



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***APLICACIÓN DE HARINA DE FRUTO DE ALGARROBO EN
EL DESARROLLO DE PRODUCTOS PANIFICADOS
SALUDABLES***

Tesista: Lic. Facundo Bigne

Directora: Dra. Cristina Ferrero

Codirectora: Dra. María Cecilia Puppo

2016

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

A partir de los resultados de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos en revistas internacionales y actas de congresos.

Bigne, F., Puppo, M. C., & Ferrero, C. (2016). Fibre enrichment of wheat flour with mesquite (*Prosopis spp.*): Effect on breadmaking performance and staling. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 1008-1016.

Bigne, F., Puppo, M. C., & Ferrero, C. (2016). Rheological and microstructure characterization of composite dough with wheat and mesquite (*Prosopis spp.*) flours. *International Journal of Food Properties*, 19(2), 243-256.

Bigne, F., Puppo, C., & Ferrero, C. (2012). Comportamiento reológico de masas a base de harinas de trigo y algarroba. Argentina. Córdoba. Congreso. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba 2012 (CICYTAC 2012) "Desafíos para una producción sustentable y competitiva". Universidad Nacional de Córdoba. ISBN-13: 978-987-28845-0-5.

Bigne, F., Puppo, C., & Ferrero, C. (2013). Calidad panadera de mezclas de harinas de trigo y algarroba. Argentina. Rosario. Congreso. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. AATA. ISBN 978-987-22165-5-9.

Bigne, F., Puppo, C., & Ferrero, C. (2013). Efecto del almacenamiento en la textura de panes con harinas de trigo y algarroba. Argentina. Rosario. Congreso. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. AATA. ISBN 978-987-22165-5-9.

Bigne, F., Romero, A., Puppo, C., Ferrero, C., & Guerrero, A. (2014). Estudio reológico y microestructural de masas de harina de trigo parcialmente sustituida por harina de algarroba y con adición de transglutaminasa. Argentina. Córdoba. 2014. V congreso internacional ciencia y tecnología de los alimentos (CICYTAC 2014). Universidad Nacional de Córdoba. ISBN 978-987-45738-5-8.

*Dedico esta tesis a mi familia,
especialmente a mis padres y a mis
hermanas por haber estado siempre a mi
lado para apoyarme.*

AGRADECIMIENTOS

A Cristina Ferrero y Cecilia Puppo por haber confiado en mí, por haberme guiado y acompañado durante estos 5 años en el ámbito profesional y personal y por contribuir enormemente a mi formación transmitiéndome sus conocimientos.

A mis compañeros del grupo, Vicky, Jime, Ana, Marie, Felipe, Leo y Gabriel por la ayuda en los ensayos cuando fue necesaria y por el buen ambiente de trabajo.

A mis compañeros de la Cátedra de Química Inorgánica por los consejos y por la buena onda todos estos años.

A Antonio Guerrero, Alberto Romero y el personal del Laboratorio de Reología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla por haberme recibido y haberme hecho sentir muy a gusto en la estadía realizada.

A la Universidad Nacional de La Plata, la Facultad de Ciencias Exactas y al CIDCA por la formación que me brindaron y la posibilidad de realizar el doctorado.

A CONICET por haberme otorgado las becas doctorales tipo I y II, al Estado Nacional y a los responsables del Programa BEC.AR por el otorgamiento de la beca para la estancia en Sevilla.

Al personal del Laboratorio de Calidad de Molinos Rio de La Plata SA por haberme permitido realizar las medidas farinográficas.

A los Técnicos Javier y Daniel por la ayuda con los ensayos de DSC.

A Enrique Portiansky y a Patricia Sarmiento por la predisposición para la obtención de las imágenes de microscopía confocal y SEM respectivamente.

A Martin Morosi del CETMIC por facilitarme el uso del microscopio.

A Alicia Chaves por los consejos con el análisis estadístico de los datos.

A todos ellos ¡Muchas Gracias!

RESUMEN

La harina de fruto de algarrobo, comúnmente conocida como harina de algarroba, proviene de la molienda de los frutos maduros completos del algarrobo (*Prosopis spp.*), una leguminosa arbórea altamente distribuida en América. La misma contiene importantes cantidades de azúcares, fibra dietaria y minerales. Su contenido total de proteínas es similar al de cereales como el trigo y el maíz y su perfil aminoacídico le da complementariedad con las proteínas de dichos cereales. Su utilización alimentaria data de tiempos precolombinos. Actualmente el aprovechamiento de los frutos del algarrobo y sus subproductos se limita mayormente al mercado regional.

En el presente trabajo de tesis se buscó evaluar la posibilidad de utilizar harina de algarroba para la elaboración de productos panificados con un perfil nutricional mejorado, aprovechando el alto contenido de fibra y minerales que la misma posee, fomentando a su vez una diversificación en las posibles aplicaciones de la harina de algarroba.

El contenido de agua en las masas resultó ser un factor de gran importancia y tuvo que modificarse de acuerdo al grado de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba. Pequeñas variaciones en la cantidad de agua modificaron de forma pronunciada los parámetros de dureza, elasticidad y cohesividad, medidos por análisis de perfil de textura (TPA). Así mismo las variaciones en la cantidad de algarroba y agua en las masas condujeron a cambios en los módulos dinámicos obtenidos por ensayos reológicos de pequeña deformación. La incorporación de harina de algarroba dio lugar a masas más duras, menos cohesivas y con mayores valores en los módulos dinámicos. Los cambios mencionados en la reología se relacionaron con lo observado por microscopía láser confocal de barrido (CSLM), donde la incorporación de algarroba generó pérdida parcial de la estructura filamentosa y entrecruzada de la red de gluten. En las masas donde el contenido de agua no se ajustó correctamente se pudo ver un pobre desarrollo de la matriz proteica.

