantidad de edulcorante que se extrajo con los 500 ml utilizados en la mateada, en ningún caso alcanzó la cantidad de 0,20 g inicialmente añadida. Esta diferencia se puede deber a que parte del edulcorante queda retenida en la matriz sólida o que una cantidad disuelta del mismo se encuentra en el agua que mantiene húmeda a la yerba mate. La **Figura 4** muestra la diferencia en la velocidad de extracción del Rb al emplear concentraciones del 5 y 10% de maltodextrina en la formulación de la matriz. La velocidad es menor cuando se utiliza un 10% de aglomerante. Las matrices formuladas con almidón y goma arábiga presentaron un comportamiento similar cuando se incrementó su concentración del 5% al 10%.

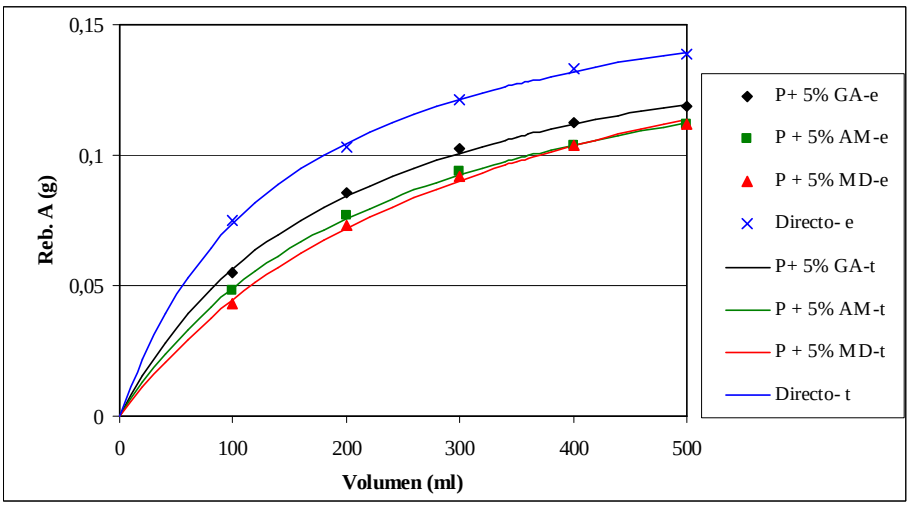


Figura 3. Peso acumulado de rebaudiósido A extraído durante una mateada (matrices con 5% de cada aglomerante, -e: datos experimentales, -t valores teóricos).

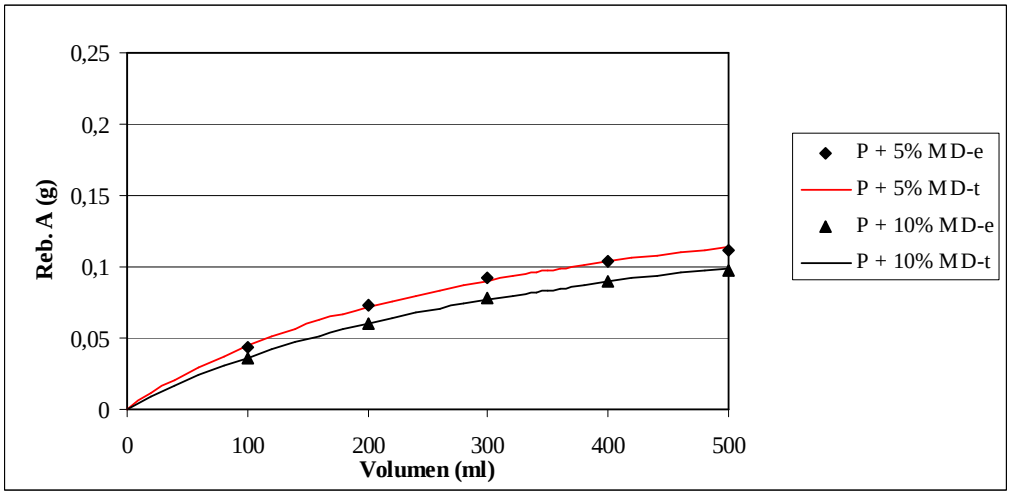


Figura 4. Peso acumulado de rebaudiósido A extraído durante una mateada (matrices con maltodextrina, -e: datos experimentales, -t valores teóricos).

La **Tabla 4** lista los valores medios de la cantidad de sólidos solubles extraídos en las diferentes alícuotas de 100 ml. En las **Figuras 5** y **6** se puede observar la disminución de la cantidad de solubles extraídos con el incremento del volumen de extracción. En el transcurso de una mateada, los primeros mates (aproximadamente 30 ml cada uno) tienen una concentración elevada de solubles (entre 5,25 y 7,48 g/100 ml) que luego disminuye con los sucesivos mates hasta valores de 1 g/100 ml al finalizar la mateada (500 ml). Estos resultados fueron similares a los reportados por Sabbatella *et al.* (2004).

Tabla 4. Valores medios de sólidos solubles (g) en función del volumen de extracción.

Experiencia	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
Agregado directo	5,77	3,12	2,19	1,51	1,07
Polvo con 5% de GA	7,48	4,37	2,43	1,36	0,86
Polvo con 10% de GA	6,20	4,00	2,45	1,06	0,94
Polvo con 5% de AM	6,54	3,92	2,05	1,19	0,77
Polvo con 10% de AM	7,10	3,85	1,86	1,14	0,80
Polvo con 5% de MDx	5,25	3,85	2,45	1,58	1,09
Polvo con 10% de MDx	5,93	3,53	2,09	1,38	0,91
Polvo sin aglomerante	4,86	3,18	2,24	1,55	0,98

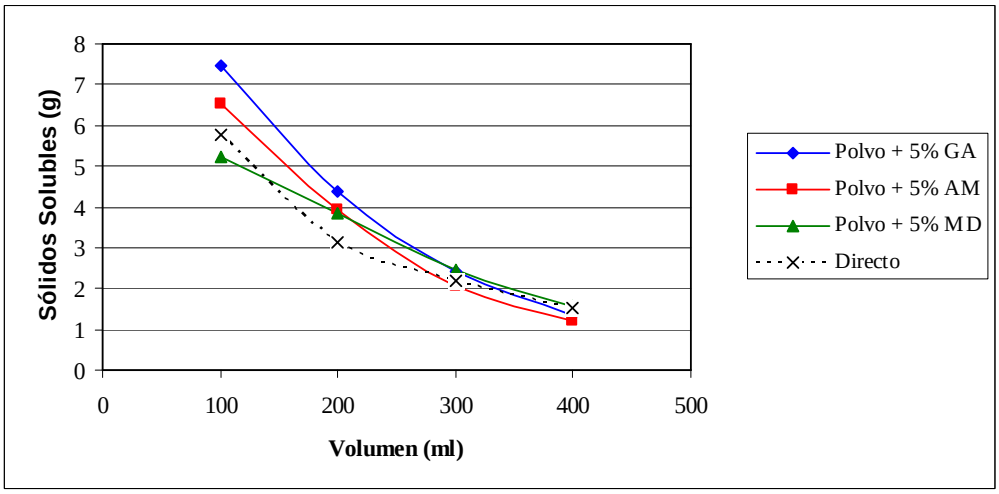


Figura 5. Concentración de sólidos solubles (g) extraídos durante una mateada (matrices con 5% de cada aglomerante, -e: datos experimentales, -t valores teóricos).

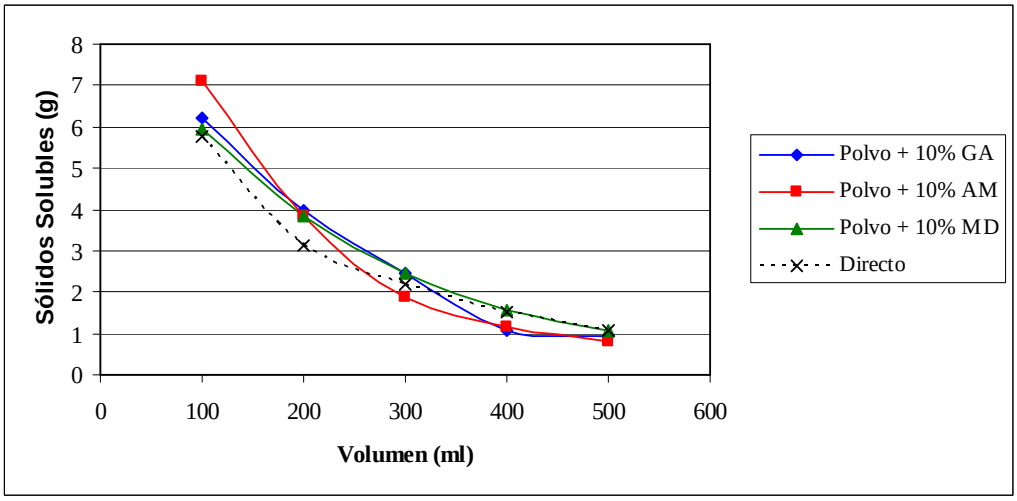


Figura 6. Concentración de sólidos solubles (g) extraídos durante una mateada (matrices con 10% de cada aglomerante, -e: datos experimentales, -t valores teóricos).

Al estudiar la velocidad de salida del edulcorante también es importante considerar la cantidad de sólidos solubles extraídos. Esta fracción contiene compuestos solubles en agua, siendo muchos de ellos los responsables del sabor amargo. El amargor interfiere con el sabor dulce del edulcorante agregado, por lo que resulta conveniente considerar la relación entre la cantidad de edulcorante y la cantidad de solubles extraídos. Esto estaría relacionado con el grado de dulzura que se percibiría dado que los componentes de impacto sensorial serían los de la yerba mate y no el rebaudiósido A. En la **Tabla 5** se puede observar que la relación presentó escasas variaciones en las distintas experiencias en las que se utilizaron aglomerantes para formular las matrices. Esto se puede considerar un factor determinante para el agregado de los mismos. Las pequeñas diferencias que se tienen entre los diferentes aglomerantes se deberían tanto a la variación de la concentración del edulcorante como a la de los solubles por efecto de la estructura del aglomerante.

Tabla 5. Relación rebaudiósido A/ sólidos solubles (g/g) en función del volumen de extracción.

Experiencia	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
Agregado directo	0,0130	0,0090	0,0082	0,0079	0,0056
Polvo con 5% de GA	0,0074	0,0070	0,0070	0,0074	0,0070
Polvo con 10% de GA	0,0074	0,0065	0,0065	0,0094	0,0085
Polvo con 5% de AM	0,0073	0,0074	0,0083	0,0084	0,0103
Polvo con 10% de AM	0,0063	0,0060	0,0081	0,0088	0,0088
Polvo con 5% de MDx	0,0082	0,0078	0,0078	0,0076	0,0073
Polvo con 10% de MDx	0,0061	0,0062	0,0073	0,0076	0,0073
Polvo sin aglomerante	0,0138	0,0113	0,0080	0,0065	0,0056

CONCLUSIONES

La utilización de diferentes adherentes (goma arábiga, almidón de mandioca y maltodextrina) en la formulación de una matriz de polvo de yerba mate no modificó apreciablemente la velocidad de salida del edulcorante entrampado. En todos los casos la velocidad de extracción fue menor que al añadir el edulcorante en forma directa o utilizar polvo de yerba mate como componente único de la matríz. Al incrementarse la cantidad de aglomerante del 5% al 10%, la velocidad de salida del edulcorante y los solubles disminuyó. La relación entre las concentraciones del rebaudiósido A y de sólidos solubles se mantuvo casi constante en función del volumen de extracción, independientemente del aglomerante utilizado. La elección de la formulación de la matriz se realizo comparando las constantes obtenidas al ajustar los valores experimentales al modelo de Pilosof. Con este criterio la matriz formada con polvo de yerba mate y maltodextrina al 10% resulto la más adecuada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IRAM 20540-1. 1997. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Materiales y procedimientos a utilizar en la determinación de los caracteres organolépticos de la yerba mate, bajo forma de mate.

Kolb N, Herrera JL, Ferreyra DJ, Uliana RF. 2001. Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from Stevia Rebaudiana: Improved HPLC Method. J. Agric. Food Chem 49:4538-4541.

Montgomery DC, Runger GC. 1994. Applied Statistics and Probability for Engineers. John Wiley & Sons Inc, pp. 440.

Pua CK, Sheik A, Hamid N, Rusul G, Rahman R. 2007. Production of drum-dried jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) powder with different concentration of soy lecithin and gum Arabic. Journal of Food Engineering 78: 630-636.

Pilosof AMR, Boquet R, Bartholomai GB. 1985. Kinetics of water uptake by food powders. Journal of Food Science 50:278-283.

Ramallo AL, Schmalko ME, Känzig RG. 1998. Variación de la concentración de ácido ascórbico (Vitamina C) en el procesamiento de la Yerba Mate. Revista de Ciencia y Tecnología 1:25-29.

Sabatella P, Pokolenko JJ, Schmalko ME. 2004. Estudio de la velocidad de extracción de solubles en mezclas de Yerba Mate. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba.

Secouard S, Málica C, Grises M, Decroix B. 2003. Release of limonene from polysaccharide matrices: viscosity and synergy effect. Food Chemistry 82:227-234.

Terta M, Blekas G, Paraskevopoulou A. 2006. Retention of selected aroma compounds by polysaccharide solutions: A thermodynamic and kinetic approach. Food Hydroicolloids 20:863-871.

Yoshii H, Soottitantawat A, Liu X, Atarashi T, Furuta T, Aishima S, Ohgawara M, Linko P. 2001. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2:55-61.

Asociación entre comportamiento molinero y características físicas del grano

Relationships between milling efficiency and physical grain traits

Sempé ME(1), Rumbo MM(1*), Cardós MJ (1,2), Puppo MC (1,3)

(1)Fac. Cs. Agrarias y Forestales- U.N.L.P, (2) S.A. Miguel Campodónico Ltda., (3) CONICET, (*ahora en fyo.com, corredora de cereales), Argentina
mesempe@gmail.com

RESUMEN

La calidad del grano de trigo es un factor de suma importancia al momento de determinar el destino de este cereal. Actualmente el consumo interno anual argentino ronda los 6 millones de tn de trigo, casi en su totalidad para la industria molinera que se abastece por el Artículo 12 correspondiente a la Norma de Calidad XX del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Al referirse a la calidad del trigo hay dos tipos de parámetros, aquellos denominados como características físicas del grano, que en general influyen sobre el rendimiento industrial del mismo y otros parámetros que hacen referencia al tipo y calidad de productos que se pueden obtener con la harina que se extrae de un trigo. A pesar de los adelantos tecnológicos incorporados a la industria, la molienda de trigo sigue teniendo una cuota muy alta de artesanía y empirismo. El comportamiento molinero incluye fundamentalmente el rendimiento en harina de determinado grado, pero también algunas características de los granos que permiten evaluar y predecir más cabalmente el proceso de molienda. El objetivo de este trabajo es establecer una aproximación de las asociaciones entre caracteres físicos de grano que contribuya al conocimiento y evaluación de la calidad del trigo, especialmente en su aspecto molinero. Para ello se analizaron 85 muestras de trigo pan y se realizaron pruebas de correlación y regresión lineal simple mediante la utilización del programa StatGraphics que permitieron establecer un aproximado de las asociaciones o relaciones existentes entre variables tales como peso hectolítrico, peso de mil granos, cenizas en grano, cenizas en harina con el rendimiento en harina. En función de los resultados alcanzados se puede establecer que es válido considerar al peso hectolítrico y al peso de mil granos como estimadores del posible rendimiento molinero y que éste condiciona el contenido de cenizas de la harina.

ABSTRACT

In Argentine, wheat is used for breadmaking in the internal market. Talking about milling efficiency, flour yield is the most important fact, although some physical grain traits are considered to predict milling performance. The aim of this work was to provide some relationships about physical grain traits to increase milling behaviour knowledge. A set of 85 wheat samples were analyzed. Test weight, 1000-grain weight, grain and flour ash content, grain protein content, gluten content and flour yield were determined; correlation values were obtained. Results showed that test weight and 1000 –grain weight are useful to predict potential flour yield and this one is associated with flour ash content.

PALABRAS CLAVE: *trigo, molienda, extracción de harina.*

KEYWORDS: *wheat, milling, flour yield.*

INTRODUCCIÓN

La producción nacional promedio de trigo para el quinquenio 03/07 fue de 14.700.000 de tn. En los últimos 35 años, el consumo interno anual ha pasado de 3,55 millones en 1974 a 5,86 millones en el 2007, que se destinan casi en su totalidad a la industria molinera. En este período, el consumo de harina per capita/año ha disminuido de 100 kg a 87 kg, produciéndose un aumento en las exportaciones anuales del 3% al 22%. Brasil, principal comprador del saldo exportable de grano, es

también el primer destino de las exportaciones de harina con el 65% (años 03/07), seguido por Bolivia con el 25% (Federación Argentina de la Industria Molinera, 2008).

Argentina es el único exportador importante de trigo que no clasifica su producción por calidad y sólo se enmarcan las partidas del cereal bajo la denominación de "trigo pan" cuya exigencia mínima es establecida por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) a través de la Norma de Calidad XX correspondiente a la Resolución 557/97 de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) y asegurada por el estándar comercial que debe ser no inferior al Grado 3.

Actualmente existe el "Programa Nacional de Calidad de Trigo" (PRONACATRI), creado por la Resolución 334/2003 de la SAGPyA. El objetivo central del mismo consiste en identificar las exigencias de calidad de la demanda externa e interna a través del análisis de la posible provisión de trigos diferenciados para estos destinos. Además, a partir de la Resolución 1262/2004, este programa ha introducido una serie de modificaciones en las tolerancias para ciertos parámetros del estándar de comercialización, tales como granos quebrados y/o chuzos, materias extrañas y rangos de proteína. Sin embargo la exportación de trigos de calidad superior representa un desafío para el sector triguero argentino.

El mercado interno esta constituido principalmente por la industria molinera que se abastece por el Artículo 12 correspondiente a la Norma de Calidad XX de la SENASA. Este artículo establece que se consideran fuera de grado aquellas partidas de trigo cuyo gluten no muestre capacidad de ligar durante el amasado o lavado, determinado por el sistema Glutomatic u otro método equivalente.

Al referirse a la calidad del trigo es necesario considerar dos tipos de parámetros. Por un lado aquellos denominados como características físicas del grano y que en general influyen sobre el rendimiento industrial del mismo, o sea el porcentaje de extracción de harina que se puede lograr en un molino. Entre estos pueden mencionarse peso hectolítrico, peso de 1000 granos, contenido de cenizas, presencia de granos dañados, helados, chuzos e impurezas. Asimismo, existen otros parámetros que hacen referencia a que tipo de productos y de que calidad se pueden obtener con la harina que se extrae de un trigo, es decir si se la puede destinar a la fabricación de pan, pastas, galletitas u otros productos.

La calidad final de un trigo está regida fundamentalmente por los efectos conjugados de diversos factores tales como aspecto varietal o genético, condiciones climáticas, prácticas de manejo del cultivo (fecha y densidad de siembra, control de malezas, plagas y enfermedades, uso de semilla fiscalizada, etc.) fertilización y manejo poscosecha del grano.

En 1998, el Comité Técnico de Cereales de Invierno (CCI), asesor de la Comisión Nacional de Semilla (CONASE) de la SAGPyA, procedió a asociar las variedades en grupos de calidad de acuerdo a las similitudes en su calidad industrial, lográndose una tabla única común para todas las subregiones trigueras. El Comité de Cereales de Invierno clasifica a los cultivares a medida que van siendo liberados y los obtentores ofrecen una amplia gama de variedades de trigo con calidades significativamente diferentes.

Las condiciones climáticas influyen directa e indirectamente sobre el comportamiento molinero. Así, las intensas precipitaciones al momento de cosecha causan el lavado del grano que afecta el peso hectolítrico pero no el gluten ya que las proteínas que forman este último son insolubles en agua (Polidoro *et al.* 2004). Las heladas tardías varían sus efectos según el estado fenológico del cultivo, en prefloración, floración y post fecundación pueden causar importantes mermas en el rendimiento. Cuando el grano está en estado lechoso resultan afectadas las propiedades físicas y químicas del mismo. En esta misma etapa, si el daño sobre el cultivo es intenso se puede producir la pérdida total del valor industrial del grano de trigo (Sempé *et al.* 1994).

La presencia de *Fusarium graminearum* con un 10% de infección afecta peso hectolítrico, peso de 1000 granos y contenido de cenizas y con porcentajes de infección mayores al 15% también sufren alteración la fuerza panadera, la estabilidad de la masa, la absorción de agua y el volumen de pan (Cuniberti 1999).

Los suelos de la región triguera argentina aportan bajo sus condiciones climáticas particulares, calcio, magnesio y fósforo, lo que resulta favorable desde el punto de vista agronómico aunque poco conveniente para la industria molinera (Tombetta *et al.* 1986).

Las variedades de grano pequeño presentan tendencia a dar altos valores de cenizas y no es posible uniformar el contenido mineral por selección de variedades dado que el ambiente resulta dominante (Cuniberti 2001).

A pesar de los adelantos tecnológicos incorporados a la molinería, tales como el mayor número de vueltas a los que trabajan los equipos, la mayor compacidad en los diseños, la inclusión de máquinas auxiliares más eficientes, la incorporación de aire en los sistemas de limpieza y la automatización de todas las instalaciones, la molienda de trigo pan sigue teniendo una cuota muy alta de artesanía y empirismo.

El comportamiento molinero incluye fundamentalmente el rendimiento en harina de determinado grado, pero también algunas características de los granos que permiten evaluar y predecir más cabalmente el proceso de molienda (Zeleny 1978). Asimismo hay que considerar que el sistema de producción de harina empleado afectará la composición química de las fracciones (Gómez Pallarés *et al.* 2007), las características funcionales de las harinas e incluso la valoración sensorial de los productos que de ellas se obtengan (Kihlberg *et al.* 2004). El estudio de las fracciones de molinería ha permitido establecer la influencia de tres aspectos importantes: las propiedades mecánicas de las capas externas del grano que condicionan el tamaño de partícula del salvado, la facilidad para reducir el endosperma a harina, que depende de la dureza y también de la vitriosidad, y la habilidad con que se pueda separar el endosperma almidonoso de las capas exteriores para controlar el remanente de almidón en el salvado (Abecassis *et al.* 2007).

Los rendimientos de harina, su ceniza o blancura y su calidad final dependen en buen grado del ajuste que el molinero efectúe en distintos puntos de los diagramas, guiado por su experiencia y confirmado por análisis posteriores de control de calidad.

Si se asume como hipótesis que existen asociaciones entre algunos caracteres físicos de grano que permiten inferir el comportamiento molinero del trigo, también es dable considerar que las relaciones o asociaciones existentes entre dos o más caracteres pueden variar año tras año en función de los parámetros que influyen sobre la calidad del trigo. Así, sería lógico encontrar vinculaciones positivas entre peso hectolítrico y rendimiento en harina, peso de mil granos y rendimiento en harina y cenizas de harina y rendimiento molinero, mientras que debería ser negativa la existente entre humedad en grano y rendimiento en harina (en moliendas sin acondicionar).

El objetivo de este trabajo es establecer una aproximación de las asociaciones entre caracteres físicos de grano que contribuya al conocimiento y evaluación de la calidad del trigo, especialmente en su aspecto molinero, teniendo en cuenta la importancia de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las determinaciones se realizaron sobre un total de 85 muestras de trigo cedidas gentilmente por el molino Miguel Campodónico S.A. y los resultados obtenidos se refieren a HR base 13,5%.

Las muestras se conservaron en bolsas individuales de 200 g, se almacenaron en heladera a 8 *ºC* a fin de evitar cualquier alteración en el grano que pueda ocasionar modificaciones en los resultados.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata y en el laboratorio del Molino Miguel Campodónico S.A.

Los datos se analizaron mediante la utilización del programa StatGraphics 5.1, se realizaron análisis de correlación y regresión lineal simple entre los parámetros determinados.

Determinaciones en grano

Se realizaron las siguientes determinaciones: Peso hectolítrico (Res. SAGPyA 557/97), peso de 1000 granos (IRAM 15853), contenido de humedad (IRAM 15850), porcentaje de cenizas (IRAM 15851), porcentaje de proteínas (IRAM 15852) y rendimiento en harina. Para rendimiento en harina se usó el molino Brabender Quadrumat Jr. utilizado en trigo bajo especificaciones del fabricante. Previamente se acondicionaron las muestras de trigo a 15,5% de humedad y 24 hs de reposo. El objetivo del acondicionamiento fue mejorar el tratamiento del grano durante el proceso de molienda, facilitando la separación pericarpio - endosperma como así también favorecer el pulverizado de éste último.

Determinaciones en harina

Se realizaron las siguientes determinaciones: Contenido de humedad (IRAM 15850), porcentaje de ceniza (IRAM 15851) y de gluten (IRAM 15864).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen algunas relaciones entre ciertas características físicas del grano de trigo y el comportamiento en la molienda que pueden ser orientativas de los resultados a lograr con una determinada mezcla de trigos. Las asociaciones que con mayor frecuencia se tienen en cuenta son las que existen entre rendimiento de harina con peso hectolítrico, peso de mil granos y cenizas de harina. También se consideran proteína - gluten y cenizas de trigo - cenizas de harina.

El contenido de humedad del grano se debe considerar como un elemento de uso comercial, como un indispensable referente de condición de almacenamiento y como un valor base (usualmente 13,5% o sobre sustancia seca) para la comparación con otros componentes. Además, adquiere significancia en el proceso de molienda para regular el acondicionamiento del trigo. El objetivo del acondicionamiento es mejorar el estado físico del trigo a moler y consiste en dosificar la humedad en el grano y dejarlo reposar para que ese contenido se distribuya uniformemente en la masa y en cada uno de los granos. De esta manera se consigue optimizar el proceso, haciendo el salvado más laminable y el endosperma más pulverizable, facilitando la separación. El acondicionamiento varía en función de los tipos de trigo, los sistemas de trabajo y los diagramas de proceso (Jones y Campbell 1953, Katz *et al.* 1961, Campaña *et al.* 1989, Cardós *et al.* 1994).

En este trabajo, el promedio de las muestras resultó algo más bajo que la media nacional, 13,1% vs 13,9% (Informe de Cosecha, Granotec 2008) y todas las muestras estuvieron por debajo de 15,5%, por lo que fue necesario adicionar agua para acondicionarlas.

Los valores de peso hectolítrico encontrados en este trabajo (**Tabla 1**) se pueden calificar como buenos, con el 68% de las muestras en grado 1 (base 79 kg/hl) y el 47% con valores superiores a los 80 kg/hl y un promedio de casi 80 kg/hl (79,92) cuando la media nacional del quinquenio 04/ 08 es 80,6 (Informe de Cosecha, Granotec 2008,o.c.).

El peso hectolítrico, tomado como lo que pesa un determinado volumen de grano, e independientemente de las unidades consideradas es un criterio ampliamente usado como indicador del comportamiento molinero y hace muchísimo tiempo que se emplea como tal (Mangels y Sanderson 1925). Es sabido que, además, el peso hectolítrico resulta de importancia al momento de establecer la calidad comercial del trigo, fijar el precio y estimar capacidades de almacenamiento. Dicho parámetro es influenciado por numerosos factores que inciden en él en forma directa o indirecta tal como la variedad, las condiciones de crecimiento, cosecha y conservación y la limpieza y preparación de la muestra. Así, el peso hectolítrico resulta de la combinación física de la compactación y los espacios vacíos entre los granos y a esta combinación contribuyen la superficie, forma, coeficiente de frotamiento, volumen, estructura y densidad de los granos, influenciados por la humedad y la presencia de impurezas y el método o protocolo usados para su determinación (Gañet Fito 2008).

Tal como se esperaba, y vulgarmente se relaciona, el peso hectolítrico mostró asociación positiva con rendimiento de harina (**Tabla 2**). Esta condición había sido establecida por Mangels y Sanderson 1925 (o.c) durante las campañas 1916 a 1925, por Shuey (1960), quien analizó 287 muestras de trigos provenientes de las cosechas 1949 a 1954 y por Cardós *et al.* (1990), trabajando con 950 muestras de las cosechas 1986 a 1989.

Considerando la multiplicidad de factores que condicionan el peso hectolítrico, se analizó el peso de mil granos como otra probable estimación predictiva del rendimiento en harina.

Los valores de peso de mil granos hallados en este trabajo (**Tabla 1**) se pueden considerar como muy buenos, con el 32% de las muestras por encima de los 40 g y un promedio de 38,96 g que resulta 8% superior a media nacional del quinquenio 04/ 08 que es de 36,12 g (Informe de Cosecha, Granotec 2008,o.c.). Este parámetro y los valores de peso hectolítrico hallados, estarían indicando la ausencia de granos defectuosos o chuzos en las muestras consideradas.

Se encontró asociación positiva entre peso de mil granos y rendimiento en harina (**Tabla 2**), aunque no con mayor intensidad que la establecida con peso hectolítrico.

Contrariamente, Johnson y Hartsing (1963) y Baker y Golumbic (1970) establecieron que el peso de los granos era un indicador más ajustado que el peso hectolítrico en la predicción del rinde molinero cuando se trataba de trigos duros.

Wiersma *et al.* (2001) registraron luego de 8 ciclos de selección recurrente, un mayor rendimiento en harina como resultado del incremento en el peso y tamaño de los granos. Hlynka y Bushuk (1959)

encontraron que entre los distintos elementos estudiados, el peso de los granos tenía mucha menor importancia que la densidad, la forma y la uniformidad de forma y tamaño.
Cuando se analizaron trigos blandos, la asociación entre peso de los granos y rendimiento en harina desapareció (Barmore y Bequette 1965, Yamazaki y Briggle 1969). Schuler *et al.* 1995 tampoco encontraron asociación con peso hectolítrico ni aún en aquellas muestras en las que se habían quitado los granos chuzos.
El contenido de cenizas de los trigos varía entre 1,3% y 2,5%, con una influencia importante de la zona de cultivo (Hartlein 1958 y Cuniberti 2001). Asimismo, existe una relación apreciable entre este contenido, el rango de extracción de harina, el color de la misma y su contenido en cenizas (Ziegler y Greer 1978, Oliver *et al.* 1993). En el grano, el contenido de cenizas aumenta desde el centro (0,36 a 0,45%) hacia la parte periférica (0,5 a 1,5%) hasta 10 a 12% en las cáscaras puras (Willm 1993). La determinación de cenizas es una herramienta importante para establecer el rendimiento harinero de un trigo en la molienda. En la parte central del grano (endosperma) el contenido mineral es menor incrementándose hacia las partes externas del mismo. (Cuniberti *et al.* 1997). En Argentina, como en otros muchos países, hay una tipificación de harinas basada en el contenido de cenizas, aunque no existe una tipificación por color como la que aplica, por ejemplo, Brasil. Esto puede ser cuestionable desde el punto de vista nutricional, ya que una proporción importante de sustancias minerales e incluso vitaminas reside en las fracciones exteriores que salen como productos de cola en la molienda.
Si bien en general se asocia harinas más oscuras a mayores contenidos de ceniza, esto no necesariamente es así. Evers y McRitchie 2000 establecieron que la coloración es función de las fracciones de salvado involucradas y ello es especialmente notable cuando se trata de trigos perlados, con alto contenido en ceniza por la presencia de aleurona, pero blancas por la ausencia de epi y mesocarpio.
El grado de extracción varía en función de usos, costumbres y necesidades, pero mayores extracciones van acompañadas de tenores minerales más altos en las harinas obtenidas (Ziegler y Greer o.c., Campaña *et al.* 1986, Cardós *et al.* 1994, Osella *et al.* 2006)
En este trabajo los contenidos de ceniza en grano (**Tabla 1**) estuvieron por debajo de la media nacional para el quinquenio 04/08, 1,756% vs 1,849% (Informe de Cosecha, Granotec 2008, o.c.). Es probable que eso haya sido por la procedencia de las muestras, en forma casi exclusiva de las subregiones ecológicas II Sur y IV, caracterizadas por contenidos minerales menores a los de la zona centro y norte.
Cuando se analizan los grados de extracción y las cenizas de harina (**Tabla 1**), se encuentra que, para rendimientos iguales a los nacionales (61,95% vs 62%, Informe de Cosecha, Granotec 2008, o.c.), las harinas obtenidas en esta experiencia tuvieron porcentajes claramente superiores (0,634% vs 0,573%), lo que se explicaría por el más elemental sistema de limpieza y clasificación de fracciones del molino Brabender Quadrumat Jr. vs. el molino CD 1 Chopin empleado en el análisis de las muestras del informe de cosecha.
En la **Tabla 2** se presenta la correlación entre rendimiento en harina y contenido de cenizas de la misma y en la N° 3 los valores correspondientes a cenizas de trigo vs. cenizas de harina, que inexplicablemente no muestran asociación.
El contenido proteico es un factor primario en relación a la capacidad de uso de las harinas. Una clasificación simple de las proteínas se puede hacer en base a su solubilidad, aún reconociendo que cada grupo es muy heterogéneo y está compuesto por proteínas de distinta composición. La fracción insoluble es lo que habitualmente se conoce como gluten y la responsable de aptitudes y comportamientos de harinas y masas.
Normalmente existe una asociación firme entre contenido proteico y gluten (Kasarda *et al.* 1978, Chidichimo *et al.* 1998, Kohli *et al.* 1998) cuando se habla de trigos sin alteraciones y/o moliendas completas. Sin embargo, esta relación se puede ver alterada en granos deteriorados (Ferraggi *et al.* 1986), por grados de extracción variable (Tombetta y Cuniberti 1990) o si lo que se consideran son pasajes de molienda diferentes (Menkovska *et al.* 2002). En este trabajo, los contenidos de proteína determinados (**Tabla 1**) fueron algo superiores a la media nacional del quinquenio 04/08 (11,8% vs 11,4%). El 80% de las muestras dieron valores bonificables de acuerdo a la Norma XX de comercialización (contenidos proteicos mayores al 11% y pesos hectolítricos mayores a 75 kg.), el 14% habrían tenido descuentos del 2%, dos muestras habrían sido castigadas con un descuento del 3% y sólo una con 4% por resultar con un contenido inferior al 9%.

En relación al contenido de gluten (**Tabla 1**), la media fue mayor que el promedio nacional 27,7% vs. 26,7% (Informe de Cosecha, Granotec 2008, o.c.) En este sentido, se debe señalar que se incluyeron en el análisis, a fin de diversificar el muestreo, partidas que habitualmente son de rechazo en el molino, con contenidos de gluten de 21% - 22% o aún menos, por lo que se podrían presentar diferencias más pronunciadas entre trigo molinería y la media nacional que incluye acopios y exportadores.

Como era de esperar en este tipo de molienda integrada, no se presentó asociación entre tenor proteico o contenido de gluten con rendimiento molinero, pero sí una muy significativa asociación entre porcentajes de proteína y gluten (**Tabla 2** y **Tabla 3**).

Tabla 1. Análisis realizados sobre las muestras de trigo.

Muestra	PH	PMG	Cenizas Grano	Rdto. Harina	Cenizas Harina	Proteina	Gluten
986	82,5	44,45	1,732	62,1	0,6	11,8	29,1
1063	81,1	39,75	1,7	63,2	0,711	12,2	28,8
1059	83,2	39,36	1,822	65,5	0,692	11,6	26,1
956	78,5	38,97	1,731	60,8	0,616	11,4	27,9
1064	81,8	41,32	1,616	65,3	0,769	10,6	29,2
1040	81,9	41,56	1,691	66,5	0,651	13,2	29,9
1077	79,5	35,12	1,75	57,5	0,588	12,3	24,7
5251	78,6	36,17	1,619	60,3	0,698	12	30,5
1039	81,8	42,68	1,694	63,8	0,638	12,9	28,5
1060	78,2	30,96	1,705	59,3	0,681	11,2	22,1
937	79,1	39,48	1,737	62,3	0,635	12,6	27,6
936	78,9	38,65	1,798	62,8	0,693	12,5	27,8
1031	82,1	40	1,673	62,4	0,65	10,4	27,3
1042	81,4	44,51	1,638	63	0,617	15,8	30,8
1044	78,6	41,52	1,649	60,9	0,63	13,8	30,3
1049	79,1	41,12	1,712	61,1	0,648	12,7	27,1
1056	80,1	39,74	1,763	63	0,661	12	27,2
1047	79,9	38,25	1,695	60	0,619	15,2	37,1
998	78,4	39,2	1,567	63,5	0,595	12,4	27,5
996	78,6	36,95	1,554	64,3	0,657	12,6	27,6
1017	79,9	42,54	1,697	59,4	0,614	11,5	25,2
1045	76,2	36,68	1,543	56	0,675	14,7	30,6
1055	78,8	47,68	1,948	60,1	0,664	12,4	26,3
1018	79,4	40,52	1,741	64,8	0,707	12,6	26,9
1036	80,9	37,5	1,522	64,6	0,719	13,6	34,1
1010	78,4	37,09	1,544	62,6	0,744	13,5	25,6
1015	79,4	35,76	1,68	63,3	0,799	13,6	31,5
977	78,1	37,66	1,669	59,3	0,628	11,7	26,2
4	78,7	36,45	1,871	59,2	0,644	11	26,4
2367	80,7	41,25	1,756	64,7	0,705	10,4	25,7
2331	77,6	38,52	1,65	53,6	0,557	11,2	21,2
2300	79,1	36,03	1,546	58,3	0,637	9,5	26,1
2358	78,6	37,07	1,781	59,7	0,613	11,3	31,8
2357	79,1	37,9	1,838	60,3	0,7	11,4	28,1
2325	77	45,19	1,681	61,1	0,617	9,8	23,2
2337	77	36,83	1,593	61,1	0,565	8,5	22,7
2292	77,4	36,96	1,307	62,5	0,544	11,6	26,1
2349	78,1	38,16	1,563	62,7	0,632	10,3	21,3
2342	78,4	38,75	1,839	63,4	0,671	10	24,2
2333	77,8	38,48	1,975	61,5	0,734	10	23
2338	79,7	40,91	1,847	62,3	0,835	10,3	21,9
2339	78,6	41,75	1,858	63	0,731	10,3	21,4
2356	79,1	38,17	1,779	65,5	0,67	11,2	29,1

2334	78,9	36,42	2,002	63,6	0,712	11,1	27,5
2336	80,7	38,29	1,715	65,9	0,658	11	27,4
1	75,9	29,35	1,75	56,6	0,635	11,2	24,5
2343	81,1	40,74	1,523	60,6	0,606	11,5	25,6
3	80,5	39,61	1,625	60,8	0,599	12,4	32,6
2366	80,1	39,55	1,756	60,2	0,659	11,1	25,8
2341	79,9	35,02	1,65	55,9	0,563	10,9	26,2
2345	79,1	42,17	1,735	67,6	0,671	11,2	26,1
51	81,7	38,1	2,125	59,53	0,648	12,6	31,1
52	81,6	43,2	2,034	60,63	0,64	12,1	29,1
53	82	43,2	1,94	66,83	0,678	12,3	30,9
54	79,7	38,26	1,988	64,21	0,572	12,8	31,6
55	81,3	40,84	2,013	63,61	0,563	12,8	30,3
56	81,3	37,36	2,051	62,05	0,669	12,8	31,1
57	81,7	40,2	1,99	60,88	0,603	12	30,8
58	82,8	42,9	1,878	58,59	0,599	12,2	32,1
59	80,6	38,7	2,007	60,21	0,604	12,5	28,4
60	82,6	38,36	2,013	60,75	0,593	13	32,8
61	79,3	42,52	1,771	60,93	0,627	12,8	30,7
62	80,9	39,18	1,831	60,18	0,556	11,5	25,9
63	80,9	40,36	1,946	59,76	0,564	11,7	27,5
64	82,1	37,88	1,846	59,77	0,614	10,3	19,6
65	81,6	39,2	1,859	59,56	0,569	11,2	28,7
66	81,5	35,89	1,865	60,26	0,596	11,5	25,7
67	77,8	39,77	1,778	66,1	0,599	11,5	30,4
68	78,5	36,98	1,715	64,99	0,668	11,7	28,7
69	79,7	37,97	1,67	62,47	0,68	11,1	25,7
70	78,6	35,89	1,68	58,66	0,565	10,3	23,2
71	79,9	35,72	1,822	63,23	0,635	11,5	27,8
72	80,7	35,66	1,632	61,4	0,639	11,8	27,5
73	80,8	35,66	1,877	65,65	0,583	13,1	31,5
74	80,1	36,41	1,789	65,5	0,526	11,2	25,3
76	80,9	38,9	1,7	63,27	0,518	10,7	24,7
77	80,1	38,2	1,753	62,95	0,611	11,6	27,5
78	81,1	38,13	1,698	62,21	0,523	11,8	28,8
79	79,2	38,79	1,678	63,71	0,582	12,1	30
80	80,6	37,27	1,649	63,29	0,546	12,3	30,3
81	80,6	37,13	1,665	64,95	0,623	11,5	24,7
82	81,5	43,3	1,634	62,28	0,586	12,3	33
83	81,1	42,75	1,891	63,41	0,552	12,9	29,9
84	82,7	41,2	1,668	64,12	0,584	11,9	29,78
85	79,9	37,1	1,837	62,28	0,607	12,1	28,78

Tabla 2. Valores de correlación existentes entre rendimiento en harina y cada una de las demás variables determinadas.

	Rendimiento en Harina
peso hectolitrico	**r = 0,271**
	P = 0,0121
peso de mil granos	**r = 0,2507**
	P = 0,0207
cenizas de grano	**r = 0,0057**
	P = 0,9588
cenizas de harina	**r = 0,2247**
	P = 0,0387
proteina	**r = 0,0699**
	P = 0,5247
gluten	**r = 0,1998**
	P = 0,0668

Valor de Correlación
Valor de P

Tabla 3. Valores de correlación existentes entre cenizas de trigo y cenizas de harina y contenido proteico y de gluten

	cenizas de harina	proteina
cenizas de grano	**r = 0,0262**	
	P = 0,8119	
gluten		**r = 0,7033**
		P < 0.0001

CONCLUSIONES

Es válido considerar al peso hectolítrico como un estimador del posible rendimiento molinero. El peso de mil granos puede ser un elemento orientador del rendimiento molinero cuando se consideran trigos duros. El rendimiento molinero condiciona el contenido de cenizas de la harina. El sistema de molienda empleado en este estudio no altera la relación proteína/gluten. Sería interesante encarar estudios referidos a la asociación entre contenido de cenizas y coloración en las harinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecassis J, Bar Helgouach C, Dubat A, Greffeuille V, Lullien Pellerin V. 2007. Predicting the milling efficiency of wheat grain. International Conference on Cereals and Cereals Products Quality and Safety. Rosario, Argentina. pag. 93-95.

Baker D, Golumbic C. 1970. Estimation of flour yielding capacity of wheat. Citado por Zeleny L., 1978. Criteria of wheat quality. En Pomeranz Y. Wheat Chemistry and Technology. 2ª ed. St. Paul: AACC Inc. pag. 19-49.

Barmore MA, Bequette RK. 1965. Weight per bushel and flour yield of pacific northwest white wheat. Cereal Science, 10:72.

Campaña LE, Cardós MJ, Sempé ME. 1986. Comportamiento de variedades argentinas de trigo en la molienda experimental. I Congreso Nacional de Trigo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Tomo II: 215-229.

Campaña LE, Cardós MJ, Sempé ME. 1989. Acondicionamiento de una mezcla de trigo: Tiempo de reposo y comportamiento molinero. Revista de la Facultad de Agronomía UNLP,63:15-24.

Cardós MJ, Sempé ME, Chidichimo HO. 1994. Estudio comparativo de harinas de moliendas experimentales e industrial. III Congreso Nacional de Trigo. Bahía Blanca, Buenos Aires Argentina. pag. 56.

Cardós MJ, Califano AN, Campaña LE, Bevilacqua AE. 1990. II Congreso Nacional de Trigo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. pag. 105-108.

Cuniberti MB. 2001. Contenido de minerales de los suelos y su influencia en cenizas de trigo. V Congreso Nacional de Trigo. Córdoba, Argentina. pag. 9.

Evers T, McRitchie F. 2000. Ash, who needs it? World Grain June 2000: 56-63.

Federación Argentina de la Industria Molinera, 2008.www.faim.org.ar

Ferraggi A, Sempé ME, Cardós MJ. 1986. Detección de trigos dañados por calentamiento. I Congreso Nacional de Trigo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina, II: 56.

Gañet Fito, R. 2008. Factores tecnológicos que inciden en los resultados económicos y cualitativos de la operación de molienda. Seminario Baldem 2008, Tecnología Alimentaria, Guarner Argentina S.A., Universidad Argentina de la Empresa, Buenos Aires, Argentina.

Gómez Pallarés M, León AE, Rosell CM. 2007. Trigo. En León AE y Rosell CM. De tales harinas, tales panes. 1ª ed. Córdoba: Hugo Báez ed. pag. 17-71.

Granotec Argentina. 2008. Informe de Calidad de Cosecha de Trigo, XII Seminario Internacional sobre la Calidad del Trigo, Buenos Aires, Argentina.

Haertlein H. 1958. Tipificación de harinas. Informe interno Molinos Fenix. Rosario

Hlynka I, Bushuk W. 1959. The weight per bushel. Cereal Science, 4: 239.

Johnson RM, Hartsing TF. 1963. Kernel count as a measure of flour milling yield. Citado por Zeleny L., 1978. Criteria of wheat quality. En Pomeranz Y. Wheat Chemistry and Technology. 2ª ed. St. Paul: AACC Inc. pag. 19-49.

Jones CR, Campbell JD. 1953. Micro - determination of endosperm density as a means of mapping moisture distribution in wheat grain. Cereal Chemistry, 30: 177.

Kasarda DD, Nimmo CC, Kolher GO. 1978. Proteins and the amino acid composition of wheat fractions. En Pomeranz Y. Wheat Chemistry and Technology. 2ª ed. St. Paul: AACC Inc. pag. 227-299.

Katz R,Collins ND, Cardwell AB. 1961. Hardness and moisture content of wheat kernels. Cereal Chemistry, 38: 364.

Kihlberg I, Johansson L, Kohler A, Risvik E. 2004. Sensory qualities of whole wheat bread influence of farming system, milling and baking technique. Journal of Cereal Science, 39: 67-84.

Kohli MM, Peña RJ, Cuniberti MB. 1998. Calidad industrial y mejoramiento de trigo. IV Congreso Nacional de Trigo, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. pag. 65-69.

Mangels CE, Sanderson T. 1925. Correlation of test weight per bushel with flour yield and other factors of quality. Cereal Chemistry, 2:365.

Martínez F, Cordone G, García F. 2001. Azufre y otros nutrientes. Cuadernillo de Actualización Técnica Nro. 63. AACREA. Buenos Aires, Argentina.