Los cambios en la distribución y disponibilidad de agua al incorporar harina de algarroba a las masas también fueron objeto de estudio. Por ^1H -RMN se observó que las masas con mayor contenido de dicha leguminosa presentaron menor movilidad molecular, a la vez que por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se constató un aumento en las

temperaturas de inicio y de pico de gelatinización del almidón, llevando a una reducción del rango de temperaturas de gelatinización, hecho concordante con sistemas ricos en azúcar.

Los cambios en las propiedades reológicas, en la microestructura y en la disponibilidad de agua pueden relacionarse con la incorporación de los componentes de la algarroba, principalmente fibra y azúcares, que estarían interfiriendo, al menos parcialmente, en la formación de una red de gluten bien desarrollada y modificando la distribución del agua en el sistema.

Durante la fermentación, las masas con algarroba se expandieron menos que la masa control de harina de trigo. Esto concuerda con las modificaciones reológicas producidas en la masa y derivó en la obtención de piezas de pan con menor volumen específico (VE), conforme aumentó el contenido de harina de algarroba en la formulación. Además los panes con algarroba fueron significativamente más oscuros en miga y corteza y la textura de su miga resultó más dura, menos cohesiva y elástica y con mayor masticabilidad que la miga del pan control de harina de trigo. También se observaron modificaciones en las características del alveolado de la miga con la incorporación de algarroba a las formulaciones. Los alveolos de la miga de los panes con algarroba resultaron menos regulares (valores inferiores de circularidad) que los de pan de trigo. A su vez, en los panes con mayor contenido de harina de algarroba se obtuvieron migas con alveolos de menor tamaño y con mayor densidad alveolar (número de alveolos/mm²), debido a una mayor dificultad de las masas para expandirse durante el leudado en dichas formulaciones. Al analizar cortes de miga de los panes por CSLM se evidenciaron diferencias en la morfología de las mismas, pudiendo comprobarse la presencia de los componentes de la harina de algarroba en las paredes de los alveolos intercalados con la matriz formada por el gluten y los gránulos de almidón gelatinizado. El envejecimiento del pan, relacionado con la pérdida y migración de humedad en la miga y por la retrogradación del almidón, se estudió mediante ensayos de análisis de perfil de textura, retrogradación de amilopectina por DSC y difracción de rayos X, encontrando que los panes con mayor contenido de algarroba tuvieron menor deterioro relativo de textura, menor retrogradación de amilopectina y menor aumento relativo de cristalinidad al cabo de 6 días de almacenamiento. Es decir que la algarroba estaría teniendo un cierto efecto protector sobre el envejecimiento.

Con la intención de mejorar el VE y la textura de los panes con algarroba se evaluó el efecto de dos aditivos ampliamente utilizados en panificación, ácido ascórbico (AA) y estearoil lactilato de sodio (SSL). Los resultados obtenidos sobre la calidad de los panes no fueron los esperados, encontrándose efectos levemente negativos con la utilización de AA e insuficientes con la adición de SSL en las dosis investigadas.

También se evaluó la utilización de enzima transglutaminasa en las formulaciones. Este aditivo condujo a cambios significativos en las propiedades reológicas y microestructurales de las masas, siendo dichos cambios dependientes del nivel de enzima aplicado y del contenido de harina de algarroba en la formulación. Los cambios reológicos fueron más evidentes en los ensayos de análisis mecánico dinámico (DMA) donde la enzima condujo en general a incrementos en el carácter elástico de las masas. Por otro lado los ensayos de grandes deformaciones (TPA) no permitieron obtener tendencias tan claras sobre los cambios de textura. Por microscopía electrónica de barrido (SEM) y por CSLM se pudo apreciar la formación de filamentos más gruesos de gluten y un incremento en la agregación de proteínas con la enzima. La enzima no condujo a grandes variaciones del VE de los panes, excepto para las formulaciones con 25% de reemplazo con harina de algarroba donde el incremento de VE fue significativo. La textura de la miga tampoco resultó modificada de forma muy marcada con la utilización de la enzima.

El análisis de la composición de los panes demostró que la sustitución de un 15% de harina de trigo por harina de algarroba dio lugar a panes con un contenido de fibra cercano al 7%, que califica al producto como “rico en fibra”, además de incrementar significativamente el contenido de minerales. Los resultados de aceptabilidad sensorial fueron buenos para los panes con harina de algarroba, a pesar de que la mayoría de evaluadores informaron no ser consumidores frecuentes de productos con algarroba.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos funcionales	3
1.2. Panificados funcionales	8
1.3. Panificados con algarroba	10
1.3.1. Algarrobo	10
1.3.1.1. El Algarrobo	10
1.3.1.2. Algarroba	13
1.3.2. Panificación con trigo	17
1.3.2.1. Harina de trigo	17
1.3.2.1.1. Trigo	17
1.3.2.1.1.1. Molienda del trigo	18
1.3.2.1.2. Clasificación de las harinas de trigo	20
1.3.2.1.3. Componentes principales de la harina de trigo	21
1.3.2.1.3.1. Almidón	21
1.3.2.1.3.2. Las proteínas del gluten	24
1.3.2.2. El proceso de panificación	26
1.3.2.2.1. Amasado	27
1.3.2.2.2. Laminado	28
1.3.2.2.3. Reposo	28
1.3.2.2.4. División, boleado y armado	28
1.3.2.2.5. Fermentación	28
1.3.2.2.6. Horneado	28
1.3.2.2.7. Enfriamiento	29
1.3.2.2.8. Envasado	29
1.3.2.2.9. Envejecimiento del pan	29
1.3.2.3. Aditivos de panificación	30
1.3.2.3.1. Utilización de enzima transglutaminasa en panificados	33
1.3.3. Panificación con mezcla de harinas	34

HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	39
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Materiales	43
2.1.1. Harina de trigo	43
2.1.2. Harina de algarroba	43
2.1.3. Cloruro de sodio	43
2.1.4. Levadura	43
2.1.5. Margarina	43
2.1.6. Estearoil lactilato de sodio (SSL)	44
2.1.7. Ácido ascórbico	44
2.1.8. Enzima Transglutaminasa	44
2.2. Métodos	44
2.2.1. Composición de las harinas	44
2.2.1.1. Humedad	44
2.2.1.2. Cenizas	45
2.2.1.3. Proteínas	45
2.2.1.4. Lípidos	46
2.2.1.5. Fibra dietaria total	47
2.2.2. Masas Panarias	48
2.2.2.1. Caracterización reológica de las masas	48
2.2.2.1.1. Diseño experimental	48
2.2.2.1.2. Ensayos farinográficos	50
2.2.2.1.3. Ensayos de textura	51
2.2.2.1.3.1. Preparación de las masas	51
2.2.2.1.3.2. Análisis de perfil de textura (TPA)	51
2.2.2.1.3.3. Ensayos de relajación	53
2.2.2.1.4. Ensayos dinámicos	57
2.2.2.1.4.1. Ensayos en reómetro oscilatorio con deformación radial	61
2.2.2.1.4.2. Ensayos de análisis mecánico dinámico (DMA)	62

2.2.2.2. Caracterización fisicoquímica y microestructural de las masas	64
2.2.2.2.1. Movilidad molecular	65
2.2.2.2.2. Microscopía Láser Confocal de Barrido (CSLM)	66
2.2.2.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	68
2.2.2.2.4. Gelatinización del almidón por calorimetría diferencial de barrido	69
2.2.3. Panes	70
2.2.3.1. Diseño experimental	70
2.2.3.2. Elaboración de los panes	71
2.2.3.2.1. Curvas de fermentación	72
2.2.3.2.2. Evaluación de la calidad panadera	73
2.2.3.2.2.1. Volumen específico de los panes	73
2.2.3.2.2.2. Color de la corteza	74
2.2.3.2.2.3. Color de miga	75
2.2.3.2.2.4. Alveolado de la miga	75
2.2.3.2.2.5. Textura de la miga	76
2.2.3.2.2.6. Humedad de la miga	76
2.2.3.2.3. Caracterización de la miga por CSLM	76
2.2.3.2.4. Efecto de aditivos	77
2.2.3.3. Ensayos de conservación	77
2.2.3.3.1. Análisis de perfil de textura de la miga	77
2.2.3.3.2. Humedad de la miga	77
2.2.3.3.3. Caracterización fisicoquímica y microestructural de panes	78
2.2.3.3.3.1. Microscopía óptica de luz polarizada	78
2.2.3.3.3.2. Recristalización del almidón - Difracción de Rayos X	78
2.2.3.3.3.3. Recristalización de amilopectina – DSC	79
2.2.3.4. Composición porcentual – Análisis nutricional	80
2.2.3.5. Análisis sensorial	80
2.2.4. Análisis estadístico	82

CAPÍTULO III: CARACTERIZACION DE MASAS A BASE DE HARINAS DE TRIGO Y ALGARROBA

3.1. Composición de las harinas	85
---------------------------------	----

3.2. Caracterización reológica de las masas	86
3.2.1. Perfiles farinográficos	86
3.2.2. Ensayos de textura	90
3.2.2.1. Análisis de perfil de textura	90
3.2.2.2. Estudios de relajación de las masas	96
3.2.3. Ensayos dinámicos en reómetro oscilatorio	99
3.3. Caracterización fisicoquímica y microestructural de las masas	101
3.3.1. Ensayos de relajación ¹ H-RMN	101
3.3.2. Caracterización de las masas por CSLM	104
3.3.3. Comportamiento térmico de las masas por DSC	109
Conclusiones Parciales	115

CAPÍTULO IV: ELABORACION Y CARACTERIZACION DE PANES A BASE DE HARINAS DE TRIGO Y ALGARROBA

4.1. Performance de las masas durante el leudado	119
4.2. Evaluación de la calidad panadera	121
4.2.1. Volumen específico de los panes	121
4.2.2. Color de miga y corteza	122
4.2.3. Calidad estructural de la miga	123
4.2.4. Textura de miga	125
4.3. Caracterización de la miga por CSLM	127
4.4. Cambios durante el almacenamiento	129
4.4.1. Cambios texturales durante el almacenamiento	129
4.4.2. Cambios en la cristalinidad, microscopía óptica de luz polarizada y difracción de rayos X	131
4.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	134
4.5. Efecto de los aditivos sobre la calidad de los panes	136
4.6. Información nutricional de panes compuestos trigo-algarroba	139
4.7. Análisis sensorial de los panes	140
Conclusiones Parciales	145

CAPÍTULO V: EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE ENZIMA TRANSGLUTAMINASA SOBRE MASAS Y PANES A BASE DE HARINAS DE TRIGO Y ALGARROBA

5.1. Caracterización reológica de las masas	149
5.1.1. Ensayos de perfil de textura	149
5.1.2. Ensayos de Análisis Mecánico Diferencial	150
5.1.2.1. Cálculo de los tiempos óptimos de mezclado	150
5.1.2.2. Medida de los espectros mecánicos por DMA	152
5.2. Caracterización microscópica de las masas por CSLM y SEM	155
5.3. Efecto de la temperatura en el comportamiento reológico de las masas	160
5.4. Evaluación de la calidad panadera	165
5.4.1. Volumen específico de los panes	165
5.4.2. Textura de miga	166
Conclusiones Parciales	169
CONCLUSIONES GENERALES	171
BIGLIOGRAFÍA	177
GLOSARIO	197

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos funcionales

En las últimas décadas las tendencias en la selección de alimentos por parte de los consumidores se ha modificado ampliamente, conforme se ha incrementado el universo de productos disponibles.