Menkovska M, Knezevic D, Ivanovski M. 2002. Protein allelic composition, dough rheology and baking characteristics of flour mill streams from wheat cultivars with known and varied baking qualities. Cereal Chemistry, 79: 72.

Oliver JR, Blakeney AB, Allen HM. 1993. The colour of flour streams as related to ash and pigments contents. Journal of Cereal Science, 17: 169.

Osella CA, Sánchez HD, González RJ, de la Torre MA. 2006. Molienda de trigo: Ensayos comparativos de escala industrial con planta piloto. Información Tecnológica. Vol. 17,3: 33.

Polidoro O,García R, Annone JG, Calzolari A. 2004. Efecto de factores ambientales y sanitarios que afectan el peso hectolítrico del grano de trigo. VI Congreso Nacional de Trigo. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. pag. 306.

Schuler SF, Bacon RK, Finney PL, Gbur EE. 1995. Relationship of test weight and kernel properties to milling and baking quality in soft red winter wheat. Crop Science, 35:949.Sempé ME, Chidichimo HO, Cardós MJ, Arriaga HO. 1994. Trigo: Influencia de las heladas tardías sobre la calidad y los componentes del rendimiento. III Congreso Nacional de Trigo. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. pag. 119.

Shuey WC. 1960. A wheat sizing technique for predicting flour milling yield. Cereal Science Today, 5:71.

Tombetta EE, Cuniberti MB. 1990. Influencia de la extracción de harina en la evaluación de la calidad en los programas de mejoramiento genético de trigo. II Congreso Nacional de Trigo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. pag. 71-74.

Tombetta E, Cuniberti MB, Formica MB, Masiero B. 1986. Interacción genotipo - ambiente sobre la calidad del trigo pan. I Congreso Nacional de Trigo. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. II:163.

Wiersma JJ, Busch RH, Fulcher GG, Hareland GA. 2001. Recurrent selection for kernel weigh in spring wheat. Crop Science, 41: 999.

Willm C. 1993. Cuarto Curso Latinoamericano de Molinería. Centro de Estudios de Molinería y Panificación, Bolsa de Cereales, Federación Argentina de la Industria Molinera. Buenos Aires, Argentina.

Yamazaki WT, Briggle LW. 1969. Components of test weight in soft wheat. Crop Science, 9:457.

Zeleny L. 1978. Criteria of wheat quality. En Pomeranz Y. Wheat Chemistry and Technology. 2ª ed. St. Paul: AACC Inc. pag. 19-49.

Ziegle E, Greer EN. 1978. Principles of milling. En Pomeranz Y. Wheat Chemistry and Technology. 2ª ed. St. Paul: AACC Inc. pag. 115-185.

Adsorción en interfase aceite/agua y tamaño de partícula de sistemas acuosos de caseinato de sodio

Oil-water interfacial adsoprtion and particle size of sodium caseinate aqueous systems

Sosa-Herrera MG, Vargas-Consuelos CL, Casasola-Lozada SE, González-Sánchez J, Martínez-Padilla LP

Universidad Nacional Autónoma de México, FESC, Avenida primero de mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, C.P 54714, Estado de México, México.
lpmp@unam.mx

RESUMEN

El caseinato de sodio se emplea como ingrediente en una gran variedad de alimentos debido a que posee una actividad superficial. Durante la formación de emulsiones aceite en agua, las moléculas de esta proteína y sus agregados son rápidamente adsorbidos en la superficie del nuevo glóbulo de grasa formado. La capa formada en la interfase protege a los glóbulos contra la coalescencia, proporcionando estabilidad al sistema. El objetivo de este estudio fue analizar el tamaño de partícula (Zetasizer-nano, Malvern), así como la adsorción en interfase aceite agua (tensiómetro de gota colgante), de sistemas acuosos de caseinato de sodio a diferentes concentraciones (0,5, 1, 2 y 3%), modificando el pH (5,4 y 6,8) y el contenido de iones (0, 1 y 5 mM de $CaCl_2$). En general, para ambos valores de pH, se observó un aumento del tamaño promedio de partícula en función de la concentración de proteína lo que se atribuyó a una mayor asociación de submicelas. Bajo condiciones neutras y sin la adición de iones calcio, la distribución de tamaño de partícula del caseinato es polidispersa y similar a la informada para micelas de caseína, siendo reflejo de un sistema donde la asociación entre partículas se realiza sin un estricto empaquetamiento o limitaciones simétricas, característico de las moléculas de caseína, debido a la presencia de prolina que se encuentra repartida uniformemente, contribuyendo a la formación de una estructura sin orden estadístico. Al comparar los resultados a pH 6,8 y 5,4, se observó una marcada diferencia en la distribución de tamaño de partícula. De acuerdo con algunos autores, más que un efecto del pH, el cambio de tamaño de partícula es una consecuencia de la acción de los iones sodio (80 mM) presentes en el amortiguador acetato (pH 5,4). A pesar de que la adición de iones calcio en sistemas acuosos de caseinato de sodio promueve la asociación de submicelas, cuando la concentración de $CaCl_2$ aumentó, a 5 mM, se encontró disminución en el tamaño de partícula promedio, en comparación con las disoluciones de caseinato de sodio a 1 mM, e inclusive en comparación con las disoluciones de caseinato sin iones. En los resultados experimentales sobre la relación adsorción-tensión interfacial de los sistemas, se observó que la completa adsorción de caseinato para las condiciones empleadas, no es instantánea y se modifica con base en las condiciones establecidas, en donde todas las muestras alcanzan un estado de adsorción en equilibrio aproximadamente después de 200 s, con valores de tensión interfacial que oscilan entre 9 y 12 mN/m. Si bien no se aprecia efecto de la concentración de proteína sobre la tensión interfacial, ésta sí disminuyó con respecto a la concentración de iones calcio, lo que podría atribuirse a un cambio en el estado de agregación de las moléculas de caseína.

ABSTRACT

Sodium caseinate is commonly used as an ingredient in a wide range of food dispersions because of the surface active molecules. This protein adsorbs at fluid interfaces during emulsification when casein molecules and aggregates become rapidly associated with the surface of newly formed oil droplets. The casein layer protects droplets against immediate coalescence, and it confers long-term stability. In this study, the analysis of particle size distribution (Zetasizer nano, Malvern) and the interfacial adsorption of sodium caseinate was done as a function of protein concentration in aqueous solution (0.5, 1, 2 y 3% w/w), modifying pH (5.4, 6.8) and ions content (0, 1 y 5 mM de $CaCl_2$).

In general, the average size of particle was increased as a function of protein concentration, for both values of pH; this was attributed to a higher submicelle association. When comparing results at pH 6.8 and 5.4, it was observed a marked difference in particle size distribution. Some authors explain that the size modification was not consequence of pH; rather, an effect of sodium ions (80 mM) presents in the acetate buffer (pH 5.4). Normally, calcium addition to sodium caseinate dissolutions promotes submicelles association. However, when $CaCl_2$ concentration was increased, to 5 mM, the size distribution showed an increase in proportion of small particles inclusive in comparison with none added calcium ions. Experimental results concerning adsorption–interfacial tension of the systems showed that complete adsorption of caseinate for defined conditions was not immediate and it was modified by the established conditions. All samples reached an equilibrium adsorption state after 200s, and interfacial tension ranged between 9 and 12 mN/m. A clear effect of protein concentration was not observed when measured interfacial tension; nevertheless, this property was reduced when calcium concentration was increased, this could be attributed to a change of aggregation state of casein molecules.

PALABRAS CLAVE: *caseinato, tensión interfacial, tamaño de partícula.*

KEYWORDS: *caseinate, interfacial tension, particle size.*

INTRODUCCIÓN

En la industria de los alimentos se encuentran una gran cantidad de productos que son sistemas multi-fases los cuales poseen partículas finamente subdivididas y que se encuentran distribuidas en una fase líquida, sólida o gaseosa. Muchos de estos sistemas son inestables por naturaleza, por lo que necesariamente se requiere de agentes que ayuden al equilibrio y a la estabilización entre sus fases. En la actualidad cada vez es más frecuente el uso de proteínas que ayudan a lograr la estabilidad de estos sistemas reduciendo la tensión interfacial entre las fases.

Dentro de las proteínas con mayor aplicación en alimentos se encuentran los caseinatos que se definen como la mezcla soluble de las caseínas de la leche, la cual se obtiene mediante una precipitación ácida y posteriormente neutralizada con soluciones alcalinas de sodio, calcio o potasio, dependiendo del tipo de caseinato que se desee obtener. La superficie activa de las caseínas que lo conforman contiene grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en varias secuencias y proporciones, por lo que juntas, en caseinato de sodio, pueden adsorberse rápidamente en una interfase, proporcionando de esta forma estabilidad prolongada al sistema alimenticio en cuestión, debido a una combinación de estabilización electrostática y estérica (Dickinson y Davies 1999).

Se ha establecido en la práctica que existe un intervalo finito de concentraciones de caseinato que ofrecen estabilidad con respecto la inestabilidad de sistemas alimenticios dispersos. En emulsiones, por ejemplo, a bajas relaciones caseinato/aceite, hay insuficiente proteína presente para saturar completamente la interfase aceite-agua durante la emulsificación, y en consecuencia la emulsión resultante es inestable a la floculación por puenteo. Contrariamente, a altas relaciones caseinato/aceite, la presencia de excesos de proteína (no adsorbida) en forma de pequeños agregados de caseinato (submicelas) puede propiciar pobre estabilidad al cremado causando floculación por depleción. Una estabilidad óptima se alcanzará a concentraciones intermedias de caseinato de sodio, siendo suficiente para permitir la completa saturación de proteína actuando en la interfase aceite agua (Radford *et al.* 2004). Algunos autores (Dickinson *et al.* 2003, Carr *et al.* 2002) han reportado el efecto de iones sobre las propiedades del caseinato, destacando que el calcio iónico puede afectar las relativas proporciones y las propiedades de las proteínas adsorbidas y no adsorbidas de acuerdo a varios mecanismos. Iones calcio específicamente se unen a los residuos de fosfoserina sobre las caseínas, modificando de esta forma la distribución de carga molecular y las propiedades de adsorción.

Para su estudio existen diferentes métodos de aplicación para determinar las propiedades de superficie y adsorción de dichos sistemas, se destacan las pruebas de tensión interfacial dinámica, por tener un importante impacto sobre una gran cantidad de procesos tecnológicos, tales como el espumado y la emulsificación, dado que el proceso de formación y los mecanismos de estabilización y desestabilización están unidos a las propiedades interfaciales. Por lo que el objetivo de este estudio fue estudiar la tensión interfacial dinámica de sistemas acuosos de caseinato de sodio-aceite, a diferentes concentraciones, en función de la concentración de iones calcio y a diferente pH, además de

correlacionar la tensión interfacial con el tamaño de partícula en las diferentes disoluciones de caseinato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con caseinato de sodio, (Lactonat EN, lote No. 31023, Lactoprot, Alemania, donado por ADYFARM, S.A. de C.V.) con 5,63% ± 0,09 de humedad. Se utilizó cloruro de calcio ($CaCl_2$), grado analítico (Merck), agua desionizada y solución amortiguadora de acetato para el control y la variación del pH. Todas las concentraciones se expresan como porcentaje en peso sobre base seca.

Disoluciones de caseinato de sodio a 0,5, 1, 2 y 3% se prepararon adicionando la muestra en polvo en agua desionizada (pH 6,8) y otras con amortiguador acetato (pH 5,4), bajo agitación a 25 *ºC*, por 30 min. En los sistemas con iones (1 y 5 mM $CaCl_2$), éstos se disolvieron previamente a la adición de la proteína. Además se adicionó 0,03% de azida de sodio como conservador. Las muestras se dejaron reposar durante 24 h bajo refrigeración.

Tensión interfacial dinámica

Las mediciones de tensión interfacial dinámica se realizaron a 25 °C en un tensiómetro de gota colgante PAT-1 (Sinterface Technologies, Berlín, Alemania), en donde una gota de aceite se forma en la punta de un capilar. La silueta de la gota se monitorea con una cámara y se digitaliza. La imagen digital de la gota se graba conforme el tiempo transcurre y los parámetros característicos (volumen, área y tensión interfacial) se obtienen tras ajustar los perfiles de gota experimentales a la ecuación de capilaridad de Young-Laplace.

Tamaño y distribución de partícula

El diámetro promedio de partícula y la distribución de tamaños de los sistemas acuosos de caseinato de sodio se obtuvieron a 25 °C, empleando el Zetasizer Nano (Malvern, Instruments Ltd, Malvern, Worcester, UK).

Tratamiento estadístico

En todos los casos se realizaron las determinaciones por triplicado y los resultados se presentaron como el valor promedio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de tamaño de partícula

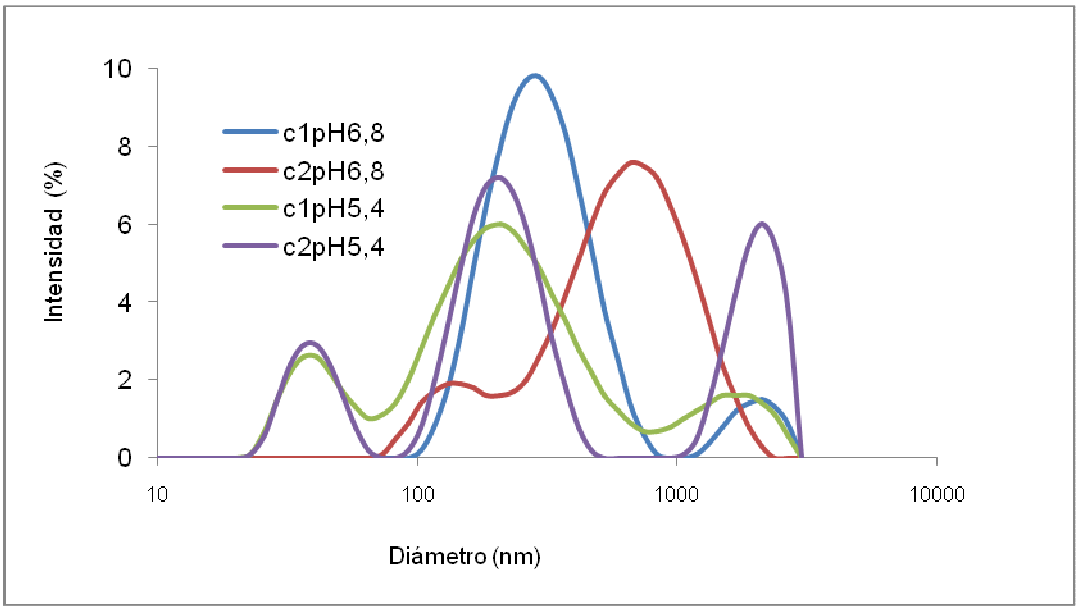


Figura 1. Distribución de tamaño de partícula de sistemas acuosos de caseinato de sodio a 1 y 2%, sin iones, a pH 5,4 y 6,8, 25 °C.

En la **Figura 1** se muestran los resultados de distribución de tamaño de partícula para los sistemas de caseinato de sodio a 1 y 2% a pH 5,4 y 6,8, sin adición de $CaCl_2$. En general, bajo las diferentes condiciones se observa que existe un aumento del tamaño promedio de partícula en función de la concentración de proteína. Cuando el caseinato de sodio se reconstituye en agua, las fracciones de caseína que lo componen se encuentran formando submicelas en combinación con fracciones de caseína libre (Dickinson 1999). Con el aumento en la concentración de proteínas las moléculas de caseína interaccionan en mayor medida, lo que promueve la formación de agregados de mayor tamaño. La distribución de tamaños, en todos los casos es polidispersa y similar a la reportada para micelas de caseína (De Kruif y Holt 2003), sin embargo, existe una marcada diferencia entre los dos valores de pH estudiados. Cabe hacer notar que a pH de 5,4 se observa la aparición de partículas menores a 100 nm, indicando que algunas de las partículas agregadas son disociadas en presencia del amortiguador acetato.

Los resultados del efecto de la adición de iones calcio a diferentes concentraciones (0 mM, 1 mM y 5 mM) sobre el tamaño de partícula en disoluciones de caseinato de sodio al 0,5%, 1,0% , 2,0% y 3,0% se resumen en las **Tablas 1** y **2**, para pH 6,8 y 5,4 respectivamente, donde se presenta el diámetro promedio, $d_{3,2}$. Cuando se adicionó 1 mM de $CaCl_2$, el diámetro promedio de partícula aumentó, en comparación con los sistemas sin iones. De acuerdo con Dickinson (1999) y Cheftel *et al.* (1989), la adición de iones calcio en las disoluciones de caseinato de sodio promueve la asociación de submicelas. No obstante, al aumentar la concentración de $CaCl_2$ a 5 mM, se observó disminución en el tamaño de partícula promedio, en comparación con las disoluciones de caseinato de sodio a 1 mM, e inclusive en comparación con las disoluciones de caseinato sin iones. La distribución de tamaños también se modificó, encontrándose que tras la adición de 5 mM de $CaCl_2$ predominan las partículas de menor tamaño, en comparación con las observadas en los sistemas anteriores. Al parecer, bajo esta concentración de $CaCl_2$ existe un mínimo grado de asociación de caseína, como si la asociación de calcio ocurriera principalmente hacia el interior de la misma molécula de proteína más que entre las diferentes moléculas de proteína.

Tabla 1. Tamaño promedio de partícula ($d_{3,2}$) de disoluciones de caseinato de sodio a pH 6,8, 25 °C, a diferentes concentraciones de $CaCl_2$.

	[ ] Caseinato de sodio			
[ ] $CaCl_2$.	0,5	1,0	2,0	3,0
0 mM	-	243 ± 1,1	250 ± 2,4	-
1 mM	205 ± 1,8	355 ± 6,6	381 ± 1,4	388 ± 6,1
5 mM	152 ± 2,3	134 ± 0,8	294 ±2,2	368 ± 1,8

Tabla 2. Tamaño promedio de partícula ($d_{3,2}$) de disoluciones de caseinato de sodio, a pH 5,4 25 °C, a diferentes concentraciones de $CaCl_2$.

	[ ] Caseinato de sodio			
[ ] $CaCl_2$	0,5	1,0	2,0	3,0
0 mM	-	143 ± 2,4	184 ± 1,3	-
1 mM	204 ± 3,4	146 ± 2,3	162 ± 0,6	169 ± 2,3
5 mM	167 ± 0,5	130 ± 0,4	149 ± 1,4	160 ± 1,2

Tensión interfacial dinámica

En los resultados de tensión interfacial dinámica no se aprecia efecto de la concentración de proteína sobre la tensión interfacial de los sistemas, bajo las condiciones empleadas. Sin embargo, el pH y la adición de iones juegan un papel importante en los valores del mismo. En general, a pH de 6,8 los valores de tensión superficial son menores en comparación con los de pH 5,4, mientras que la adición de iones promovió una disminución de los mismos, lo cual se puede observar en la **Figura 2**. En éstas se pudo observar que la completa adsorción de caseinato no es instantánea y se modifica con base en las condiciones establecidas. El cambio en la conformación de la proteína al adsorberse en una interfase se ha establecido debido a que conforme la proteína se adsorbe, ésta se ve afectada por una presión de expansión, la cual arrastra y separa la estructura nativa para maximizar el contacto hidrofóbico con la interfase oleosa. Cuando la molécula de proteína se acerca a la interfase y comienza

a adsorberse, en principio, es posible que ocurra una desorción muy rápida, sin cambio en la conformación de la proteína, o, con el tiempo, la proteína adsorbida cambia su conformación para maximizar el contacto hidrofóbico con el aceite, y de esta forma, puede pasar por diferentes etapas, hasta que el cambio en conformación es tal que la proteína se desplaza con dificultad e incluso si es desplazada de la interfase, ésta tendrá una conformación alterada (Dalgleish 2004). Esto explica porque la tensión interfacial disminuye con el tiempo hasta que alcanza un valor casi constante. Todas las muestras alcanzan un estado de adsorción en equilibrio aproximadamente después de 200 s, cuyos valores de tensión interfacial se reportan en las **Tablas 3** y **4**.

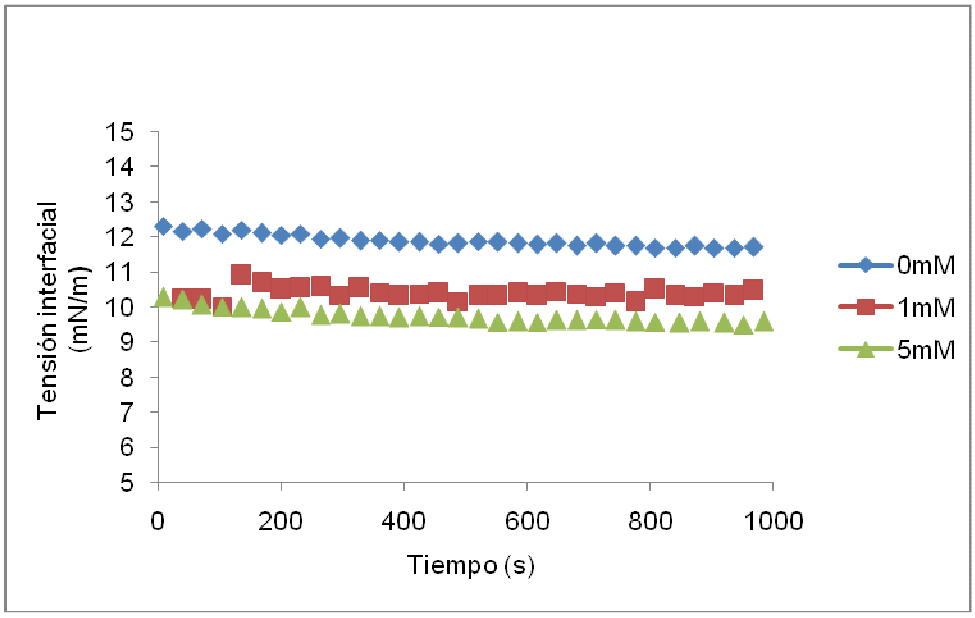


Figura 2. Tensión interfacial dinámica de sistemas acuosos de caseinato de sodio, 2%, pH 5,4, con diferente concentración de iones calcio, 25 °C.

Tabla 3. Resumen de valores de tensión interfacial (mN/m) al equilibrio de disoluciones de caseinato de sodio a pH 6,8 25 °C, a diferentes concentraciones de $CaCl_2$.

	[ ] Caseinato de sodio			
[ ] $CaCl_2$	0,5	1,0	2,0	3,0
0 mM	11,5 ± 0.21	10,5 ± 0.04	10,0 ± 0.07	11,0 ± 0.16
1 mM	10,5 ± 0.04	10,3 ± 0.13	9,5 ± 0.03	10,3 ± 0.04
5 mM	9,0 ± 0.03	9,8 ± 0.06	9,0 ± 0.02	9,8 ± 0.08

Tabla 4. Resumen de valores de tensión interfacial (mN/m) al equilibrio de disoluciones de caseinato de sodio a pH 5,4 25 °C, a diferentes concentraciones de $CaCl_2$.

	[ ] Caseinato de sodio			
[ ] $CaCl_2$	0,5	1,0	2,0	3,0
0 mM	9,3 ± 0,08	11,7 ± 0,02	12,0 ± 0,04	11,3 ± 0,12
1 mM	12,0 ± 0,11	11,5 ± 0,02	10,5 ± 0,03	10,8 ± 0,05
5 mM	7,5 ± 0,06	9,5 ± 0,05	9,7 ± 0,06	9,7 ± 0,04

CONCLUSIONES

La presencia de 1mM de $CaCl_2$ promovió el aumento del tamaño de partícula debido a la agregación de submicelas, atribuida al enlace de calcio con los residuos de fosfoserina de las caseínas.

Cuando se adiciona 5 mM de $CaCl_2$ en los sistemas acuosos de caseinato de sodio, el efecto inesperado de la reducción de tamaño de partícula y el cambio en la distribución de tamaño, se atribuye a un mínimo grado de asociación de las caseínas bajo esta concentración de iones.
Las diferencias encontradas a pH 5.4 y 6.8 tanto en tamaño de partícula como en tensión interfacial se asocian con cambios en la conformación de la proteína, así como al efecto de iones sodio presentes en el amortiguador acetato (80 mM), debido a que a altas concentraciones el ión sodio compite directamente con el calcio por sitios específicos.

AGRADECIMIENTOS

Parte de este trabajo fue financiado por la DGAPA-UNAM, proyecto IN114205. Sosa-Herrera MG y Vargas-Consuelos CL, agradecen el apoyo por la beca de doctorado al CONACYT-México y la beca de licenciatura a la DGAPA-UNAM, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carr AJ, Munro PA, Campanella OH. 2002. Effect of added monovalent or divalent cations on the rheology of sodium caseinate solutions. International Dairy Journal, 12: 487-492.

Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. 1989. Proteínas alimentarias. Zaragoza: Acribia. pag 364.

Dalgleish, DG. 1997. Structure-Function Relationships of Caseins. En: Damodaran S, Paraf A, editores, Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker, Inc. pag 199-224.

De Kruif CG, Holt C. 2003. Casein micelle structure, functions and interactions. En Fox PF, McSweeney PLH, editores. Advanced dairy chemistry vol. 1. 3ª ed. New York: Kluver Academic/Plenum Publishers. pag. 233-276.

Dickinson E 1999. Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. International Dairy Journal, 9: 305-312.

Dickinson E, Davies E. 1999. Influence of ionic calcium on stability of sodium caseinate emulsions. Colloids and Surfaces B, 12: 203-212.

Dickinson E, Radford SJ, Golding M. 2003. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. Food Hydrocolloids, 17: 211-220.

Radford SJ, Dickinson E, Golding M. 2004. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and alcohol. Colloid and Interface Science, 274:673-686.

Modificaciones en las proteínas del trigo por acción de las enzimas glucosa oxidasa y pentosanasa

Modifications in wheat proteins by glucose oxidase and pentosanase action

Steffolani ME (1), Ribotta PD (1), Pérez GT (1), León AE (1)

(1) CONICET- Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Nacional de Córdoba
Av. Valparaiso s/n°- Ciudad Universitaria- Córdoba, Argentina. CP 5000. C.C 509
eusteffolani@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

La glucosa oxidasa (Gox) en presencia de O_2 cataliza la oxidación de α-D-glucosa a α-D-gluconolactona y H_2O_2, éste actúa como oxidante sobre las proteínas del trigo, mejorando sus propiedades. La pentosanasa (Pn) hidroliza los enlaces β-(1,4) de los arabinoxilanos presentes en la harina de trigo, la disminución del tamaño de los pentosanos permite mejorar las propiedades de la masa. El objetivo de este trabajo fue identificar las modificaciones en las proteínas del trigo por acción de las enzimas que permitan explicar los efectos macroscópicos sobre las masas. Se prepararon masas con harina de trigo y 58,5% de agua (valor óptimo), que se liofilizaron luego de una hora de reposo. Las dosis utilizadas fueron: 0,001% y 0,01% de Gox; 0,006% y 0,012% de Pn. Se determinó el contenido de pentosanos totales y solubles, la concentración de sulfhidrilos libres (*SHL*) y el porcentaje del macropolímero de gluteninas (GMP). Las proteínas se extrajeron secuencialmente con: 5% NaCl (F1), 70% isopropanol (F2), 1,5% dodecil sulfato de sodio (SDS) (F3) y β-mercaptoetanol-SDS (F4). Se determinó el contenido de proteínas en cada fracción por el método de kjeldahl y los patrones electroforéticos en condiciones reductoras por SDS-PAGE. La estructura de las masas se estudió por microscopía electrónica de barrido. El uso de Gox produjo una disminución significativa de la concentración de *SHL* y un aumento del contenido de GMP, indicando la formación de agregados proteicos de gran tamaño. Gox causó una disminución de la solubilidad de las proteínas en SDS y un aumento en β-mercaptoetanol-SDS. Mediante electroforesis se observó que Gox actuó sobre F1 (albúminas y globulinas) y F4 (gluteninas de alto peso molecular) formando agregados que quedaron retenidos en el gel separador. Ya que SDS-PAGE fue en condiciones reductoras, estos agregados no pueden estar estabilizados por puentes disulfuro. En las microfotografías de las masas con Gox se observó una red de gluten más cerrada que el control, con hebras proteicas gruesas; indicando la formación de una red fuerte y resistente. En las masas con Pn se observó un incremento significativo del contenido de pentosanos solubles y una tendencia a incrementar la concentración de *SHL*. En éstas muestras la solubilidad de las proteínas fue mayor en isopropanol, esto puede deberse a que los pentosanos de menor tamaño interaccionaron con el agua y promovieron interacciones entre las cadenas proteicas de las gliadinas y el alcohol, facilitando su extracción. Los patrones electroforéticos de F2 y F4 mostraron un incremento de la intensidad de todas las bandas, en correspondencia con el mayor contenido de proteínas. En las microfotografías de las masas, se observó que Pn formó una red proteica más abierta que el control, donde los gránulos de almidón se hicieron más visibles.

ABSTRACT

The enzyme glucose oxidase (Gox), in presence of oxygen catalyses the oxidation of α-D-glucose to α-D-gluconolactone and H_2O_2. The H_2O_2, which act as oxidant, improves the properties of wheat protein. The enzyme pentosanase (Pn) or xylanase hydrolyzes arabinoxylans and arabinogalactans present in the flour. The xylanase releases water soluble arabinoxylans and also reduces their molecular weight. The low size of pentosans improves dough properties. The objective of this work was to find changes introduced in wheat proteins by the action of the enzymes that allow explaining the behaviors of the dough. The dough were prepared with wheat flour and 58.5% of water (optimum value), they were reposed for 1 h and then freeze-dried. The doses used were: 0.001% and 0.01% of Gox; 0.006% and 0.012% of Pn. The effects of the enzymes were analyzed by determining pentosans

and soluble pentosans content, free sulphidryl *(SHf)* concentration and macropolymer glutenin content. The solubility of protein in different solutions (NaCl (F1), Isopropanol (F2), dodecyl sulfate of sodium (F3) and β-mercaptoethanol-SDS (F4)) were analyzed. The protein content of each fraction was determined by Kjeldahl method and electrophoretic patterns by SDS-PAGE. The microstructures of dough were analyzed by scanning electronic microscopy. The Gox enzyme decreased *SHf* and increased GMP contents; these results indicated the formation of large protein aggregates. In addition, the protein sequential extraction showed that Gox modified the protein solubility. In the samples with Gox, it was observed a decrease in protein solubility in SDS and consequently an increase in the protein content of the last fraction. The SDS-PAGE indicated that Gox modified mainly F1 (albumin and globulin) and F4 (high molecular weight glutenin). The electrophoretic pattern of Gox 0.01% showed a dark band of > 200,000 molecular mass that corresponds to large aggregates formed by non-disulfide cross-linking covalent bonds, since SDS-PAGE was made under reducing conditions. The microstructure of dough with high content of Gox presented a more continuous and closed gluten network structure as compared to control dough. The gluten fibrils were coarser indicating the formation of a strong and resistant network. The content of water soluble pentosans increased in the samples with Pn indicating hydrolysis of water insoluble pentosans for enzyme action. Moreover, in these samples a tendency to increase *SHf* content was observed, although only the highest enzyme level (0.012%) caused a significant change. The Pn enzyme increased protein solubility in isopropanol, this result indicated that the reduction of pentosans size decreased steric impediment of insoluble pentosans and this increased interaction among protein and between protein and alcohol making easier their extraction. The electrophoretic patterns of F2 and F4 showed an increase of all protein bands in correspondence with great protein content of these fractions. The microphotography of Pn dough showed a more open protein matrix and a greater number of pores than the control dough, where the starch grains were more visible.

PALABRAS CLAVE: *Glucosa Oxidasa, Pentosanasa, Proteínas de trigo.*

KEYWORDS: *Glusose Oxidase, Pentosanase, Wheat Protein* .

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de la harina de trigo son las responsables de la formación de una masa viscoelástica capaz de retener CO_2 durante la fermentación y posterior cocción (Lindsay y Skerritt 1999, Shewry *et al.* 2001). Varias preparaciones de enzimas comerciales son usadas en la industria panadera para mejorar las propiedades de la masa y la calidad del producto final.

La enzima glucosa oxidasa (Gox), en presencia de oxígeno cataliza la oxidación de α-D-glucosa a α-D-gluconolactona y H_2O_2. El H_2O_2 oxida los grupos tioles de las proteínas del gluten para formar puentes disulfuro (Haarasilta y Pullinen 1992). El agregado de Gox produce cambios en la textura de la masa y produce aumento del volumen de pan (Martinez-Anaya y Jiménez 1998). Sin embargo, otros autores (Vemulapalli *et al.* 1998, Risiah *et al.* 2004) no observaron mejoras en la calidad de los productos cuando se utilizaba Gox en la formulación. Bonet *et al.* (2006), en su trabajo postularon que el efecto de Gox era dependiente de la dosis utilizada y de la calidad de la harina.

Los pentosanos asociados a las proteínas de la harina afectan la formación de la red de gluten por impedimento estérico (Van Oort *et al.* 1995). La enzima pentosanasa (Pn) o xilanasa hidroliza los enlaces β-(1,4) de los arabinoxilanos presentes en la harina de trigo. La xilanasa transforma a los pentosanos insolubles en agua en solubles disminuyendo su tamaño (Courtin y Delcour 2001) permitiendo mejorar las propiedades de la masa. Algunos autores (Martinez-Anaya y Jimenez 1997, Jimenez y Martinez-Anaya 2001) informaron que la xilanasa mejora la elasticidad de la masa y la calidad del producto final. El conocimiento del mecanismo por el cual la pentosanasa ejerce su efecto es aún limitado, probablemente porque los pentosanos de la harina cambian de variedad en variedad y la especificidad de la enzima cambia de acuerdo a los diferentes sustratos (Courtin y Delcour 2001, Vardakou *et al.* 2003). El efecto de estas enzimas sobre las interacciones entre las proteínas de la masa de trigo está aún en discusión. El objetivo de este trabajo fue encontrar cambios introducidos en las proteínas del trigo por acción de las enzimas que permitan explicar el comportamiento de la masa, a fin de hacer una contribución al conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó una harina de trigo comercial, de calidad intermedia provista por el Molino Campodónico Ltda. (La Plata, Argentina). El porcentaje de humedad (Método 44-01, AACC 1995) y de proteínas (Método 46-10, AACC 1995) fue 13,1 ± 0,2 y 10,9 ± 0,3 respectivamente. Las enzimas utilizadas fueron Glucosa oxidasa (Gox, Gluzyme mono 10000 U/g, de Novozyme) y 1,4 endoxilanasa (Pn, Pentopan mono 2500 U/g, de Novozyme). Todos los agentes químicos fueron de grado analítico.

Preparación de masas

Se prepararon masas con harina de trigo y 58,5% de agua (valor óptimo) utilizando una amasadora (HR 1495, Philips, Argentina). Las dosis de cada enzima empleadas fueron: Gox 0,001% y 0,01%; Pn 0,006% y 0,012%. Las masas fueron reposadas por 1 h a 25 °C, y luego fueron liofilizadas y almacenadas a -18 °C hasta su posterior análisis.

Determinación de pentosanos totales y solubles

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

Determinación de grupos sulfhidrilos libres (SHL)

La concentración de *SHL* fue determinada de acuerdo a Bak *et al.* (2000) con modificaciones de Hanft y Koeler (2006). La masa liofilizada (50 mg) fue mezclada con 50 µL solución colorida (8 M urea, 3 mM EDTA, 1% SDS, 0,2 M Tris – HCl y 10 mM 5,5-dithio-bis (2-acido nitro benzoico) pH 8) y 1,5 mL buffer (8 M urea, 3 mM EDTA, 1% SDS, 0,2 M Tris - HCl pH 8) por 25 min. La suspensión fue centrifugada por 10 min a 3000 × *g* y la absorbancia del sobrenadante se midió a 412 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado fue 13600 M^{-1} cm^{-1}.

Obtención del macropolímero de gluteninas (GMP)

El GMP fue obtenido de acuerdo a Skerrit *et al.* (1999). Las masas liofilizadas (100 mg) fueron suspendidas en 1,5 mL de una solución de SDS 1,5% p/v. Las suspensiones se agitaron por 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron por 30 min a 15600 *x g* y 20 °C. El sobrenadante fue descartado y el GMP fue separado como la fracción de gel insoluble. El contenido total de proteínas del precipitado fue determinado por el método de Kjeldahl (N × 5,7) (Método 46-10, AACC 1995) y expresado como% de proteínas del GMP/100 g de masa liofilizada.

Extracción secuencial de proteínas

Las proteínas se extrajeron secuencialmente a partir de 100 mg de masa liofilizada. Cada paso de la extracción se realizó bajo agitación constante y las centrifugaciones se realizaron durante 10 min a 1100 *x g* y 9400 *x g* en el último paso. La primera extracción se realizó con 1 mL de NaCl 0,5% p/v (F1) con agitación durante 2 h. El segundo paso de la extracción fue con 1 mL de isopropanol al 70% v/v (F2) con 3 h de agitación. El tercer paso fue con 1 mL de SDS 1,5% p/v (F3) con agitación por 8 h. El cuarto y último paso de extracción se realizó con 1 mL de buffer (0,063 M Tris - HCl pH 6,8; 1,5% p/v de SDS, 3% v/v β-mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromofenol) (F4) con 4 h de agitación. El contenido de proteínas de cada fracción fue determinado por el método de Kjeldahl (N × 5,7) (Método 46-10, AACC 1995) y se expresó como% de proteínas de cada fracción / 100 g de masa liofilizada.

Electroforesis de las fracciones proteicas

Cada fracción de la extracción secuencial de proteínas fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Las electroforesis se realizaron en geles de 70 mm x 80 mm x75 mm usando una celda Mini Protein II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) de acuerdo a Laemmli (1970). Las fracciones fueron resuspendidas en buffer (0,063 M Tris - HCl, pH 6,8; 1,5% p/v SDS, 3% β-mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromofenol). Se prepararon geles con un *staking* y un separador con el 4% y el 12% de concentración de acrilamida respectivamente. Se utilizó un marcador de peso molecular provisto por Bio-Rad (SDS-PAGE MW estándar, Broad range, Bio-Rad). Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 150 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. Los geles fueron teñidos con 0,25% p/v azul brillante de coomassie en una solución de metanol, agua y ácido acético (4:5:1 v/v) y fueron desteñidos en el mismo solvente.

Microscopía electrónica de barrido

Las masas fueron preparadas como se describió previamente. Pequeñas porciones de muestras fueron cortadas y fijadas en glutaraldehido (1:30) por 2 h y embebidas en un serie de soluciones de acetona en gradiente (25, 50, 75 and 80%) por 20 min en cada graduación. Luego las muestras fueron embebidas en 100% de acetona por tres intervalos consecutivos de 20 min para asegurar la completa deshidratación. Las masas deshidratadas fueron cubiertas con partículas de oro por 4 min y las imágenes fueron tomadas usando un microscopio electrónico de barrido Jeol 35 CF (Japón) con un voltaje de aceleración 6 kV. Las microfotografías fueron tomadas usando 1000x de magnificación.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina). En todos los casos se realizaron las determinaciones por triplicado y los resultados se informaron como el valor promedio ± la desviación estándar. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el Método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación del 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las enzimas sobre los pentosanos

El efecto de las enzimas sobre el contenido de pentosanos totales y soluble se muestra en la **Tabla 1**. Como se esperaba, el agregado de las enzimas no modificó el contenido de pentosanos totales de las masas respecto al control. Vemulapalli y Hoseney (1998) informaron que la viscosidad de la fracción soluble en agua extraída a partir de masa fermentada disminuyó con el aumento de la dosis de Gox, sugiriendo que los pentosanos solubles en agua se hacen menos solubles. Sin embargo, en este trabajo la enzima Gox, no modificó el contenido de pentosanos soluble respecto al control.

Tabla 1. Efecto de las enzimas sobre el contenido de pentosanos totales (PT) y solubles (PSA), la concentración de sulfhidrilos libres (*SHL)* y el contenido de macropolimero de glutenninas (GMP).

Muestra	**PT (%)**	**PSA (%)**	***SHL* (µmol/g)**	**GMP (%)**
Control	3,57ab	1,35ab	0,53c	1,43a
Gox 0,001%	3,65ab	1,44b	0,35b	1,85b
Gox 0,01%	3,77b	1,31a	0,28a	1,91b
Pn 0,006%	3,51a	2,06c	0,57cd	1,25a
Pn 0,012%	3,74b	2,07c	0,61d	1,42a

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

En las muestras con Pn se observó un aumento significativo del contenido de pentosanos solubles en agua. La enzima Pn provocó la hidrólisis parcial de los pentosanos, produciendo una disminución del tamaño molecular y aumentando la solubilidad en agua.

Efecto de las enzimas sobre la concentración de SHL

La concentración de *SHL* de las diferentes masas se presenta en la **Tabla 1**. Para ambas dosis de Gox utilizadas se tuvieron menores concentraciones de *SHL* que el control. El efecto oxidante de Gox promovió la formación de puentes disulfuro S-S entre las proteínas y enlaces no-disulfuro entre residuos de cisteínas y ácido ferúlico de los arabinoxilanos disminuyendo los *SHL*. Hanft y Koehler (2006), solo observaron una disminución de *SHL* cuando glucosa fue incorporada en la formulación junto con Gox.

En las muestras con Pn se observó una tendencia a incrementar la concentración de *SHL*, aunque solo la dosis más elevada (0,012%) causó un cambio significativo. Este resultado podría deberse a una mayor interacción entre las proteínas y los pentosanos (se espera mayor interacción cuando el tamaño molecular de los pentosanos disminuye) que dificultaría la formación de puentes disulfuro S-S entre las proteínas del gluten.

Efecto de las enzimas sobre las proteínas

En concordancia con otros autores (Primo-Martín *et al.* 2003), la enzima Gox incrementó el contenido de GMP (**Tabla 1**), indicando la formación de grandes agregados proteicos insolubles en SDS. Éstos podrían estar formados por entrecruzamiento de puentes disulfuro y no-disulfuro entre las proteínas. Por otro lado, se analizó como la enzima modificaba la solubilidad de las proteínas en distintos solventes. El porcentaje de proteínas de cada fracción se muestra en la **Tabla 2**. La fracción extraída con la solución de NaCl (F1) correspondió principalmente a albúminas y globulinas. No se observaron diferencias significativas entre el contenido de proteínas de F1 de las muestras con Gox y el control. Sin embargo, el patrón electroforético de Gox 0,01% mostró una banda oscura adicional de masa molecular > 200,000 (**Figura 1**) que corresponde principalmente a grandes agregados formados por entrecruzamiento de proteínas por enlaces covalentes no-disulfuros, ya que SDS-PAGE fue hecha bajo condiciones reductoras. Estos enlaces podrían ser entrecruzamientos entre residuos de tirosina de las proteínas. Rasiah *et al.* (2005) y Vemulapalli *et al.* (1998) obtuvieron resultados similares a los presentados en éste trabajo. Las proteínas extraídas con Isopropanol (F2) corresponden principalmente a las gliadinas. No se observó efecto de la enzima Gox sobre esta fracción (**Figura 2**), lo que podría deberse a su baja concentración de *SHL* y a que estos solo pueden formar puentes disulfuro intra-moleculares. Varios autores (Rasiah *et al.* 2005, Allen 1999 y Bonet *et al.* 2006) indicaron que una alta dosis de Gox fue requerida para modificar a las gliadinas. La solubilidad de las proteínas en SDS disminuyó con el agregado de Gox **(Tabla 2 y Figura 3),** y en consecuencia el contenido de proteínas de F4 fue significativamente mayor respecto al control. El alto contenido de proteínas en ésta última fracción indicó la presencia de grandes agregados insolubles en SDS formados principalmente por entrecruzamiento de proteínas por enlaces disulfuro S-S y no-disulfuro inter-moleculares. Bajo condiciones reductoras, el patrón electroforético de F4 de la muestra Gox 0,01% presentó mayor intensidad que el control en todas las bandas en general (**Figura 4**). Además la banda oscura presente al comienzo del gel separador (enlaces covalentes no-disulfuros) tuvo mayor intensidad comparado con la muestra control.

Tabla 2. Efecto de las enzimas sobre la solubilidad de las proteínas en diferentes solventes de la masa de trigo.

	F1	**F2**	**F3**	**F4**
Muestra	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**
Control	1,83a	3,84ab	3,32c	0,89a
Gox 0,001%	1,92a	3,74a	2,97b	1,39b
Gox 0,01%	1,89a	4,16bc	2,51a	1,85cd
Pn 0,006%	1,91a	4,46c	2,58a	1,51bc
Pn 0,012%	1,91a	4,33c	2,56a	1,41bc

*Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$
F1= Contenido de proteínas de la fracción extraída con 0,5% p/v NaCl.
F2= Contenido de proteínas de la fracción extraída con 70% v/v Isopropanol.
F3= Contenido de proteínas de la fracción extraída con 1,5% p/v SDS.
F4= Contenido de proteínas de la fracción extraída con buffer 0,063 M Tris - HCl pH 6,8; 1,5% p/v de SDS, 3% v/v β-mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromo fenol.

No se observaron diferencias significativas en el contenido de GMP entre las muestras con Pn y el control (**Tabla 1**), sin embargo Primo-Martín *et al.* (2003) reportaron que Pn incrementó el contenido de proteínas del GMP. El efecto de la enzima Pn sobre la solubilidad de las proteínas en los distintos solventes se muestra en la **Tabla 2**. El mayor contenido de pentosanos solubles no modificó la solubilidad de las proteínas en NaCl. Por otro lado, las muestras con Pn presentaron mayor contenido de proteínas en F2 comparado con el control, indicando que el menor tamaño de los pentosanos permitió extraer gran cantidad de proteínas con isopropanol (**Figura 2**). La hidrólisis de los pentosanos insolubles en agua, disminuyó el impedimento estérico y promovió un incremento de las interacciones entre las cadenas proteicas y con el alcohol facilitando su extracción. Por otra parte, una

disminución del contenido de proteínas de F3 **(Tabla 2 y Figura 3)** y un incremento del contenido de proteínas en F4 fueron observados debido a la actividad de Pn en las muestras respecto al control. La remoción de los pentosanos insolubles permitió una mayor interacción entre las cadenas proteicas disminuyendo su solubilidad. El patrón electroforético de F4 (**Figura 4**) mostró gran intensidad en todas las bandas proteicas respecto al control.

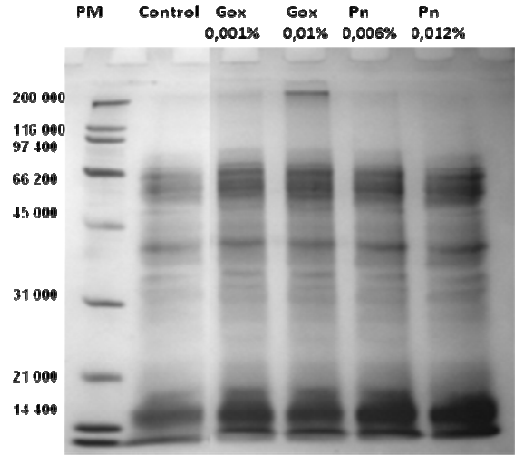


Figura 1. Perfil electroforético de las proteínas extraídas con 0,5% p/v NaCl.