Actualmente los consumidores exigen mayor calidad en los productos, sobre todo en el aspecto que relaciona a la alimentación con la salud. En las sociedades desarrolladas el concepto de nutrición ha evolucionado de “nutrición adecuada o suficiente” a “nutrición óptima” (Silveira Rodríguez, Monereo Megías, & Molina Baena, 2003). Esta tendencia no es casual, la misma está relacionada a un mayor manejo de la información por parte de los consumidores acerca de las relaciones que existen entre una buena alimentación y una buena salud. Esta mayor información disponible puede relacionarse tanto con que los gobiernos son interesados directos en mantener una población más saludable, que a la vez reduce los costos de salud pública, y por otro lado el sector privado industrial que busca instalar nuevos productos en el mercado (Alvídrez-Morales, González-Martínez, & Jiménez-Salas, 2002). Muchos de estos “alimentos sanos” pueden categorizarse como alimentos funcionales.

El concepto de alimentos funcionales nació en los años '80 en Japón y con el tiempo se propagó a América del Norte, Europa y el resto del mundo (Diplock et al., 1999; Lau, Chan, Tan, & Kwek, 2012). La sensibilidad de los consumidores sobre la importancia de los alimentos funcionales ha crecido mucho en los últimos años (Krystallis et al., 2008). Este grupo de alimentos hace referencia a aquellos que han demostrado afectar beneficiosamente algún/as función/es del cuerpo, de una forma relevante, incrementando el estado de salud o bienestar o reduciendo el riesgo de contraer enfermedades o de muerte, más allá de su efecto nutritivo intrínseco (Diplock et al., 1999). Además estos alimentos deben proporcionar su efecto benéfico al ser consumidos en las cantidades normales que se espera en la dieta.

El efecto “funcional” de estos alimentos puede relacionarse con su aporte sobre una o varias funciones del organismo (Alvídrez-Morales et al., 2002; Silveira Rodríguez et al., 2003):

- **Desarrollo fetal y en los primeros años de la vida:** crecimiento; desarrollo (Sistema Nervioso Central y otros sistemas y órganos); diferenciación celular

- **Aparato digestivo:** modificación y equilibrio de la microflora colónica; inmunidad; incremento de la biodisponibilidad de nutrientes; mejora del tránsito intestinal; proliferación celular; fermentación de sustratos
- **Aparato cardiovascular:** homeostasis de lipoproteínas; integridad endotelial; antitrombogénesis
- **Metabolismo de macronutrientes:** mejora de resistencia a la insulina; rendimiento óptimo de la actividad física; mantenimiento del peso; composición corporal (grasa)
- **Metabolismo xenobiótico**
- **Esfera psíquica:** cognición; estado de ánimo; apetito; estrés emocional

Los alimentos funcionales pueden ser tanto alimentos naturales como modificados o diseñados. Añadir, aumentar o reducir la concentración o hacer más biodisponible un determinado componente, pueden ser estrategias tecnológicas para crear nuevos alimentos funcionales (Roberfroid, 1999).

La reglamentación sobre alimentos funcionales varía entre países y prácticamente no existe una legislación clara sobre los mismos, aunque dependiendo del caso se ha avanzado más o menos en la normativa. Por otra parte, el Sistema del Codex Alimentarius FAO/OMS no proporciona directrices o especificaciones claras para los alimentos funcionales. Debido a esto es que también existe tal heterogeneidad entre países sobre el tema. En nuestro país aún no hay un marco legal para la definición de “alimentos funcionales” y no se ha incorporado por lo tanto al Código Alimentario Argentino. Sin embargo, la definición es analizada por un grupo de trabajo dependiente de la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) (Moreno, 2012; Siró, Kápolna, Kápolna, & Lugasi, 2008).

Algunos ejemplos de alimentos funcionales son:

- **Probióticos:** este grupo enmarca a aquellos alimentos provenientes mayormente de los lácteos (leches, yogures y quesos), aunque también se encuentran algunos productos vegetales y cárnicos fermentados. Es necesario que los microorganismos presentes en estos alimentos soporten el pasaje por el tracto gastrointestinal para ejercer su efecto benéfico. Los mismos promueven un adecuado equilibrio en la microflora del colon, incrementan la biodisponibilidad de ciertos

nutrientes, mejoran el tránsito intestinal, promueven el desarrollo celular y evitan la acción de ciertos microorganismos patógenos.

- **Prebióticos:** los alimentos prebióticos son aquellos que contienen componentes que no son digeribles por el hombre pero que sirven de sustrato para el desarrollo de la microflora benéfica del intestino. En general se trata de oligo o polisacáridos de origen vegetal (fibra), que son capaces de resistir la hidrólisis en la parte alta del tracto digestivo y son sensibles a la hidrólisis por la acción de ciertas bacterias potencialmente benéficas en el intestino (por ejemplo bifidobacterias y lactobacilos).

- **Simbióticos:** este grupo de alimentos se refiere a aquellos que proporcionan los microorganismos probióticos y los prebióticos que sirven de sustrato para los mismos. Para poder ser calificados como tales debe demostrarse el efecto de simbiosis, es decir que el prebiótico favorezca selectivamente el desarrollo del probiótico adicionado.

- **Alimentos enriquecidos con fibras:** se refiere a aquellos que han sido modificados o elaborados dando una composición final alta en fibra dietaria. La fibra puede clasificarse como insoluble o soluble y ambas promueven efectos benéficos que se discuten más adelante. Existen diversos alimentos funcionales con elevados contenidos de fibra dietaria (panificados, barras de cereal, yogures, leches fermentadas, quesos, jugos de frutas, entre otros).