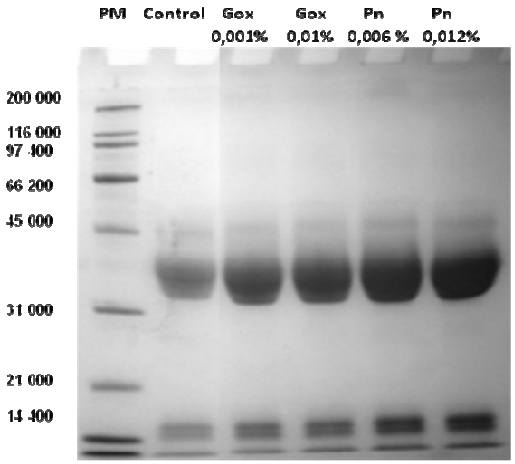


Figura 2. Perfil electroforético de las proteínas extraídas con 70% v/v Isopropanol.

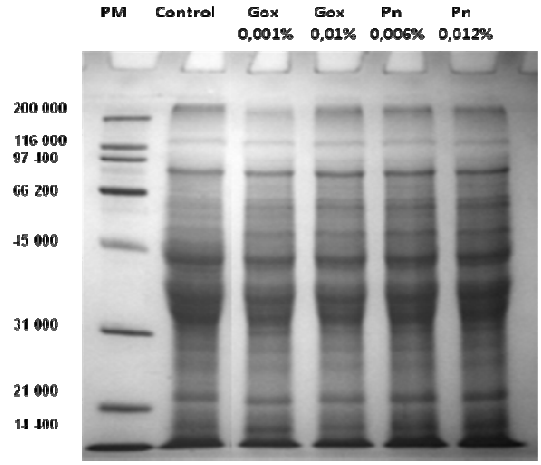


Figura 3. Perfil electroforético de las proteínas extraídas con 1,5% p/v SDS.

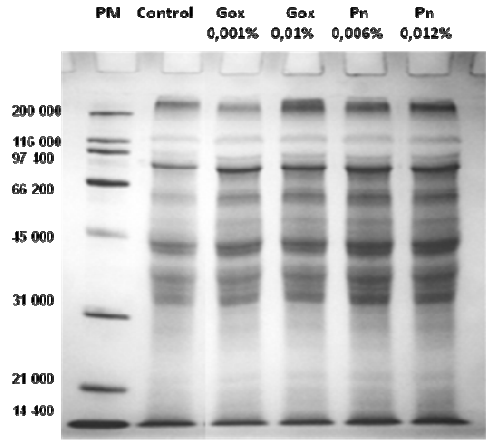


Figura 4. Perfil electroforético de las proteínas extraídas con buffer 0,063 M Tris - HCl pH 6,8; 1,5% p/v de SDS, 3% v/v β-mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromo fenol.

Efecto de las enzimas sobre la microestructura de la masa

Rojas *et al.* (2000) describieron a la masa de harina de trigo como una matriz continua (red de gluten) que tiene inmersos los gránulos de almidón. La microestructura de la masa con mayor contenido de Gox presentó una red de gluten más continua y cerrada que la masa control (**Figura 5**). Las fibras del gluten fueron gruesas indicando la formación de una red fuerte y resistente. Bonet *et al.* (2006) observaron por Cryo-SEM que la enzima Gox produce fibras de gluten más gruesas y menos orientadas con muchos poros de gran tamaño, además indicaron que altos niveles de Gox inducen la formación de una red de gluten discontinua. Por lo contrario, las microfotografías de las masas con Pn presentaron una matriz proteica más abierta y con un mayor número y tamaño de poros que la masa control, donde los gránulos de almidón fueron más visibles.

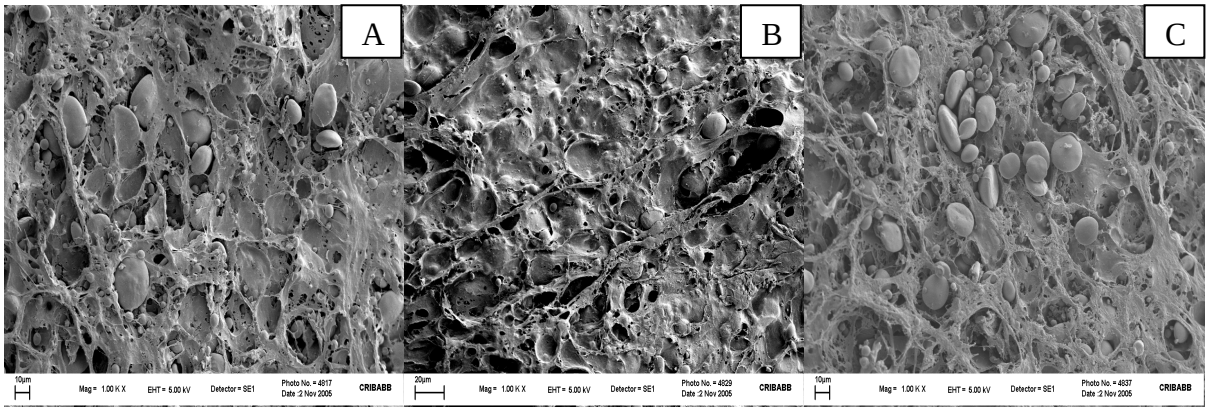


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido de las masas Control (A), Gox 0,01% (B) y Pn 0,012% (C).

CONCLUSIÓN

La enzima Gox modificó las proteínas del trigo, principalmente albúminas, globulinas y gluteninas de alto peso molecular. La acción oxidante de la enzima llevó a la formación de grandes agregados por entrecruzamiento de la proteínas mediante puentes disulfuro S-S y enlaces ditirosina. Estos resultados fueron corroborados por una disminución de la concentración de *SHL*, un incremento del contenido de GMP, por SDS-PAGE y por la formación de una microestructura con una red de gluten mucho más cerrada que el control.

El menor tamaño de los pentosanos por acción de Pn promovió principalmente a una mayor concentración de *SHL*, un incremento de la solubilidad de las proteínas en isopropanol, y una disminución de la solubilidad en SDS. Estos resultados podrían deberse a cambios en las interacciones proteína-proteína y proteína-pentosanos solubles que conducen a la formación de una microestructura de la red de gluten más abierta que el control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. American Association of Cereal Chemists. 1995. Approved Methods of the AACC. Ninth Edition. The Association. USA.

Allen WG. 1999. Alternative oxidants as dough conditioners. Cereal Food World, 44: 642 – 649.

Bak P, Nielsen IL, Thogersen HC, Poulsen CH. 2000. A method for testing the strengthening effect of oxidative enzyme in dough. *Special Publication: Royal Society of Chemistry*. Wheat Structure, Biochemistry and Functionally, 212: 361-367.

Bonet A, Rosell CM, Caballero PA, Gómez M, Pérez-Munuera I, Lluch. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. Food Chemistry, 99: 408-415.

Courtin CW, Delcour JA. 2001. Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-noextractable arabinixylan. Journal of cereal science, 35: 301-312.

Haarasilta S, Pullinen T. 1992. Novel enzyme combination. A new tool to improve baking results. Agro-Food-Industry Hi-Tech (Italy), 3: 12-13.

Hanft F, Koeler P. 2006. Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. Journal of Science of Food and Agriculture, 86: 1699-1704.

Hashimoto S, Shogren M, Pomeranz Y. 1987. Cereal pentosans: estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. Cereal Chemistry, 64: 30-34.

Jiménez T, Martínez-Anaya MA. 2001. Amylases and hemicellulases in breadmaking, degradation by-products and potential relationship with functionality. Food Science and Technology International, **7** (1): 5-14.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 681-685.

Lindsay MP, Skerritt JH. 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. Trend in Food Science & Technology, 10: 247-253.

Martínez-Anaya MA, Jiménez T. 1997. Funcionality of enzyme that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A, 205: 209-214.

Martínez-Anaya MA, Jiménez T. 1998. Physical properties of enzyme supplemented doughs and relationship to bread quality parameters. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A, 206: 134-142.

Primo-Martín C, Valera R, and Martínez-Anaya MA. 2003. Effect of pentosanase and oxidases on the characteristics of doughs and the glutenin macropolymer (GMP). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 4673-4679.

Risiah IA, Suttom, KH, Low FL, Lin HM, Gerrard JA. 2004. Crosslinking of wheat dough protein by glucose oxidase and resulting effects on bread and croissants. Food Chemistry, 89: 325-332.

Rojas J, Rosell C, Benedito de Barber C, Pérez-Manuera I, Lluch M. (2000). The baking process of wheat rolls followed by cryo-scanning electron microscopy. European Food Research Technology, 212: 57-63.

Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat Project. Trend in Food Science & Technology, 11: 433-441.

Skerrit JH, Luch H, Bekes F. 1999. Depolymerization of the glutenin macropolymer during dough mixing: I. Changes in levels, molecular weight distribution, and overall composition. Cereal Chemistry, 76: 395-401.

van Oort M, van Straaten F, Laane C. 1995. Pentosans and pentosanases in bread-making. International Food Ingredients, 2: 23-27

VardaKou M, Katapodis P, Samiotaki M, Ketos D, Panayotou G, Christakopoulus P. 2003. Modo action of family 10 and 11 endoxylanases on water un-extractable arabinoxylan. International journal of biological macromolecules, 33: 129-134.

Vemulapalli V, Miller KA, Hoseney RC. 1998. Glucose oxidase in breadmaking systems. Cereal Chemistry, 75: 439-442.

Vemulapalli V, Hoseney RC. 1998. Glucose oxidase effects on gluten and water soluble. Cereal Chemistry, 75: 859-862.

Recubrimientos para disminuir el contenido graso en papas tipo chips

Coatings to reduce fat content in patata chips

Tavera Quiroz MJ, Urriza M, Bertola N, Pinotti A

CIDCA- CONICET, Facultad de Ciencias Exactas. Facultad de Ingeniería, UNLP
47 y 116, La Plata (1900) Argentina.
nbertola@cidca.org.ar

RESUMEN

El proceso de fritura se emplea tanto para tratar térmicamente los alimentos como para impartirles sabores y texturas que les son únicos. Industrialmente, este proceso se utiliza en la producción de alimentos tipo snacks. Los alimentos fritos contienen una alta proporción de lípidos que no se encuentran en el material original. Los recubrimientos de hidrocoloides permiten reducir el contenido graso de los alimentos a los que se aplican durante el proceso de fritado debido a que actúan como barrera a los lípidos. Entre los hidrocoloides más estudiados se destacan el gelano y los derivados de la celulosa. Las formulaciones para recubrimientos comestibles deben incluir un componente capaz de formar una matriz cohesiva y continúa; generalmente es necesaria la incorporación de un plastificante para mejorar sus propiedades físicas.

Los objetivos propuestos en el presente trabajo fueron: a) desarrollar recubrimientos a base de metilcelulosa para disminuir el contenido graso de papas chip b) analizar el comportamiento reológico de las soluciones de metilcelulosa.

Se utilizaron soluciones acuosas de A4M (Methocel, Dow Chemical, USA) con una concentración de 1% p/p con el agregado de sorbitol o glicerol (0-1%) como plastificante. Se analizó su comportamiento reológico en un viscosímetro ThermoHaake RheoStress 300 utilizando un sistema sensor de cilindros concéntricos. Las curvas reológicas fueron obtenidas a 25°C con un tiempo de termostatización de 5 minutos. Se determinó el esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad de cizallamiento para un barrido de gradientes de velocidad ascendente (entre 0 y 500 s^{-1}) y descendente (de 500 a 0 s^{-1}). Las curvas fueron modeladas con la ley de la potencia ($\tau = k\ \gamma^{n}$) obteniéndose los parámetros K (índice de consistencia) y n (índice de comportamiento de flujo). Las soluciones de A4M 1% presentaron comportamiento pseudoplástico para todas las concentraciones de plastificante utilizadas obteniéndose valores similares de n para los dos plastificantes y mayores valores de K cuando se utilizó sorbitol.

Los recubrimientos se aplicaron por inmersión sobre papas chips de 3.5cm de diámetro y 0,18 ± 0,02cm de espesor, previamente escaldadas en agua a 85 *ºC* por 5 min. Las papas con el recubrimiento y papas control se frieron en aceite de girasol a 180 *ºC* durante 2 min.

Las muestras se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante para medir el contenido de humedad y sobre las muestras secas se determinó el contenido graso por Soxhlet con una mezcla de éter de petróleo:éter etílico (1:1).

El agregado de sorbitol mejoró las propiedades de barrera de los recubrimientos ya que las muestras redujeron la absorción de aceite respecto a las muestras control (sin plastificante) y a las tratadas con glicerol. La concentración de sorbitol más efectiva fue 0,75%, con esta formulación se logró reducir 30% la absorción de aceite.

ABSTRACT

The frying process is used for heat treating food to impart flavors and textures that are distinctive. Industrially, this process is used in the production of food type snacks. Fried foods contain a high proportion of lipids that are not included in the original material. Hydrocolloid coatings can reduce the food fat content to which they are applied during the frying process because they act as barrier lipids. Among the hydrocolloids, gelano and products derived from cellulose were the most studied. Edible coating formulations include a component that forms a cohesive and continue matrix; it is usually required to incorporate a plasticizer to improve its physical properties.

The objectives proposed in this work were: a) to develop coatings based on methylcellulose to reduce

the fat content of chips potato and b) to analyze the rheological behavior of methylcellulose solutions.
Solutions of A4m (Methocel, Dow Chemical, USA) with a concentration 1% w /w with the addition of sorbitol or glycerol (0-1%) as a plasticizer were used. Rheological behavior was analyzed in a viscometer ThermoHaake RheoStress 300 using a sensor system of concentric cylinders. Rheological curves were obtained after a stabilization time of 3 minutes at 25 *ºC*. The shear stress (τ) was determined as a function of shear rate (γ) between 0 and 500 s^{-1}, with the following program: 3 minutes to reach the maximum shear rate, then it was maintained during 1 min and finally it was allowed to reach 0 shear rate in 3 minutes. This program allows to evaluate the rheological behavior of the solutions and its time-dependence. Rheological behavior was mathematically fitted using $\tau = k\,\gamma^{n}$ model, where k is the consistency coefficient and n the flow behavior index. Solutions A4M 1% showed a pseudoplastic behavior for al all concentrations of plasticizer used, obtaining similar values of n for both plasticizers and higher values of K when sorbitol was used.
The coatings were applied by dipping potato chips of 3.5cm diameter and 0,18 ± 0,02 cm thick, previously scalded in water at 85 °C for 5 min. Potatoes with and without coatings were fried in sunflower oil at 180 *ºC* for 2 min.
The samples were dried in an oven at 105 °C to constant weight to determine moisture content and fat content was determine by Soxhlet on dry samples, with a mixture of petroleum ether: ethyl ether (1:1).
The sorbitol addition improved the barrier properties of the coatings because the samples reduced the oil absorption with respect to the control samples (without plasticizer) and those treated with glycerol. The most effective concentration of sorbitol was 0,75%; with this formulation the oil absorption was reduced over 30%.

PALABRAS CLAVE: *papas chips, fritura, metilcelulosa, recubrimientos.*

KEYWORDS: *chips potato, frying, methylcellulose, coatings.*

INTRODUCCIÓN

El proceso de fritura es considerado uno de los métodos más antiguos en la cocción de alimentos, se emplea tanto para tratar térmicamente a los alimentos como para impartirles sabores y texturas que les son únicos (Southerm *et al.* 2000, Shyu y Hwang 2001, Saguy y Dana 2003, Bouchon y Pyle 2004). Industrialmente, este proceso se utiliza en la producción de alimentos tipo snacks.
Al entrar en contacto el alimento con el aceite caliente se produce una transferencia rápida de calor, produciéndose un proceso de deshidratación parcial localizado en la parte externa del producto, la que se transforma progresivamente en una corteza crocante mientras que el interior permanece húmedo pero cocido. Los alimentos fritos contienen una alta proporción de lípidos que no se encuentran en el material original (Smith *et al.* 1985, Mackinson *et al.* 1987, Pinthus *et al.* 1992, 1993, 1995a, 1995b). Juárez *et al.* (2004) observaron que el contenido graso de productos cárneos empanados fritos ("milanesa") aumentaba desde un 3% en el producto crudo hasta a un 14% en el producto frito. Nutricionalmente el consumo de grasas está relacionado al sobrepeso y a enfermedades coronarias por lo que resulta recomendable su reducción. En respuesta a estas demandas se están desarrollando alimentos que incluyen en su formulación sustitutos de la grasa y ha crecido el interés por el desarrollo y estudio de la utilización de recubrimientos con el objeto de reducir la absorción de aceite en los alimentos fritos (Mallikarjunan *et al.* 1997, Williams y Mittal 1999a, García *et al.* 2002).
Los recubrimientos de hidrocoloides permiten reducir el contenido graso de los alimentos a los que se aplican durante el proceso de fritado debido a que actúan como barrera a los lípidos. Entre los hidrocoloides más estudiados se destacan el gelano y los derivados de la celulosa, principalmente metilcelulosa (Debeaufort y Voilley 1997, Williams y Mittal 1999b, Mellema, 2003).
Al respecto las propiedades de formar film y de gelificación descritas para la metilcelulosa y para la hidroxipropilmetilcelulosa han sido utilizadas para reducir la absorción de aceite (Altonaga, 2007). El grado de sustitución influye en las propiedades de estos polímeros. Además exhiben termo-gelación, es decir cuando la solución se calienta forma un gel que se revierte durante el enfriamiento, recuperando la viscosidad original previa a la gelificación.
Los objetivos propuestos en el presente trabajo fueron: a) desarrollar recubrimientos a base de metilcelulosa para disminuir el contenido graso de papas chips b) analizar el comportamiento

reológico de las soluciones de metilcelulosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como materiales se usaron papas y aceite de girasol. Las papas que fueron almacenadas a 8 *ºC* y 90% de humedad relativa se cortaron en rodajas finas de 0,18 ± 0,02 cm de espesor usando una procesadora Moulinex. Los diámetros de las papas se redujeron a 3,5cm mediante un sacabocado. Las rodajas de papas fueron sometidas a un tratamiento de escaldado a 80 *ºC* durante 5 min previo a la operación de fritado.

Las soluciones de metilcelulosal A4M (Methocel, Dow Chemical, USA) se prepararon al 1% p/p por disolución en agua destilada. Las soluciones fueron homogeneizadas mediante agitación mecánica. Como plastificantes se usaron glicerol o sorbitol a diferentes concentraciones (0,5, 0,75 y 1%).

Se fritaron entre 8 y 10 rodajas de papas por vez en aceite caliente en una freidora eléctrica (Moulinex). Los tiempos y temperaturas de fritado adecuadas se seleccionaron en base a medidas experimentales de humedad y de color. La combinación tiempo-temperatura a partir de la cual se obtuvieron los mejores resultados fueron 2 min y 180 *ºC*.

Los experimentos para determinar la absorción de aceite y la pérdida de agua se realizaron por triplicado.

Caracterización reológica de las formulaciones de metilcelulosa

El comportamiento reológico de las soluciones de metilcelulosa se analizó con un viscosímetro ThermoHaake RheoStress 300 utilizando un sistema sensor de cilindros concéntricos. Las curvas reológicas fueron obtenidas a 25°C con un tiempo de termostatización de 5 minutos. Se determinó el esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de velocidad de cizallamiento (γ) para un barrido de gradientes de velocidad ascendente (entre 0 y 500 s^{-1}) y descendente (de 500 a 0 s^{-1}). Las curvas fueron modeladas con la ley de la potencia (ecuación 1) obteniéndose los parámetros K (índice de consistencia) y n (índice de comportamiento de flujo). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$\tau = k\,\gamma^{n} \qquad \text{ec. (1)}$$

Aplicación de los recubrimientos

Los recubrimientos con y sin agregado de plastificante se aplicaron por inmersión de las papas chips, previamente escaldadas. Las papas con el recubrimiento y las papas control se frieron en aceite de girasol a 180 *ºC* durante 2 min.

Determinación del contenido de agua

Las muestras se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante. Los resultados de la humedad se expresaron como g_{agua} / 100 $g_{sólido\ seco}$.

Determinación del contenido graso

El contenido graso se determinó sobre las muestra de papas previamente secadas en estufa mediante una extracción semicontinua en Soxhlet con una mezcla de éter de petróleo:éter etílico (1:1). Los resultados se expresaron como g_{grasa} / 100 $g_{sólido\ seco}$.

Determinación de color

Los parámetros de color de las muestras de papas sometidas a fritura con y sin agregado de recubrimiento de metilcelulosa fueron determinado usando un colorímetro Minolta colorimeter CR 400 Series (Japan) calibrado con un standard (Y = 93,2, x = 0,3133, y = 0,3192). Se usó la escala CIELab, midiéndose la luminosidad (L) y los parámetros de cromaticidad a* (rojo – verde) y b* (amarillo – azul). Las muestras fueron analizadas por cuatriplicado, realizándose dos medidas por muestra.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) para evaluar el efecto de los factores analizados utilizando el programa Systat (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, USA, 1992) version 5.0. Para los ensayos de comparación de medias se empleó el test de menor diferencia significativa (LSD) con $P < 0,05$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización reológica de las formulaciones de metilcelulosa

En la **Figura 1** se observan los índices K y n obtenidos para las distintas soluciones ensayadas Las soluciones de A4M 1% presentaron comportamiento pseudoplástico para todas las concentraciones de

plastificante utilizadas. El agregado de sorbitol como plastificante afectó significativamente los valores del índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n). Las muestras donde se utilizó glicerol como plastificante no mostraron diferencias significativas en los valores de K y n respecto a las soluciones de metilcelulosa sin plastificante.

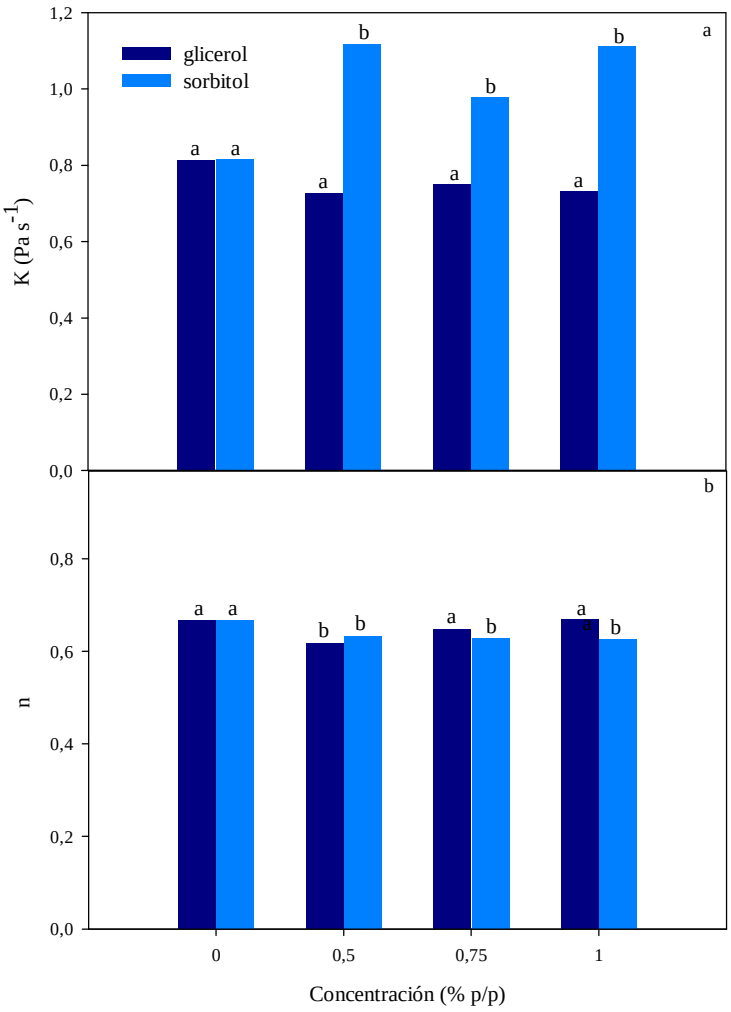


Figura 1. Variación del (a) índice de consistencia K y (b) índice de comportamiento de flujo n, en función de la concentración del plastificante para una solución de A4M 1% con sorbitol o glicerol.

Recubrimientos de metilcelulosa aplicados a papas chips

La utilización de recubrimientos de metilcelulosa redujo la absorción de aceite y aumentó la retención de agua en las muestras de papas fritas. El agregado de sorbitol mejoró las propiedades de barrera de los recubrimientos ya que las muestras disminuyeron la absorción de aceite respecto a las muestras control (sin plastificante) y a las tratadas con glicerol. Los resultado obtenidos de contenido de agua y grasa para las distintas formulaciones analizadas son mostradas en la **Figura 2**.

La concentración de sorbitol más efectiva fue 0,75%; con esta formulación se logró reducir 30% la absorción de aceite respecto de las muestras sin recubrimiento.

La utilización de metilcelulosa resultó ser más efectiva para disminuir la absorción de aceite que el uso de proteínas. Aminlari *et al.* (2005), utilizando papas chips con un recubrimiento en base a proteínas, informaron una reducción en la incorporación de grasa durante el proceso de fritura entre el 5 y el 14%.

Por otra parte, Khalil (1999), trabajando con papas fritas con recubrimientos de pectina con concentraciones entre 1 y 6%, encontró una disminución del contenido graso entre 1,2 y 16,6%, respectivamente. Cuando se usó alginato de sodio como cubierta (con las mismas concentraciones), la disminución estuvo entre 1,2 y 14,3%.

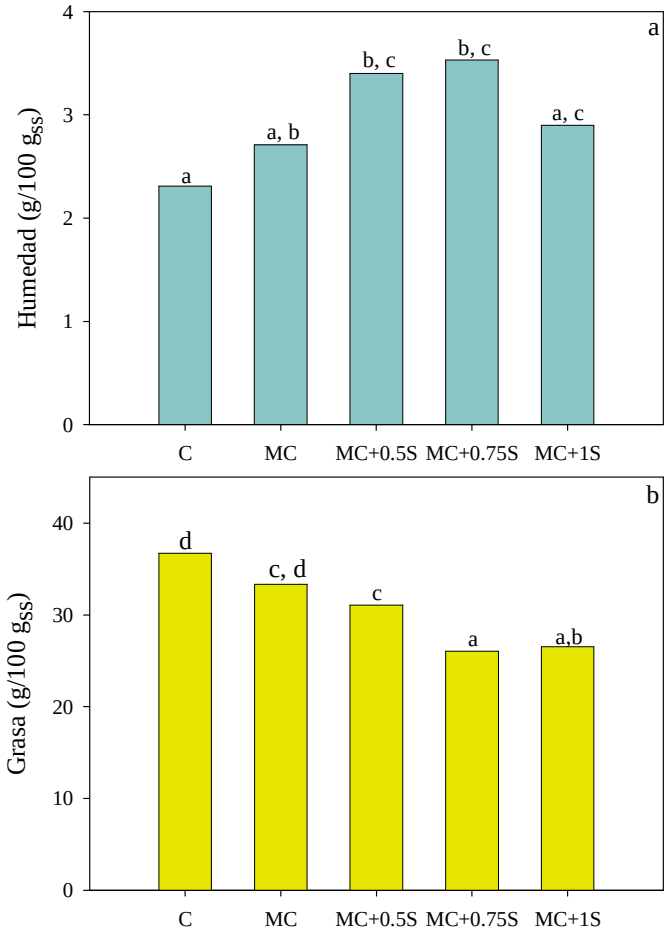


Figura 2. Contenido de humedad (a) y grasa de las papas chips (b), con y sin recubrimientos.
C = control (sin recubrimiento), M = metilcelulosa al 1%, G = glicerol, S = sorbitol.
Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0,05).

En el caso de papas tipo bastón con recubrimientos de metilcelulosa (A4M) con 0,5% de sorbitol se observó una reducción de la absorción de aceite del 40,6% (García *et al.* 2002).

Color

Se realizaron las mediciones de color sobre las muestras control y recubiertas con metilcelulosa al 1% con y sin el agregado de sorbitol en una concentración de 0,75%. Los valores de luminosidad (L) y a^* no presentaron diferencias significativas (P>0,05) independientemente de la formulación del recubrimiento. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las muestras control y las recubiertas para el parámetro b^*, independientemente de la adición del plastificante. Los resultados obtenidos para los parámetros de color son mostrados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Parámetros de color obtenidos para las papas chips sin recubrimiento (C) y recubiertas con metilcelulosa al 1% (M) sin y con el agregado de 0,75% de sorbitol (S).

	L	a^*	b^*
C	$66,26^a$	$1,09^a$	$34,26^b$
M	$65,34^a$	$1,17^a$	$30,06^a$
M + 075% S	$67,49^a$	$1,00^a$	$30,91^a$

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (P< 0,05)

Los valores obtenidos en este trabajo para el parámetro L difieren de los informados por Khalil (1999). En este trabajo se obtuvo un valor de L para el control (papas sin recubrimiento) de 91,5 y con recubrimientos de pectina al 1y 6% los valores de L fueron 86,3 y 79, respectivamente, mientras que

con alginato de sodio la luminosidad permaneció constante en todo el rango de concentraciones ensayado e igual al control.

CONCLUSIONES

- Las soluciones de metilcelulosa al 1% presentaron comportamiento pseudoplástico para todas las concentraciones de plastificante utilizadas, obteniéndose mayores valores de K cuando se utilizó sorbitol y valores similares de n independientemente del tipo de plastificante utilizado.
- La inclusión de un plastificante fue necesaria para mantener la integridad de los recubrimientos, mejorando las propiedades de barrera. La formulación del recubrimiento más efectiva fue de metilcelulosa al 1%, con el agregado de 0,75% de sorbitol; con esta formulación se logró reducir la absorción de aceite en un 30%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aminlari M, Ramezani R, Khalili MH. 2005. Production of Protein-Coated Low-Fat Potato Chips Food Sci Tech Int. 11(3):177–181.

Altonaga, M. 2007. Acción tecnológica de los ingredientes: empanados y rebozados. AZTI-Tecnalia http://www.azti.es

Bouchon P, Pyle DL. 2004. Studying oil absorption in restructured potato chips. Journal of Food Science, 69: 115–122.

Debeaufort F, Voilley A. 1997. Methylcellulose-based edible films and coatings: 2. Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer content. J. Agric. Food Chem.: 45, 685-689.

García MA, Ferrero C, Bértola N, Martino MN, Zaritzky NE. 2002. Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 3-4: 391-397.

Juárez MD, Alfaro M E, Sammán N. 2004. Nutrient retention factors of deep-fried milanesas. Journal of Food Composition and Analysis: 17(1), 119-124.

Khalil AH. 1999. Quality of French fried potatoes as influenced by coating with hydrocolloids. Food Chemistry, 66: 201-208.

Mackinson, J.H., Greenfield, H., Wong, M.L.; Willis, R.B.H., 1987, Fat uptake during deep-fat frying of coated and uncoated foods. J. Composition Anal: 1, 93-101.

Mallikarjunan P, Chinnan MS, Balasubramaniam VM, Phillips RD. 1997. Edible coatings for deep-fat frying of starchy products. Food Science and Technology–Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie: 30, 709–714.

Mellema M. 2003. Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. Trends in Food Science and Technology, 14: 364–373.

Pinthus EJ, Weinberg P, Saguy IS. 1992. Gel-strength in restructured potato products a.ects oil uptake during deep-fat frying. Journal of Food Science, 57: 1359–1360.

Pinthus EJ, Weinberg P, Saguy IS. 1993. Criterion for oil uptake during deep-fat frying. Journal of Food Science, 58: 204-208.

Pinthus EJ, Weinberg P, Saguy IS. 1995a. Oil uptake in deep fat frying as a.ected by porosity. Journal of Food Science, 60: 767–769.

Pinthus EJ, Weinberg P, Saguy IS. 1995b. Deep-fat fried potato product oil uptake as affected by crust physical-properties. Journal of Food Science, 60: 770–772.

Smith LM, Clifford AJ, Creveling RK, Hamlin CL. 1985. Lipid content and fatty acid profiles of various deep-fat fried foods. JAOCS: 62, 996-999.

Williams R, Mittal GS. 1999a. Low-fat fried foods with edible coatings: modeling and simulation. Journal of Food Science, 64: 317–322.

Williams R, Mittal GS. 1999b. Water and fat transfer properties of polysaccharide films on fried pastry mix. Food Science and Technology –Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. 32: 440–445.

Saguy IS, Dana D. 2003. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. J. Food Eng. 56: 143-152.

Shyu SL, Hwang LS. 2001. Effects of processing conditions on the quality of vacuum fried apple chips. Food Res. Intl. 34: 133-142.

Southern CR, Chen XD, Farid MM, Howard B, Eyres L. 2000. Determining internal oil uptake and water content of fried thin potato crisps. Food and Bioproducts Processing, 78: 119–125.

Películas de mezclas de proteína de suero lácteo, pectina y carboximetilcelulosa: microestructura y propiedades de deshidratación

Films of whey proteins, pectine and carboxymethylcelullose mix: microstructure and deshydration properties

Villa GM (1), Guzmán MJ (1), San Martín ME (1), Pedroza-Islas R (1,2)

(1) Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Legaria 694. 11500 México D.F.
(2) Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas. Programa de Ingeniería de Alimentos. Universidad Iberoamericana, Prol. Paseo de la Reforma 880, Lomas de Santa Fe, 01219, México D.F.
maty_vg@yahoo.com.mx

RESUMEN
La utilización de proteínas y polisacáridos para el diseño de cubiertas y películas comestibles en la industria farmacéutica y alimentaria se ha incrementado en los últimos años. Para la selección adecuada de dichos biopolímeros en función de los requerimientos específicos de las aplicaciones a que se destinen, es necesario desarrollar estrategias para determinar sus propiedades y predecir su comportamiento como material envolvente. Por ello se planteó, la determinación del efecto del tratamiento térmico de las proteínas (80 *ºC*/30 min), sobre la Energía de Activación durante el secado, de mezclas de proteína aislada de suero lácteo, pectina y carboximetilcelulosa, así como el efecto en la microestructura de las películas obtenidas**.** De las mezclas con proteína de suero lácteo, la de mayor valor de energía de activación (32,01 kJ/mol) fue la combinación con pectina y carboximetilcelulosa. sin tratamiento térmico. Mientras que la mezcla de pectina con carboximetilcelulosa alcanzó un valor mayor (36,85 kJ/mol), lo que podría sugerir mejores propiedades como material de barrera. El tratamiento térmico de las proteínas afectó la microestructura de las películas haciéndolas más compactas, mientras que sin tratamiento térmico, la estructuración de la película fue laminada.

ABSTRACT
Pharmaceutical and food industries have been using proteins and polysaccharides for designing edible films and coatings. For this task, it is important to choose appropriately which biopolymers might be useful according to specific requirements and applications. In addition, it is necessary to develop new strategies to determine and understand their properties and to predict their behavior when used as a coating material. The objective of this work was to study the effects of a thermal treatment on proteins (80 °C/30 min), on the activation energy during drying, on blends of whey proteins and the polysaccharides pectin, and carboxylmethylcellulose. Furthermore, the microstructure of the films obtained was also studied. Among the blends that contained whey protein, as well as pectin, and carboxylmetylcellulose, the highest activation energy (32,01 kJ/mol), was obtained when the protein in the mixture was not heat treated. While the mixture of pectin, and carboxylmetylcellulose reached activation energy of 36,85 kJ/mol. The last result might suggest a material with better barrier properties. The thermal treatment of the proteins affected the microstructure of the films. The films from thermally treated protein resulted more compacted. On the other hand, films where protein was not heated showed a laminated microstructure.

PALABRAS CLAVE: *biopolímeros, cubiertas entéricas, microestructura.*

KEYWORDS: *biopolymers, enteric coatings, microstructure.*

INTRODUCCIÓN
El uso de polímeros naturales para el diseño de cubiertas y películas comestibles con propiedades específicas en la industria farmacéutica y alimentaria se ha venido incrementando en los últimos años

ya que han sido reconocidos como seguros, son de amplia disponibilidad y son biodegradables (Immirzi *et al.* 2003).

Entre los biopolímeros utilizados con mayor frecuencia se pueden citar algunos polisacáridos (pectina, almidón, derivados de celulosa) y proteínas (proteínas lácteas, zeína, proteína de soja, etc) principalmente. Todos ellos actúan como barrera al transporte de gases (CO_2 y O_2) y al vapor de agua, pero además podrían ser usados como vehículos transportadores de fármacos o de ingredientes funcionales y facilitar su liberación en sitios específicos del organismo (Immirzi *et al.* 2003).

Por ejemplo, la pectina es un polisacárido lineal, compuesto por ácido galacturónico con cadenas laterales de rhamnosa, galactosa y arabinosa, refractaria en el ambiente gástrico y a las enzimas del intestino delgado, pero es casi completamente degradada por las enzimas bacterianas del colon produciendo una serie de oligogalacturonatos. Si se utiliza como material acarreador, al contacto con los fluidos gastrointestinales, se hincha lo que puede ocasionar la liberación del material que llevaban atrapado, de ahí la necesidad de combinarla con otro biopolímero menos soluble que genere una restricción a la entrada de agua (Chourasia y Jain 2004).

Se han utilizado derivados de celulosa en combinación con pectina para producir cubiertas entéricas, basándose en la suposición de que el arribo al colon requiere de 6 h, lo que corresponde a un 25-35% de erosión en el sistema pectina-HPMC (Turkoglu y Ugurlu 2002).

También se han evaluado mezclas de derivados de celulosa, como celulosa microcristalina e hidroxietilcelulosa buscando regular la erosión del material (Álvarez *et al.* 2004).

Espinoza (2008), encontró que de entre varios derivados de celulosa, la CMC exhibió las mejores propiedades mecánicas cuando se evaluó como película y una energía de activación (E_a) considerada como media (27.08 kJ/mol). Este derivado de celulosa, en combinación con proteínas aisladas de suero lácteo, produjo películas con menor disolución en fluido gastrointestinal simulado y con mejores características de hinchamiento.

Las proteínas aisladas del suero lácteo han recibido gran atención por sus atributos tanto funcionales como nutricionales. Se trata de una mezcla de proteínas entre las que predominan la β-lactoglobulina y la α-lactoalbúmina. Estas proteínas pueden formar películas transparentes que ofrecen barrera a la transferencia de oxígeno, aceite y aromas (Fang *et al.* 2002). Sin embargo, por su naturaleza hidrofílica son una barrera limitada a la humedad. Sus películas exhiben pobres propiedades mecánicas por lo que es necesaria la adición de plastificantes para lograr la flexibilidad (McHugh *et al.* 1994)

Por lo general, se requiere utilizar más de un componente en la formación de las películas o recubrimientos, ya que uno sólo, por sí mismo, no puede proporcionar todas las características necesarias ya sea como barrera o bien, relacionadas a la resistencia mecánica y a los mecanismos de liberación.

La apropiada selección de los biopolímeros para cubrir los requerimientos que debe tener una cubierta o una película, demanda la caracterización de las propiedades tanto de los materiales que la conforman, como del efecto del procesamiento térmico involucrado.

La construcción de curvas de secado en las que la propiedad de un material es caracterizado por la dependencia de la velocidad de secado isotérmico con relación al contenido de humedad, ha sido propuesta por Matsuno y Adachi (1993), como una estrategia para seleccionar materiales adecuados para el recubrimiento de lípidos. La tasa de secado isotérmico produce curvas características y está gobernada por la velocidad de difusión del agua en el material bajo estudio, lo que podría reflejar las propiedades de la matriz que conforma la película: cuanto más fina y más densa es la matriz, menor es la tasa de secado.

Pérez-Alonso *et al.* (2003) propusieron un método cuantitativo, para discriminar mezclas de biopolímeros por medio del secado isotérmico en un analizador termogravimétrico. Estimaron la Ea considerando que la difusividad efectiva sigue una relación tipo-Arrhenius y sugirieron que la Ea es un buen parámetro para la discriminación cuantitativa en la selección de materiales de recubrimiento barrera al oxígeno, es decir, que proporcionan protección contra la deterioración oxidativa. Posteriormente, Rodríguez-Huezo *et al.* (2007) corroboraron que la Ea es un parámetro importante, consistente y reproducible para la selección de materiales para encapsulación por secado por aspersión.

Se planteó como objetivo del presente trabajo, la determinación del efecto del tratamiento térmico de las proteínas, sobre la Ea de las mezclas de proteína aislada de suero lácteo, pectina y carboximetilcelulosa, así como el efecto sobre la microestructura de las películas generadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizó proteína aislada de suero de leche (WPI) con 95-97% de proteína (Bipro Davisco Foods Internacional Inc., EUA), pectina cítrica (P) (Grindsted RS 400, Danisco Méxicana, S. A. de C. V., México) y carboximetilcelulosa sódica (Aqualon® Cellulose gum CMC, 7LF PH, Hércules Incorporated, EUA).

Desarrollo de las curvas de secado

Se prepararon dispersiones acuosas al 5% (p/v) de cada uno de los polisacáridos (**Tabla 1**) y se dejaron en reposo durante 17 h antes de usarse, para asegurar su completa hidratación. La WPI fue sometida a dos tipos de tratamiento: dispersión sin tratamiento térmico (SD) y dispersión con calentamiento a 80 °C durante 30 min (D) (McHugh *et al.* 1994). Los materiales, una vez disueltos por separado, se mezclaron a continuación de acuerdo al diseño experimental que se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Formulaciones de las mezclas de biopolímeros

Mezclas	WPI (g)	P (g)	CMC (g)
WPI: P	3,52	1,47	0,00
WPI: CMC	4,00	0,00	1,00
P: CMC	0,00	3,07	1,92
WPI: CMC: P	3,03	0,75	1,21

WPI: proteína aislada de suero de leche, P: pectina cítrica, CMC: carboximetilcelulosa sódica

Para obtener las curvas de secado isotérmico de las mezclas de biopolímeros, se utilizó un analizador de humedad (Hr83, Mettler-Toledo S.A. de C.V., México) con exactitud de ± 0.01 g. Se colocó 1 mL de dispersión en la platina de aluminio provista de un molde circular de diámetro interno 21.9 mm y 3.0 mm de profundidad, con el propósito de normalizar el área de contacto del líquido con la platina. Cada dispersión fue secada isotérmicamente a 50, 72 y 92 °C durante 120 min (Montes *et al.* 2008). Posteriormente se modeló el periodo de velocidad decreciente de secado utilizando la segunda ley de Fick, donde el coeficiente de difusividad efectiva (D_e) es una función que depende de la temperatura (Pérez-Alonso 2003, Montes *et al.* 2008).

Los valores de E_a se calcularon a partir de los datos de D_e obtenidos para cada mezcla de acuerdo a la siguiente ecuación (Pérez-Alonso *et al.* 2003):

$$D_e = D_o \exp [-E_a/RT]$$

donde R corresponde a la constante universal de los gases (8.314 x 10^{-3} kJ/mol K), D_o es el factor de Arrhenius en m^2/s, E_a es la energía de activación en kJ/mol y T la temperatura absoluta (K).

Microestructura de las películas

La microestructura de las películas obtenidas tras el proceso de deshidratación, se determinó por microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un microscopio JEOL-JSM-6390LV (Jeol LTD, Akishima, Japón) con voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras fueron colocadas en un portamuestras modificado, que permitía la observación en ángulo de 90°. Las muestras se adhirieron utilizando una cinta adhesiva de doble cara y se recubrieron con una fina capa de oro usando un evaporador (Sputering Jeol-JFC-1100, Jeol LTD.K, Akishima, Japon) durante 120 s con una corriente de 40 mA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de la E_a obtenidos para cada mezcla se presentan en la **Tabla 2**, donde se distingue el efecto de la aplicación de tratamiento térmico previo a las proteínas de suero lácteo.

Se observa que la ausencia de un tratamiento térmico para la mezcla WPI: P da lugar a valores de E_a más elevados (24,74 kJ/mol), de lo que se infiere que las películas de esta mezcla pueden ser más resistentes a la oxidación. En el caso de la mezcla WPI:CMC, se mantuvo la misma tendencia, obteniéndose un valor de Ea menor que en el caso anterior (23,51 kJ/mol) lo que indica que el tipo de polisacárido en interacción con la proteína, afecta la E_a. En ambos casos, cuando se aplicó un tratamiento térmico previo a las proteínas, el valor de E_a fue menor.

Tabla 2. Valores de Energía de activación para la evaporación del agua de las soluciones de biopolímeros.

Mezclas	Energía de activación (kJ/mol)	
	D	SD
WPI: P	21,16	24,72
WPI: CMC	20,06	23,51
WPI: CMC: P	23,03	32,01
P: CMC	36,85	

McHugh y Krochta (1994) estudiaron la optimización de las condiciones para formar películas de proteínas de suero lácteo y reportan que un tratamiento térmico de 90 *ºC* durante 30 min, es necesario para poder formar películas intactas. Esas películas fueron caracterizadas como insolubles en agua lo cual sería favorable para evitar su desintegración. El tratamiento térmico causa la desnaturalización de las proteínas, dejando expuestos sus grupos sulfhidrilo internos, promoviendo la formación de puentes disulfuro (Shimada y Cheftel 1998). No obstante, ha sido demostrado que la inhibición de la formación de los puentes disulfuro utilizando cierto tipo de agentes químicos, no impide la formación de películas de proteínas de suero lácteo (Fairley *et al.* 1996).

En el presente estudio pudo observarse que la presencia de otros biopolímeros en combinación con las proteínas de suero lácteo, favorecieron la obtención de películas aún con bajas concentraciones de proteína en la solución (< 5%).

La mezcla de los dos polisacáridos (P y CMC) fue la que alcanzó la mayor E_a de evaporación de agua en relación con las mezclas de proteína-polisacárido. Pérez-Alonso *et al.* (2006), mencionan que mientras mayor sea la E_a requerida para la evaporación, más adecuado es el material de recubrimiento contra los procesos de oxidación.