- **Alimentos con perfiles lipídicos “saludables”:** en esta clasificación se pueden encontrar aquellos alimentos con cierto contenido de ácidos grasos saludables como son los poliinsaturados y el oleico (monoinsaturado), aceites de pescado y otros componentes lipídicos saludables como los fitoesteroles. En general estos alimentos promueven reducciones en el colesterol total, mejoran el balance HDL/LDL, inhiben parcialmente la absorción de colesterol de la dieta. Dentro de este grupo se pueden encontrar en el mercado: huevos enriquecidos con ácidos grasos omega-3, margarinas enriquecidas con fitoesteroles, leches, panes y jugos con fitoesteroles, leches adicionadas con omega-3, entre otros.

- **Legumbres:** las legumbres tienen en general un contenido lipídico saludable, con una alta proporción de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Además contienen importantes cantidades de fibra soluble e insoluble, minerales y antioxidantes y fitoestrógenos (isoflavonas), especialmente presentes en la soja, que serían

responsables de reducir algunos síntomas asociados al climaterio y efectos beneficiosos a nivel de órganos y tejidos.

- **Alimentos con alto contenido de derivados fenólicos:** dentro de los compuestos fenólicos se destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles. A estos compuestos se los reconoce por su capacidad antioxidante, la prevención de enfermedades cardiovasculares, las propiedades ya mencionadas para las isoflavonas de soja e incluso efectos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas. Estos compuestos son de origen vegetal y por lo tanto se encuentran presentes en alimentos como frutas, hortalizas, legumbres, frutos secos, vino y los alimentos manufacturados que los incluyen.

En Argentina los grupos de alimentos funcionales presentes en el mercado corresponden a probióticos (leches, yogures y quesos), alimentos con fibra (panes, barras de cereal, cereales para desayuno, lácteos con prebióticos), alimentos simbióticos (que contienen tanto probióticos como prebióticos), alimentos con fitoesteroles (leches, jugos, panes, etc), entre otros (Olivera Carrión, 2007; Olagnero, Abad, & Bendersky, 2007).

Dentro de los más difundidos se encuentran los que basan su “funcionalidad” en la fibra dietaria. La misma puede ser definida como “los restos de células vegetales comestibles, polisacáridos, lignina y sustancias asociadas resistentes a la digestión por las enzimas alimentarias de los seres humanos ” (Gordon, 1999). Según la American Association of Cereal Chemists “la fibra alimentaria es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y otras sustancias asociadas de las plantas. La fibra alimentaria promueve efectos fisiológicos benéficos incluyendo atenuación del nivel del colesterol y/o atenuación en los niveles de glucosa en sangre” (AACC, 2000).

La fibra dietaria se encuentra sólo en alimentos de origen vegetal: granos de cereales, legumbres, frutas, verduras, frutos secos y semillas. Los componentes típicos de fibra dietaria incluyen celulosas, hemicelulosas, ligninas, pectinas, y una variedad de gomas y mucílagos. Todos estos excepto las ligninas (polímeros heterogéneos resultantes de la unión de ácidos y alcoholes fenilpropílicos) son polisacáridos. La heterogeneidad de la fibra dietaria es la razón principal que explica la diversidad de sus efectos fisiológicos.

Es sabido desde hace mucho tiempo que una dieta con cantidades adecuadas de fibra conlleva una variedad de beneficios a la salud (Olagnero et al., 2007). Se han establecido recomendaciones de ingesta diaria de fibra dietética, en adultos de 20 a 35 g/día o de 10 a 14 g/100 Kcal, mientras que para niños mayores de 2 años (hasta los 18 años) se recomienda una ingesta diaria calculada como 5 g/día sumado a la edad, por ejemplo en un niño de 10 años la recomendación es de 15 g/día (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006).

Tradicionalmente se ha clasificado la fibra dietaria como *fibra soluble* o *fibra insoluble*, aunque esta clasificación ha evolucionado en los últimos años con la incorporación de nuevas sustancias a la categoría de fibra dietaria, como es el caso de la inulina, fructooligosacáridos, almidón resistente y azúcares no digeribles. Sin embargo a fines prácticos la solubilidad de la fibra dietaria sigue siendo una clasificación útil y aceptada (Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006).

La fibra insoluble está representada principalmente por componentes de la pared vegetal como la celulosa, ligninas y algunas hemicelulosas, mayormente presentes en granos y vegetales; por otro lado la fibra soluble se compone de polisacáridos tales como pectinas, gomas, mucílago y hemicelulosas que se encuentran en frutas, avena, cebada y legumbres. Como ya se mencionó, también se deben considerar las sustancias análogas a la fibra (inulina, fructooligosacáridos, almidón resistente y azúcares no digeribles) que en su mayoría son solubles en agua. La funcionalidad de la fibra insoluble está asociada a la reducción del tiempo de tránsito intestinal, al aumento de la masa fecal y a la generación de heces más suaves, mientras que la fibra soluble retrasa el vaciado gástrico, disminuye la absorción de glucosa, mejora la función inmune y disminuye los niveles de colesterol sérico (Dreher, 2001; Escudero Álvarez & González Sánchez, 2006).

La incorporación de fibra a productos de consumo masivo para desarrollar nuevos productos que puedan ser clasificados (por ejemplo en EEUU) como “buena fuente de fibra” o “excelente fuente de fibra” (proporcionando 10% o 20% del valor diario establecido como referencia en la dieta), implica un desafío tecnológico ya que la cantidad y la funcionalidad de la fibra deben medirse sobre el producto terminado (Sivam, Sun-Waterhouse, Quek, & Perera, 2010; FDA, 2013) y en ciertas matrices

alimentarias la incorporación de la misma puede cambiar sustancialmente las propiedades organolépticas del alimento (Marlett, 2001).