La microestructura de las películas formadas se observa en las **Figuras 1**-**4**. El tratamiento térmico aplicado a WPI, sugiere que la desnaturalización favorece la interacción entre los componentes que conforman la película, y genera por tanto, una estructura diferente a la obtenida cuando no se desnaturalizó WPI. Es notable la estructuración laminar de la mayoría de las películas. Ya ha sido mencionado que en las películas basadas en proteínas, las interacciones proteína-proteína determinan las características de la película. En la **Figura 1a** puede observarse una orientación estructural en la película elaborada con la mezcla WPI:P, mientras que esta tendencia de organización no fue observada cuando se usó WPI SD (**Figura 1b** y **1c**). La WPI nativa, mantiene su estructura globular con los grupos sulfhidrilo hacia el interior de la molécula, mientras que el tratamiento térmico, desnaturaliza la estructura original promoviendo la interacción proteína-proteína (Pérez-Gago *et al.* 1999); las diferencias mencionadas influyeron por tanto, en la estructura de las películas obtenidas. Sperberg *et al.* (2009) estudiando interacciones entre β-lactoglobulina y pectina, mencionan que las macromoléculas son co-solubles cuando se encuentran negativamente cargadas. Se pueden formar complejos solubles cuando las proteínas se unen a un polisacárido, formando un complejo con la misma carga que la del polisacárido. Dicho complejo se estabiliza por repulsión electrostática. Ello ocurre por encima del punto isoeléctrico (pI) de la proteína, debido a la presencia de "parches" cargados positivamente o por la regulación de carga del sistema proteína-polisacárido.

Sperber *et al.* (2009) estudiaron la formación de complejos entre β-lactoglobulina, proteína presente en mayor proporción en las WPI, y pectinas de diferentes características fisicoquímicas. A pH de 5,4, ligeramente arriba del pI de la β-lactoglobulina, cuando ambas macromoléculas están cargadas negativamente, son co-solubles.

La cohesión en las películas con WPI D, obedece a reacciones de entrecruzamiento, mientras que en las que se utilizó WPI SD, la interacción es más bien por puentes de hidrógeno. Lo anterior, de acuerdo con Pérez-Gago *et al.* (1999), tiene efecto sobre la solubilidad de las películas de WPI, ya que

el tratamiento térmico permite que la integridad de la película se mantenga cuando se sumerge en agua, mientras que las películas de WPI sin desnaturalizar se disuelven rápidamente al contacto con el agua.

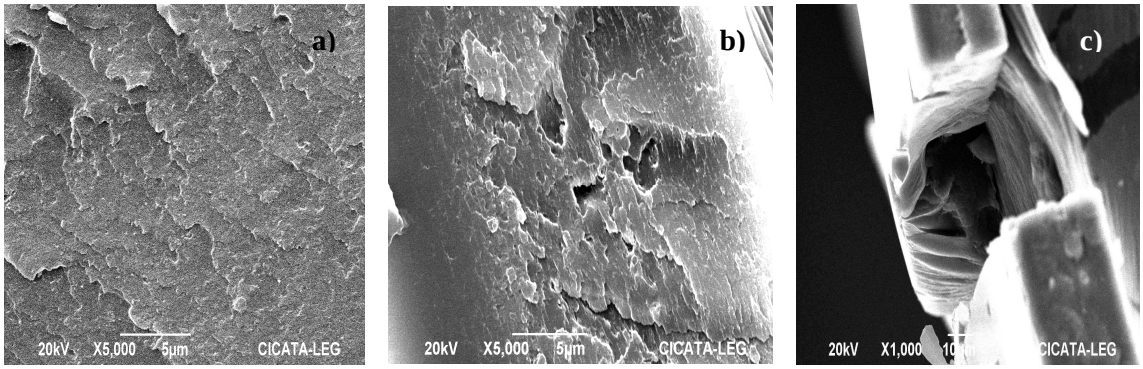


Figura 1. Micrografías de películas de WPI:P. a) WPI desnaturalizado; b) WPI sin desnaturalizar; c) corte transversal de una película de WPI sin desnaturalizar.

En la **Figura 2** puede observarse el efecto que el tratamiento térmico aplicado a las proteínas, produjo en la microestructura de las películas de la mezcla WPI:CMC. Pareciera que ocurre una mayor interacción entre los componentes (**Figura 2a**) al mostrar estructuras más integradas y suaves. Por el contrario, en las **Figuras 2b** y **2c**, que corresponden a películas sin tratamiento térmico sobre las proteínas, se observan agregados lo que podría sugerir una separación de componentes.

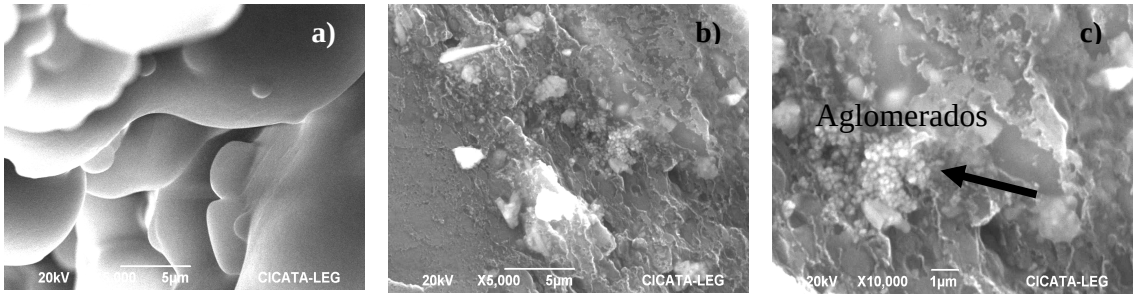


Figura 2. Micrografías de películas de WPI:CMC, a) con WPI desnaturalizado; b y c) con WPI sin desnaturalizar.

McClements (2006) menciona que cuando dos biopolímeros diferentes son mezclados entre sí, pueden formar ya sea un sistema de una fase o uno de dos fases, dependiendo de la naturaleza de los biopolímeros involucrados y las condiciones prevalecientes en la solución. En un sistema de una fase, los dos biopolímeros pueden existir ya sea como moléculas individuales o como complejos solubles distribuidos en el sistema. En un sistema de dos fases, la solución se separa en dos fases distintas con composición diferente. Esa separación de fases puede ocurrir como una separación segregativa debida a una repulsión relativamente fuerte entre los dos tipos de biopolímeros cuando se encuentran con cargas eléctricas similares. Al mantener a las proteínas en su forma nativa y a un pH ligeramente superior al del punto isoeléctrico, no hay sitios positivos superficiales expuestos, la carga neta es negativa lo que podría no favorecer la interacción con el polisacárido que es un polianión. Posiblemente, los dos tipos estructurales que se distinguen en las micrografías de la **Figura 2b** y **2c**, correspondan a cada tipo de biopolímero por separado.

Por otra parte, el pH de las soluciones de las mezclas de WPI ya sea con P o con CMC, tuvieron valores de 5,40 y 6,65 respectivamente, lo que las ubica arriba del pI de las proteínas del suero lácteo. Ello podría promover interacciones repulsivas en el sistema debido a que tanto las proteínas como los polisacáridos, tendrían carga neta negativa. No obstante, aunque haya repulsión electrostática, es posible la interacción entre polisacáridos y proteínas, cuando la proteína ha sido tratada térmicamente. Zhao *et al.* (2008) encontraron que la albúmina de suero de bovino, al ser desnaturalizada disminuía sus cargas negativas al estar en valores de pH por encima del punto isoeléctrico y que sus cargas

positivas en la superficie de la proteína se incrementaban, permitiendo la interacción con polisacáridos (polianiones) y favoreciendo la interacción hidrofóbica. Los iones sodio disociados de la CMC, actúan como contraiones sobre la proteína acentuando la posibilidad de interacción entre la proteína y las cadenas polisacáridas.

Peterson *et al.* (2005) señalan que la morfología y la microestructura de las películas formadas, depende de la cinética de separación de fases en conexión con el proceso de evaporación del solvente. El comportamiento de los polímeros es diferente en la superficie externa en comparación con el total de la solución, debido a las interacciones con la superficie. El enriquecimiento de la superficie puede ocurrir cuando uno de los polímeros es atraído hacia la superficie. Entonces pueden surgir dos zonas, una rica en un biopolímero y otra rica en el otro.

La **Figura 3** muestra la microestructura de las películas formadas por tres componentes (WPI, CMC y P), donde se observan las diferencias estructurales debidas al tratamiento térmico aplicado a las proteínas (**Figura 3a**) en relación con la estructura formada cuando no hubo un tratamiento con calor (**Figuras 3b** y **3c**).

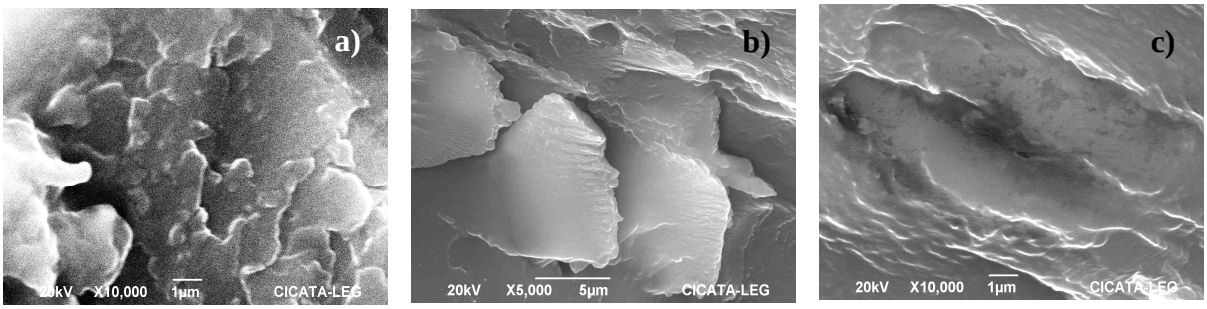


Figura 3. Micrografías de películas de WPI:CMC:P, a) con WPI desnaturalizado; b) y c) con WPI sin desnaturalizar.

En la **Figura 4** se muestra una micrografía representativa de la estructura de la película obtenida con la mezcla entre polisacáridos (P:CMC).

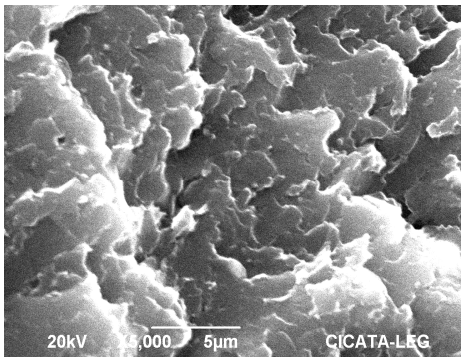


Figura 4. Micrografía de la película de mezcla de polisacáridos: P y CMC.

CONCLUSIONES

La desnaturalización de la WPI permitió tener estructuras laminares compactas, fusionadas y de bordes suaves posiblemente por una mayor interacción con los polisacáridos, mientras que las películas donde la WPI no fue desnaturalizada, se observaron estructuras laminadas muy bien delineadas no compactas y en el caso de las mezclas de proteína:CMC pudo observarse diferentes estructuras dentro de la misma película lo que podría sugerir segregación. Con respecto a la E_a, el tratamiento térmico aplicado a las proteínas disminuyó este parámetro, produciendo películas menos resistentes a reacciones. La E_a varió en función de los materiales utilizados y sus mezclas. Las de proteínas y polisacáridos dieron lugar a menores valores de Ea que las de polisacárido-polisacárido. Se sugiere que el solo valor de Ea no podría ser un criterio suficiente para seleccionar un material, ya que

hay que considerar otras propiedades en función de la aplicación que se requiera, manteniéndose la necesidad de caracterizar los materiales potencialmente útiles o sus mezclas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la amable orientación proporcionada por el Dr. José Luis Fernández y las facilidades para realizar las curvas de secado. También agradecemos al Dr. Miguel Frutis su apoyo en la revisión del manuscrito. La autora Villa agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez-Fuentes M, Fernández-Arévalo ML, González-Rodríguez M, Cirri M, Mura P. 2004. Development of enteric-coated time-released matrix tablets for colon targeting. Journal of Drug Targeting, 12: 607-612.

Chourasia MK, Jain SK. 2003. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6(1): 33-66.

Espinoza HNL. 2008. Caracterización de biopolímeros y su aplicación en la microencapsulación de probióticos de liberación específica. Tesis doctoral. CICATA. IPN. México.

Fairley P, Monahan JB, German JB, Krochta JM. 1996. Mechanical properties and water vapour permeability of edible films from whey protein isolate and dodecyl sulphate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 438-443.

Immirzi B, Malinconico M, Romano G, Russo R, Santagata G. 2003. Biodegradable films of natural polysaccharides blends. Journal of Materials Science Letters, 22: 1389-1392.

Matsuno R, Adachi S. 1993. Lipid Encapsulation technology-techniques and applications to food, Trends in Food Science and Technology, 4: 256-261.

McClements DJ. 2006. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. Biotechnology Advances, 24: 621-625.

McHugh TH, Krotcha JM. 1994. Permeability properties of edible films. En: Edible coating and films to improve food quality, Krotcha JM, Baldwin EA, Nisperos-Carriedo NO, eds. Technomic Publishing. Co. Inc., Lancaster, EUA. Pp. 139-188.

McHugh TH, Aujard JF, Krochta JM. 1994. Plasticized whey protein edible films: water vapour permeability properties. Journal of Food Science, 59 (2): 416-423.

Montes EJ, Torres R, Andrade RD, Pérez AO, Marimon JL, Meza I. 2008. Modelling the kinetics of thin layer yam (*Dioscorea rotundata*) drying. Revista Ingeniería e Investigación, 2(28): 45-52.

Pérez-Alonso C, Báez-González JG, Beristain CI, Vernon-Carter EJ, Vizcarra-Mendoza MG. 2003. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as a selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. Carbohydrate Polymers, 53: 197-203.

Pérez-Alonso C, Beristain CI, Lobato-Calleros C, Rodríguez-Huezo ME, Vernon-Carter EJ. 2006. Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. Journal of Food Engineering, 77: 753-760.

Pérez-Gago MB, Nadaud P, Krochta JM. 1999. Water vapour permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. Journal of Food Science, 64 (6): 1034-1037.

Petersson M, Lorén N, Stading M. 2005. Characterization of phase separation in film forming biopolymer mixtures. Biomacromolecules, 6: 932-941.

Rodríguez-Huezo ME, Durán-Lugo R, Prado-Barragán LA, Cruz-Sosa F, Lobato-Calleros C, Alvarez-Ramírez J, Vernon-Carter EJ. 2007. Pre-selection of protective colloids for anhaced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, an evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. Food Reserach International, 40: 1299-1306.

Shimada K, Cheftel JC. 1998. Sulfhydryl group disulfide bond interchange during heat induced gelation of whey proteína isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37: 161-168.

Sperber B, Schols HA, Cohen Stuart MA, Norde W. 2009. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β-lactoglobulin. Food Hydrocolloids, 23: 765-772.

Turkoglu M, Ugurlu T. 2002. In Vitro evaluation of pectin-HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colonic delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 53: 65-73.

Zhao Y, Li F, Carvajal T, Harris MT. 2009. Interactions between bovine serum albumin and alginate: An evaluation of alginate as protein carrier. Journal of Colloid and Interface, 332 (2): 345-353.

Estudio de la agregación y gelificación del suero lácteo con extracto de té verde

Study of aggregation and gelation of whey with green tea extract

Von Staszewski M (1,3), Pilosof AMR (2,3)

(1) Dpto. de Ingeniería Química, FI, UBA, Ciudad Universitaria, Núñez (1428), CABA, Argentina.
(2) Dpto. de Industrias, FCEN, UBA, Ciudad Universitaria, Núñez (1428), CABA, Argentina.
(3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
apilosof@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Los extractos de té verde están siendo ampliamente utilizados en alimentos debido a sus propiedades benéficas para la salud. Estos efectos saludables se atribuyen al alto contenido de polifenoles, en particular a las catequinas. Está demostrado que estas catequinas pueden interactuar con las proteínas presentes en los alimentos a los cuales se las incorpora, formando complejos solubles o insolubles. Estas interacciones catequina-proteína podrían alterar distintas propiedades funcionales de los alimentos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las características de agregación y gelificación de concentrado de suero lácteo en presencia de extracto de té verde. Las muestras (WPC35 8% y 30%; extracto de té verde 0,25%, 0,5% y 1%) fueron preparadas a pH 4,5 y 6,0. Los agregados formados se analizaron en el tiempo con un equipo de dispersión dinámica de la luz y la gelificación se caracterizó mediante estudios de reometría dinámica y textura de los geles. Cuando se analizaron las características de los agregados formados a pH 4,5 se observó que el diámetro promedio superficial ($D_{3,2}$) de las muestras con 1% de extracto de té verde aumentó significativamente en el tiempo comparado con el control. A su vez, el diámetro promedio $D_{4,3}$ también se vio modificado en estas muestras a lo largo del almacenamiento aunque el valor de éste ya era superior al día cero. A pH 6.0 se observan comportamientos similares del $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ tanto para las muestras con 0,5% como 1% de extracto de té verde. Los parámetros G´ y G´´ de los geles a 35 *ºC* aumentaron en las muestras con extracto de té verde a pH 4,5. A pH 6,0 no se observaron diferencias significativas. Contrariamente, el análisis del perfil de textura indicó una mayor dureza y adhesividad para los geles con extracto de té verde a pH 6,0, mientras que a pH 4,5 no hubo diferencias. Los resultados obtenidos indican que la utilización de té verde en suero lácteo induce la formación de agregados con las proteínas del suero y puede modificar las características de gelificación y textura de los geles obtenidos. Estos cambios dependen ampliamente del pH evaluado.

ABSTRACT

Green tea extracts are being widely used in food products due to their health-promoting properties. These healthy effects are attributed to the high polyphenol content, particularly catechins. It is demonstrated that catechins can interact with food proteins leading to the formation of soluble or insoluble complexes. These catechin-protein interactions could alter functional properties of foods. The objective of the present work was to study the aggregation and gelation characteristics of whey protein concentrated in the presence of green tea extract. Samples (WPC35 8% and 30%; green tea extract 0%, 0.25%, 0.5% and 1%) were prepared at pH 4.5 and 6.0. The resulted aggregates were analysed with light scattering equipment, while gelation were characterised by dynamic rheometry studies and texture of the gels. At pH 4.5, the aggregates formed with 1% tea extract showed a significant increase in the mean diameter ($D_{3,2}$) over time as compared to the control sample. The aggregates mean volume ($D_{4,3}$) was modified in those samples too, although differences were evident at 24 hs. Similar behaviour of $D_{3,2}$ and $D_{4,3}$ was observed for the samples at pH 6.0 with 0.5% and 1% green tea extract. The G´ and G´´ parameters of gels at 35 *ºC* increased in the samples with green tea extract at pH 4.5, while no significant differences were observed at pH 6.0. On the contrary, the texture profile analysis indicated a higher hardness and adhesiveness for gels with green tea extract at pH 6.0, while at pH 4.5 the values remained constant. The results obtained indicate that the utilization

of green tea extract in liquid cheese whey induces the formation of aggregates with whey proteins and could modify gelation characteristics and gel texture. These changes are pH dependant.

PALABRAS CLAVE: *Té verde, suero lácteo, agregación, gelificación.*

KEYWORDS: *Green tea, cheese whey, aggregation, gelation.*

INTRODUCCIÓN

El té verde ha despertado gran interés debido a que se le han adjudicado beneficios para la salud, particularmente en la prevención de varios tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Estos efectos saludables se atribuyen al alto contenido de polifenoles, en particular a las catequinas (Scalbert *et al.* 2005). Como consecuencia, extractos de té verde están siendo ampliamente utilizados en diversos alimentos, desde derivados de cereales hasta productos lácteos (Wang *et al.* 2000). Aquellos productos que incorporan en su formulación algún aditivo o ingrediente que cumpla una función fisiológica benéfica para la salud del consumidor son denominados "alimentos funcionales". Sin embargo, la estabilidad de los polifenoles y su interacción con los constituyentes de los alimentos debe ser tenida en cuenta al momento de desarrollar un producto comercial (Yilmaz 2006). Numerosos trabajos demuestran que las catequinas presentes en el té verde pueden interactuar con las proteínas y otros componentes como aminoácidos, fosfolípidos y azúcares presentes en los sistemas en los que se los incorpora, formando complejos solubles e insolubles (Siebert *et al.* 1996, Richard *et al.* 2006, He *et al.* 2006a, He *et al.* 2006b). Estas interacciones catequina-proteína podrían alterar distintas características y propiedades funcionales de los alimentos. De hecho, se ha observado que las catequinas del té verde pueden mejorar la estabilidad térmica de geles de colágeno sin modificar su estructura nativa (Madhan *et al.* 2005) o actuar como "cross-linkers" en geles de gelatina, los cuales presentan mayor fuerza mecánica y estabilidad térmica (Strauss y Gibson 2004). Balange y Benjakul (2009) también obtuvieron geles de surimi más fuertes al incorporar polifenoles en los mismos. Por el contrario, Rubino *et al.* (1996) observaron que la utilización de compuestos fenólicos disminuyó la estructura de geles de proteína de canola.

Los productos derivados del suero lácteo son ingredientes de gran importancia debido a sus propiedades funcionales tecnológicas como la gelación, la emulsificación y la capacidad de espumado. La incorporación de un aditivo como los extractos de té verde podría interaccionar e influir en el comportamiento de sistemas de lactosuero. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las características de agregación y gelificación de concentrado de suero lácteo en presencia de extracto de té verde.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Para los ensayos reológicos y de textura de los geles, se prepararon suspensiones al 30% de suero lácteo a partir de concentrado proteico de suero en polvo (WPC35); mientras que para los ensayos de agregación las muestras se hicieron con un 8% de suero. A ambos tipos de muestras se les agregó extracto comercial de té verde en las siguientes concentraciones: 0%, 0.25%, 0.5% y 1%. Las muestras fueron llevadas a pH (4.5 y 6.0) con ácido clohídrico 0.5N e hidróxido de sodio 0.5N y almacenadas durante una noche a 4 ^{o}C para una completa hidratación y eliminación de aire.

Ensayos de precipitación

Las muestras con 8% de suero y las distintas concentraciones de extracto de té verde se colocaron en tubos de vidrio de 5mL graduados y se registró en el tiempo el volumen de la fase superior que resultó de la precipitación generada. Los mismos se almacenaron a 20 ^{o}C durante 8 días. Cada muestra se realizó por duplicado para cada pH evaluado.

Ensayos de agregación en el tiempo

En las mismas muestras del ensayo anterior se determinó, previa agitación, la distribución del tamaño de partículas mediante dispersión dinámica de la luz (Malvern Mastersizer 2000). A partir de los datos obtenidos se calcularon el diámetro promedio superficial ($D_{3,2}$) y el diámetro promedio en volumen ($D_{4,3}$) para cada muestra.

Ensayos de Reometría dinámica

Las mediciones de oscilación dinámica se realizaron en un reómetro de stress controlado Paar Physica (MCR300). Las muestras fueron colocadas en el plato inferior de un sistema de platos paralelos, con un gap de 1mm. La temperatura del plato inferior fue controlada con un sistema Peltier (Viscotherm VT2, Phaar Physica), y para evitar la evaporación en la muestra se colocó silicona líquida en las superficies expuestas. Durante los experimentos de gelificación, la frecuencia fue de 1 Hz y la deformación se mantuvo en 0.01%, valores que se encuentran dentro de la región viscoelástica lineal obtenidos en experimentos preliminares. Las muestras fueron calentadas desde 25 *ºC* hasta 90 *ºC* con una velocidad de 10 *ºC*/min. y luego mantenidas a 90 *ºC* durante 15 minutos, tiempo suficiente como para permitir que el módulo elástico (G´) llegue a un equilibrio. Por último fueron enfriadas a 35 *ºC* con una velocidad de 25 *ºC*/min. Las propiedades dinámicas de los geles formados fueron medidas en función de la frecuencia de oscilación a 25 *ºC* utilizando la misma amplitud de deformación. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Ensayos de Textura de los geles

Los geles fueron preparados en pequeños tubos de vidrio cilíndricos (13mm de diámetro x 55mm de alto) con 4 ml de muestra, mediante calentamiento a 90 *ºC* durante 20 minutos en un baño seco. Previo a la colocación de la muestra los tubos fueron recubiertos en su interior con una delgada capa de silicona líquida. Luego del calentamiento los geles se colocaron inmediatamente en un baño de agua con hielo y se almacenaron durante una noche a 4 *ºC*. Una vez desmoldados se cortaron en piezas iguales de 13mm de diámetro x 20mm de alto y se les realizó un análisis de perfil de textura a 25 *ºC* utilizando un analizador de textura Stable Micro System TA-XT2i con una punta de prueba cilíndrica de 36mm de diámetro (P/36R). Los geles fueron comprimidos en un 20% de su altura con una velocidad de 0,5mm/seg. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Para calcular los promedios y desviaciones estándar se utilizaron las funciones estadísticas de Microsoft® Office Excel 2003; mientras que las diferencias significativas ($P<0.05$) se obtuvieron con el programa Statgraphics Plus for Windows 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** muestra la separación de fases en mezclas de WPC (8%) y extracto de té verde a los dos pH evaluados. A pH 4,5 se observa una separación de fases muy rápida en los primeros dos días de almacenamiento para todas las concentraciones de extracto de té verde (**Figura 1B**), mientras que a pH 6,0 esto sólo se observa en presencia de 1% de polifenoles (**Figura 1A**). La mayor precipitación a pH 4,5 es esperable debido a que éste pH está más cercano al punto isoeléctrico de las proteínas mayoritarias del suero, con lo cual resulta más fácil desestabilizar el sistema mediante la interacción y formación de agregados de las proteínas con las catequinas. Esto indicaría que existe un valor umbral de concentración de polifenoles, influenciado por el pH del medio, por sobre el cual los agregados se vuelven insolubles y ocurre la separación de fases. Siebert *et al.* (1996a y 1996b) estudiaron las interacciones de proteínas y polifenoles y desarrollaron un modelo en el cual la molécula de proteína posee un número fijo de sitios de unión a los polifenoles. Esto implica que existe un nivel crítico de recubrimiento de la proteína por parte del polifenol y que cuando este nivel es excedido, el complejo precipita. Este modelo explica la turbidez observada en sistemas de proteínas y polifenoles, ya que asume que estos compuestos primero forman complejos solubles los cuales luego pueden ir creciendo hasta eventualmente precipitar.

Debido a esto se decidió estudiar el tamaño de los complejos formados mediante dispersión dinámica de luz. A pH 6,0 el control mostró un valor constante en el tiempo del $D_{3,2}$ de 0,31μm. En presencia de 0,25% y 0,5% de extracto de té verde, el $D_{3,2}$ aumentó ligeramente, manteniendo siempre un valor menor a 0,35μm. Estas partículas de pequeño tamaño se mantendrán solubles por largos períodos de tiempo como se muestra en la **Figura 1A**. Contrariamente, con 1% de polifenoles, se observa un crecimiento mayor en el tiempo del tamaño de las partículas, alcanzándose un $D_{3,2}$ de casi 0,4μm (**Figura 2A**). El $D_{4,3}$ es un indicador de la formación de "flóculos" o "agregados" de partículas. En la **Figura 2B** se observa también que la formación de agregados es mucho más importante a 1% de polifenoles, donde se obtienen partículas de hasta 1 μm a tiempos largos. Estos agregados serán

insolubles y su precipitación generará la separación de fases mostrada en la **Figura 1A** para esta concentración.

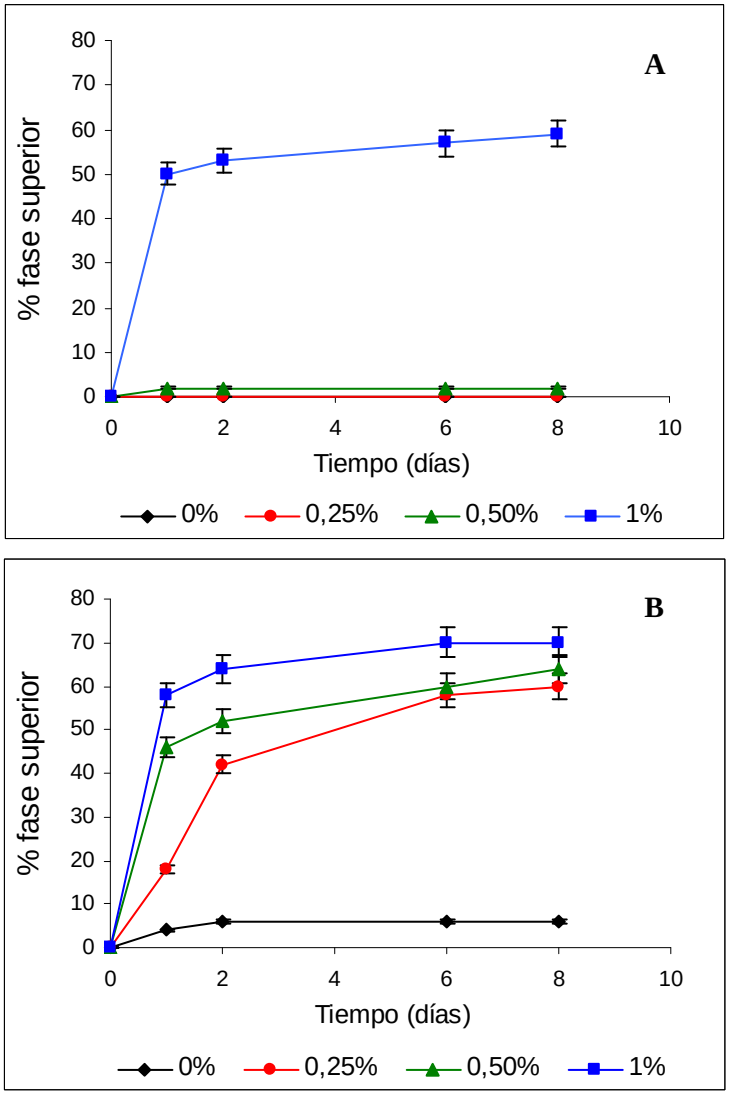


Figura 1. Separación de fases en el tiempo en sistemas de WPC (8%) con concentraciones crecientes de extracto de té verde. A) pH 6,0 y B) pH 4,5.

A pH 4,5 se observa que el $D_{3,2}$ es mayor a 0,35µm desde el inicio, debido a que a un pH cercano al punto isoeléctrico se promueve la asociación de proteínas del suero (**Figura 2C**). La adición de concentraciones crecientes de polifenoles produce un pequeño aumento del $D_{3,2}$; sin embargo, el $D_{4,3}$ es en todos los casos mayor a 1µm lo cual explicaría la rápida separación de fases observada en la **Figura 1B** para todas las concentraciones de extracto de té verde. En particular, con 1% de polifenoles los agregados formados son mucho mayores ($D_{3,2}$ mayor a 0,5µm y $D_{4,3}$ de casi 4µm), con lo cual precipitarán mucho más rápido y extensamente (**Figura 1B**). Además del tamaño de partícula, debería considerarse la disminución de la repulsión electrostática entre los agregados formados como causa de la separación de fases. Charlton *et al.* (2002) desarrollaron un modelo conceptual similar al de Sierbet *et al.* (1996a) en el cual las interacciones entre proteínas y polifenoles pueden clasificarse en tres etapas (**Figura 3**). En la primera, los polifenoles adicionados en baja concentración se unen a las proteínas de manera reversible. Esta unión es de tipo hidrofóbica y da lugar a complejos solubles. En la siguiente etapa, en la cual se adiciona mayor cantidad de polifenoles, dos proteínas se asocian mediante cross-linking, el complejo se vuelve insoluble y comienza a precipitar. En la última etapa, ocurre una mayor agregación de los complejos insolubles lo que lleva a una separación de fases de tipo espinodal, donde el tamaño de las partículas formadas estará determinado por la carga superficial

de las mismas. Este modelo parece explicar los datos aquí presentados ya que la precipitación observada está relacionada al tamaño de partícula.

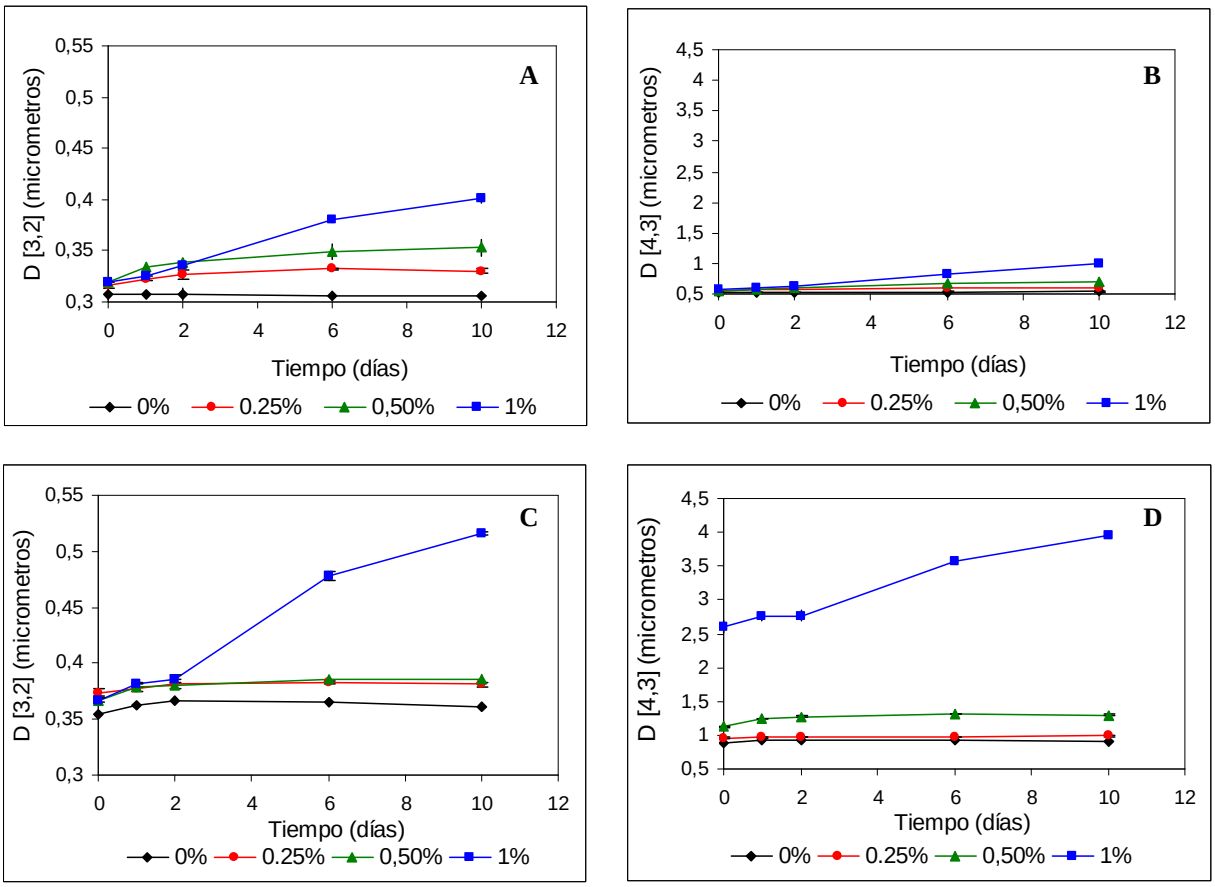


Figura 2. Diámetros promedio superficial ($D_{3,2}$) y de volumen ($D_{4,3}$) de las muestras de WPC (8%) con distintas concentraciones de extractos de té verde. A) y B) corresponden a pH 6,0. C) y D) corresponden a pH 4,5.

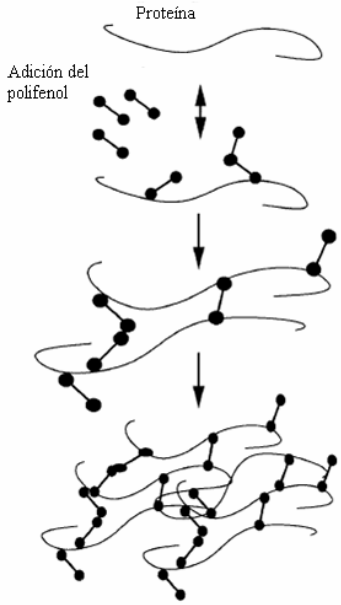


Figura 3. Modelo de Charlton *et al.* (2002). Representación esquemática de los pasos que ocurren durante la agregación y la precipitación de proteínas por acción de los polifenoles.

Asimismo, es importante notar que la formación de complejos solubles e insolubles se verá influenciada por la naturaleza del polifenol, el tipo de proteína, el pH del sistema, la temperatura y la presencia de otros compuestos. Charlton *et al.* (2002) postulan que el número de moléculas de polifenol necesarias para precipitar una determinada proteína depende del tamaño del polifenol; más precisamente del número de anillos que posea. A su vez la proteína en cuestión será más propensa a interactuar con los polifenoles cuanto mayor sea el número de aminoácidos prolina y arginina. En nuestro caso en particular, el análisis resulta mucho más complejo debido a que el suero no representa una única proteína sino varias, el extracto de té verde es una mezcla de polifenoles y la presencia de azúcares (mayormente lactosa) y sales procedentes del suero también pueden influir.
Debido a los cambios generados en el WPC al adicionar el extracto de té verde, se evaluó cómo los agregados formados afectaban las propiedades de los geles de WPC. En este caso se trabajó con mayores concentraciones de suero (30%) para lograr la gelificación, que requiere una mínima concentración de proteínas de aproximadamente 10%.
Las **Tablas 1** y **2** muestran la temperatura de gelificación, los módulos de almacenamiento (G´) y de pérdida (G´´) y la tanδ de los geles para ambos pH. Como puede observarse, en todos los casos el valor de G´ es superior al G´´, indicando que la componente elástica es preponderante sobre la componente viscosa, lo cual es característico de los geles viscoelásticos. A pH 6,0 no se observaron diferencias significativas entre las distintas muestras, aunque sí se observó una disminución en la temperatura de gelificación. Por el contrario, a pH 4,5 los parámetros G´ y G´´ aumentaron en las muestras con extracto de té verde conforme aumentó la concentración del mismo. Sin embargo, cuando se calculó tanδ se observó que este valor aumentó también, indicando que los geles poseen menor viscoelasticidad relativa con el agregado del extracto de té verde.

Tabla 1.: Propiedades viscoelásticas de los sistemas de WPC (30%) con concentraciones crecientes de extracto de té verde a pH 6,0.

pH 6,0	T gelif. (*ºC*)	*G´* (Pa) (1 Hz)	*G´´* (Pa) (1 Hz)	tanδ (1 Hz)
0%	90,0 ±0,4	2790 ±150	549 ±21	0,20 ±0,01
0,25%	87,9 ±0,2	3070 ±301	866 ±24	0,28 ±0,02
0,50%	86,2 ±0,1	2570 ±124	662 ±41	0,25 ±0,03
1%	86,2 ±0,1	2921 ±139	872 ±33	0,29 ±0,05

Tabla 2. Propiedades viscoelásticas de los sistemas de WPC (30%) con concentraciones crecientes de extracto de té verde a pH 4,5.

pH 4,5	T gelif. (*ºC*)	*G´* (Pa) (1 Hz)	*G´´* (Pa) (1 Hz)	tanδ (1 Hz)
0%	86,2 ±0,3	3925 ±148	903 ±18	0,23 ±0,02
0,25%	86,2 ±0,1	5695 ±410	1320 ±95	0,23 ±0,02
0,50%	86,2 ±0,2	7365 ±199	1915 ±188	0,26 ±0,01
1%	86,2 ±0,2	8110 ±233	2120 ±172	0,27 ±0,04

También se evaluó la textura de los geles con y sin el agregado de extracto de té verde. A pH 6.0 el análisis del perfil de textura indicó una mayor dureza y adhesividad para los geles con 0.25% y 0.5% de extracto de té verde (**Figura 4A**). Sin embargo, cuando la concentración de polifenoles aumentó al 1%, la dureza disminuyó por debajo del valor del control mientras que la adhesividad si bien disminuyó con respecto al gel con 0.5%, se mantuvo por encima del control. Este comportamiento de aumento de la dureza hasta una cierta concentración y luego disminución fue observado también por Balange y Benjakul (2009) al utilizar compuestos fenólicos en geles de surimi de caballa a pH 7. Estos autores reportaron que concentraciones mayores al 0,5% de polifenoles disminuyeron la fuerza de ruptura y deformación de los geles, concluyendo que existe una concentración óptima en la cual la fuerza del gel es máxima. Ellos asocian esta disminución a que a altas concentraciones, los

compuestos fenólicos pueden autoagregarse disminuyendo su capacidad de generar cross-linking con las proteínas. Por el contrario, a pH 4,5 no se observaron diferencias significativas en la dureza ni en la adhesividad de los geles con respecto al control (**Figura 4B**). Además los geles formados a este pH resultaron ser pastosos y de difícil desmolde (con poca cohesividad), debido a que, cercano al punto isoeléctrico, las proteínas del suero forman mayormente coágulos y no dan lugar al desarrollo de una red más fuerte, característica de un gel. Asimismo, cuando se agregó el extracto de té verde al 1% no se obtuvieron geles autosoportables sino más bien una pasta particulada, la cual no fue adecuada para las mediciones de textura. Resultados similares fueron obtenidos por Mleko *et al.* (1997) al evaluar geles de WPI a pH 4 y 5.

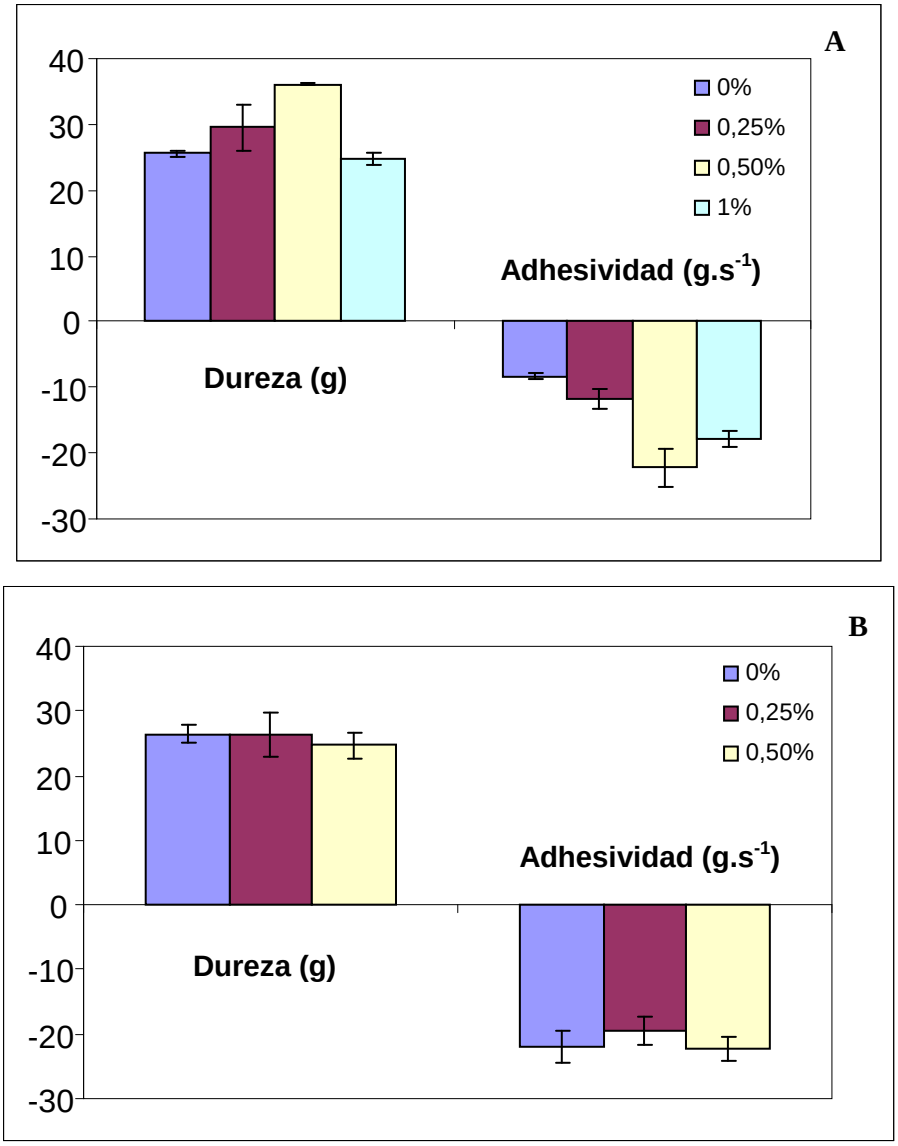


Figura 4. Dureza y adhesividad de los geles de WPC (30%) con las distintas concentraciones de extracto de té verde a A) pH 6,0 y B) pH 4,5.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la utilización de té verde en suero lácteo induce la formación de agregados con las proteínas del suero, los cuales pueden eventualmente precipitar. Se observa la existencia de una concentración crítica de polifenoles, dependiente del pH del medio, a la cual el sistema se separa en fases. Las características de los geles también se ven afectadas a pH 4,5, obteniéndose geles con menor viscoelasticidad relativa conforme aumenta la concentración del

extracto de té verde. La textura de los geles obtenidos presentó una concentración óptima de polifenoles a la cual la dureza y adhesividad del gel fueron máximas a pH 6. Puede concluirse a partir de los datos obtenidos en este trabajo que los extractos de té verde influyen marcadamente sobre sistemas de suero lácteo y sus propiedades de gelificación. Resulta de gran importancia evaluar el impacto de incorporar un aditivo con valor biológico como son los extractos de té verde sobre un alimento o potencial ingrediente como es el lactosuero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balange AK, Benjakul S. 2009. Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (Rastrelliger kanagurta) surimi. LWT-Food Science and Technology, doi:10.1016/j.lwt.2009.01.013.

Charlton AJ, Baxter NJ, Lokman Khan M, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1593-1601.

He Q, Lv Y, Yao K. 2006a. Effects of tea polyphenols on the activities of α-amylase, pepsin, trypsin and lipase. Food Chemistry, 101: 1178-1182.

He Q, Shi B, Yao K. 2006b. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. Food Chemistry, 95: 250-254.

Madhan B, Subramanian V, Raghava Rao J, Balachandran UN, Ramasami T. 2005. Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. International Journal of Biological Macromolecules, 37: 47-53.

Mleko S, Li-Chan ECY, Pikus S. 1997. Interactions of k-carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. Food Research International, 30: 427-433.

Richard T, Lefeuvre D, Descendit A, Quideau S, Monti JP. 2006. Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. Biochimica et biophysica acta, 1760: 951-958.

Rubino MI, Arntfield SD, Nadon CA, Bernatsky A. 1996. Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. Food Research International, 29: 653-659.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45: 287-306.

Siebert KJ, Troukhanova NV, Lynn PY. 1996a. Nature of polyphenol-protein interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 80-85.

Siebert KJ, Carrasco A, Lynn PY. 1996b. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1997-2005.

Strauss G, Gibson SM. 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. Food Hydrocolloids, 18: 81-89.

Wang H, Provan GJ, Helliwell K. 2000. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. Trends in Food Science & Technology, 11: 152-160.

Yilmaz Y. 2006. Novel uses of catechins in foods. Trends in Food Science & Technology, 17: 64-71.