En Estados Unidos están permitidas algunas declaraciones de propiedades que asocian la salud con el contenido de fibra dietaria en ciertos productos: 1- productos de granos, frutas y vegetales cuyo contenido de fibra, ayuda a reducir el riesgo de cancer; 2- productos de granos, frutas y vegetales que contienen fibra (sobre todo fibra soluble), ayudan a reducir el riesgo de enfermedades coronarias; 3- el salvado de avena ayuda a reducir el riesgo de enfermedades coronarias; 4- productos de *Plantago psillium* ayuda a reducir el riesgo de enfermedades coronarias; 5- los granos enteros ayudan a reducir el riesgo de enfermedades coronarias y ciertos tipos de cáncer (Dreher, 2001).

En nuestro País el Código Alimentario Argentino (CAA) dispone en su Capítulo V (Normas para la Rotulación y Publicidad de los Alimentos) un Valor Diario de Referencia (VDR) para fibra alimentaria de 25 g/día. Así mismo establece en alimentos sólidos un contenido mínimo de 3 g de fibra/100 g para la rotulación del alimento como “fuente de fibra”; mientras que para la utilización del rótulo “alto contenido de fibra” se exige un contenido igual o mayor a 6 g de fibra/100 g (CAA, 2014). Cabe aclarar que el CAA prohíbe la utilización de “declaraciones de propiedades saludables”, aunque la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) se encuentra estudiando una propuesta de incorporación de un artículo referido a las declaraciones de propiedades saludables que fue presentada en el año 2009 (Moreno, 2012).

1.2. Panificados funcionales

Teniendo en cuenta que el pan es muy común en la dieta occidental resulta ser una matriz conveniente para la producción de alimentos funcionales. Existen panificados formulados con incorporación de ingredientes no tradicionales para incrementar el contenido de fibras, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas de alto valor nutricional, fortificados en vitaminas o minerales, entre otros. A continuación se mencionan algunos trabajos sobre el desarrollo de panificados funcionales.

Se ha evaluado el enriquecimiento de panes con aceite de pescado con la finalidad de aumentar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en sangre. Estos ácidos grasos son reconocidos por tener un efecto beneficioso en la salud, ya que son capaces de reducir el colesterol-LDL (colesterol asociado a lipoproteínas de baja

densidad), el riesgo de enfermedades coronarias y de accidentes cerebro vasculares (Yep, Mann, Bode, & Sinclair, 2002).

Glei, Kirmse, Habermann, Persin, & Pool-Zobel (2006) evaluaron la capacidad antioxidante de panes enriquecidos con café verde obteniendo una mayor quimio protección in vitro, así como una mayor capacidad antioxidante en panes suplementados con 1% de café verde.

Estudios sobre el uso de semillas de lino en la elaboración de alimentos funcionales (entre ellos panificados) remarcan que dichas semillas presentan un excelente perfil nutricional y potenciales beneficios para la salud (asociados con el contenido de fibra dietaria) como la reducción de riesgo de diabetes y enfermedades coronarias, previniendo el cáncer de colon y reduciendo la incidencia de obesidad (Oomah, 2001). Las mismas contienen importantes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y fibra dietaria, además de su alto contenido de proteínas y han sido incorporadas en diversos estudios para la formulaciones de panificados (Kajla, Sharma, & Sood, 2014).

Liatis et al. (2009) informaron una disminución en el colesterol-LDL circulante en pacientes con diabetes tipo 2 al reemplazar en su dieta pan común por panes enriquecidos con beta-glucanos (polisacáridos no almidonosos presentes en avena, cebada, centeno, entre otros). Los efectos benéficos para la salud de los beta-glucanos están asociados a su carácter inmunomodulador, como así también a su actividad anticancerígena (Di Luzio, Williams, McNamee, & Malshet, 1980; Ooi & Liu, 2000).

Las leguminosas resultan ser una fuente muy promisoría en el desarrollo de panificados funcionales, como también de panificados con valor nutritivo aumentado. El consumo de leguminosas se ha asociado con la reducción de los niveles del colesterol sanguíneo, probablemente debido a su contenido de fibra dietaria, como así también a disminuciones en los niveles de glucosa sanguíneos en diabéticos. Algunas legumbres evaluadas como suplemento o reemplazo parcial de harina de trigo en panificados con la finalidad de mejorar las características nutritivas y/o funcionales que se han reportado en bibliografía son: panificados con harinas o aislados de soja (Basman, Kösel, & Ng, 2003; Ribotta, Pérez, Añón, & León, 2010; Sabanis & Tzia, 2009), lupino (Dervas, Doxastakis, Hadjisavva-zinoviadi, & Trianta, 1999; Doxastakis, Zafiriadis, Irakli, Marlani, & Tananaki, 2002), garbanzos (Coda, Rizzello, & Gobetti, 2010; Hefnawy, El-Shourbagy,

& Ramadan, 2012; Mohammed, Ahmed, & Senge, 2012, 2014), habas (Abdel-Aal, Sosulski, Youssef, & Adel Y. Shehata, 1993), entre otros.

En general los alimentos funcionales con niveles elevados de antioxidantes y fibras dietéticas tienen una gran demanda debido a sus beneficios asociados, entre ellos el mantenimiento de una buena salud y la protección contra las enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades degenerativas en general (Boyer & Liu 2004; Pelucchi et al., 2004; Arts & Hollman, 2005; Scott, Duncan, & Flint, 2008).

La fibra dietética puede ser incorporada a los panificados desde diversas fuentes. En bibliografía se puede encontrar un amplio espectro, por ejemplo: salvado de trigo, cebada, lino, girasol, avena, almidón resistente, entre otros (Cadden, Sosulski, & Olson, 1983; Dougherty, Sombke, Irvine, & Rao, 1988; Cho & Lee, 1996; Yue, & Waring, 1998).

1.3. Panificados con algarroba

1.3.1. Algarrobo

1.3.1.1. El Algarrobo

Por ese nombre se reconoce en nuestro País al árbol perteneciente al género *Prosopis*, subfamilia *Mimosaceae* y familia *Leguminosae*. Las leguminosas constituyen una familia que agrupa más de 700 géneros y más de 19 mil especies y son reconocibles por sus frutos del tipo legumbre, entre otras características (Magallón & Sanderson, 2001).

El género *Prosopis* incluye 44 especies distribuidas en América, África y Asia (Del Valle, Escobedo, Muñoz, Ortega, & Bourges, 1983). Cabe aclarar que, si bien ambos pertenecen a la familia de las leguminosas, el llamado “algarrobo americano” no corresponde al mismo género que el algarrobo europeo (*Ceratonia siliqua*). Dentro del género *Prosopis* se pueden encontrar desde pequeños arbustos espinosos hasta especies arbóreas de hasta 20 metros de altura y tienen relevante importancia al ser capaces de desarrollarse en zonas áridas y semiáridas gracias a su sistema radicular profundo y la simbiosis con bacterias fijadoras de N₂, permitiéndoles prosperar donde difícilmente lo hacen otras especies (Barba de la Rosa, Frias-Hernández, Olalde-Portugal, & González Castañeda, 2006).

Aprovechando la capacidad de las especies de *Prosopis* para desarrollarse en las condiciones mencionadas, es que se los ha utilizado para forestar zonas desérticas o

semi-desérticas como en el Sahel (África) donde se utilizó *P. juliflora*, en el desierto de Atacama (Chile) donde se plantó *P. tamarugo*, en Piura (Perú) con *P. pallida* y en Chaco (Argentina) donde se reforestó con *P. alba* (Figura 1.1) (Galera, 2000; Prokopiuk, Cruz, Grados, Garro, & Chiralt, 2000).

Las especies de *Prosopis* distribuidas en América van desde el sud-oeste de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina y Chile. Más de 30 se encuentran en América del Sur y en Argentina se encuentran 27 de ellas, presentando así nuestro país la mayor diversidad mundial (Aedo Bendek, 2007; Galera, 2000).

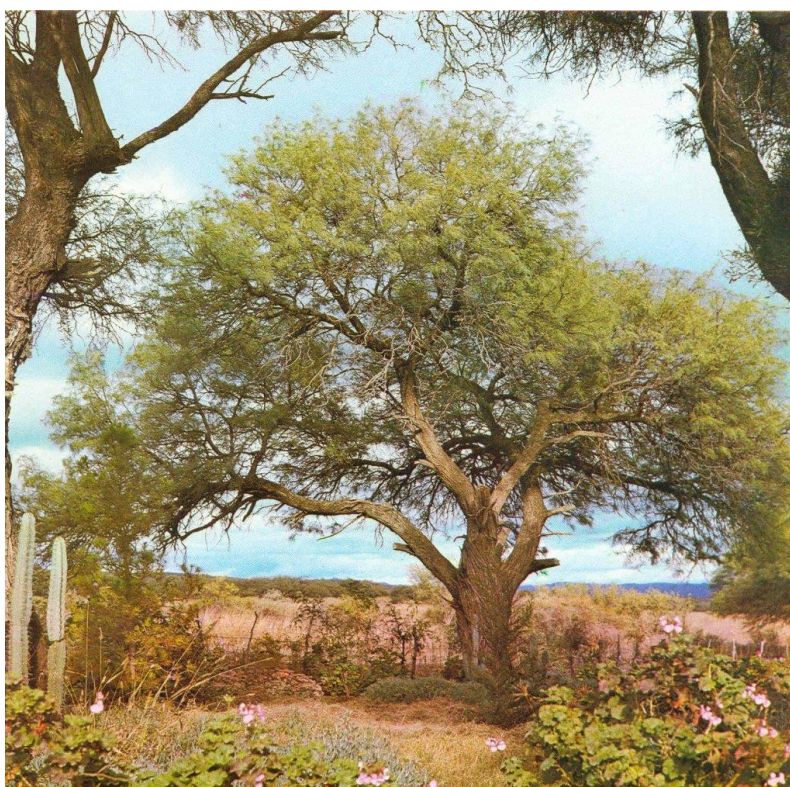


Figura 1.1. Ejemplar de *Prosopis alba*. Foto obtenida de http://es.wikipedia.org/wiki/Prosopis_alba.

El algarrobo representa un recurso natural importante que las poblaciones regionales aprovechan para alimentación humana, mediante la recolección y procesamiento de sus frutos (denominados chauchas o vainas), para uso forrajero y para aprovechamiento maderero. Dentro de otros usos tradicionales está la construcción de muebles, parquets y aberturas con la excelente madera de distintas especies; además del uso generalizado como leña y carbón (Galera, 2000).

En bibliografía se encuentra información acerca de los usos antes mencionados con diferentes especies de algarrobo. En África *P. africana* se ha utilizado ampliamente para uso forrajero y maderero, además se han introducido varias especies de América del Sur para esos mismos usos y para consumo humano. Gomes (1961) indicó que el uso de *Prosopis* en la alimentación humana es muy antiguo, tanto en América (especialmente Perú y Chile), como en Asia y África. El mismo autor hace referencia a su uso en virtud del gran valor forrajero de sus frutos. Éstos han sido utilizados para alimentar bovinos, caprinos y porcinos en Colombia y Venezuela. Varias especies del género además se han utilizado medicinalmente. En Sudamérica se utilizaron con este fin los frutos de *P. strombulífera*, *pallida*, *alba*, *alba var. panta*, *nigra*, *chilensis* y otras.

La importancia alimenticia de las legumbres se basa en general en su alto contenido de proteínas, carbohidratos y fibra. En la mayoría de los casos el contenido de lípidos es bajo (a excepción de la soja), aunque están compuestos por un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados. El contenido relativamente alto de proteínas se encuentra además acompañado por un elevado porcentaje de lisina, lo cual las hace un buen complemento con las proteínas de cereales, que en general poseen una deficiencia en dicho aminoácido esencial. También son una buena fuente de vitaminas hidrosolubles y de algunos minerales como calcio, hierro, zinc, fósforo, potasio y magnesio.

En Argentina el fruto del algarrobo se utiliza en pastoreo directo y diferido (los frutos se recolectan y se secan) para suplemento en invierno, para ganado vacuno, caballar, caprino y porcino. También se utiliza como alimento para humanos. A partir de dicho fruto se preparan también bebidas alcohólicas, como la “aloja”, común también a otros países sudamericanos, que es un producto derivado de la fermentación de los frutos maduros molidos, colocados en agua en un recipiente cerrado y al abrigo de la luz. El preparado se deja fermentar por varios días y luego es filtrado y refrigerado para su almacenamiento. En el sur de Perú, un tipo de aloja obtenida de *P. alba* fue tradicionalmente usada como bebida ritual y sólo podían consumirla caciques y brujos de las tribus (Galera, 2000; Prokopiuk et al., 2000; Prokopiuk, Martínez-Navarrete, Andrés, Chiralt, & Cruz, 2010).

El procesamiento de los frutos de algarrobo es dependiente del producto que se desee obtener, ya sea utilizando la totalidad de la vaina o alguna de las fracciones (exocarpio, mesocarpio, endocarpio o semillas). En general se realiza un secado (natural o artificial)

de las vainas que luego se muelen y se prepara la denominada harina de algarroba; esta se puede utilizar mezclada con leche fluida obteniéndose una bebida nutritiva y con un sabor semejante al chocolate. Esta misma harina también se utiliza en la preparación del “patay” una torta seca cruda que puede guardarse por varios meses, como también en otras tortas cocidas al horno.

1.3.1.2. Algarroba

El fruto maduro del algarrobo se denomina “algarroba” (Figura 1.2). Es una vaina amarillenta, marrón o negra (dependiendo de la especie), compuesta por: exocarpio, mesocarpio (pulpa), que juntos representan entre 55-58% en peso del fruto, según la especie, endocarpio (30-35% del fruto) y semillas (aproximadamente 10-14%) (Grados & Cruz, 1996; Sciammaro, Ferrero, & Puppo, 2015). En la Figura 1.3 se pueden apreciar las diferentes partes de las vainas de algarroba.

Las vainas secas, ya sea por método natural (al sol) o en estufas, pueden ser aprovechadas para uso forrajero o para fines alimentarios humanos. En el caso de este último se realiza una molienda de las vainas completas, obteniéndose como producto la harina de vaina de algarrobo, aunque la molienda puede también realizarse sólo con las semillas para obtener la harina de semillas de algarroba.

En nuestro país, el Código Alimentario Argentino (CAA) tipificó durante mucho tiempo en su artículo 681 como “harina de algarroba” al producto de la molienda de las semillas limpias, sanas y secas, del algarrobo blanco (*P. alba Griseb*) y/o algarrobo negro (*P. nigra (Grisebach) Hyeronimus*), dos especies de fuerte presencia en la región chaqueña. En septiembre de 2010 se incorpora al CAA la “harina de fruto de algarrobo” como el producto de la molienda de los frutos completos, limpios, sanos y secos del algarrobo blanco y/o algarrobo negro (CAA, 2014).



Figura 1.2. Frutos maduros de *Prosopis alba* y *Prosopis nigra*. Imágenes obtenidas de Galera, (2000) y <https://aseretselene.files.wordpress.com/2013/10/algarroba-semillas.jpg>

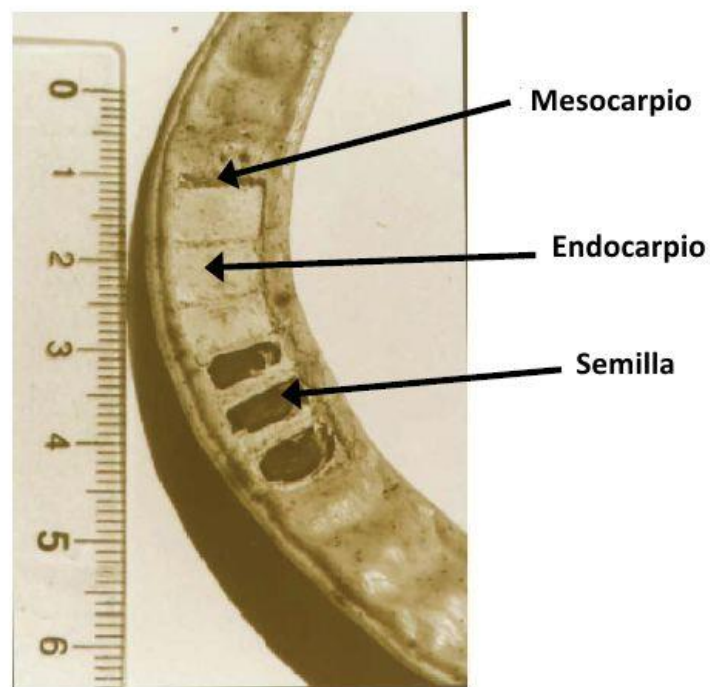


Figura 1.3. Fracciones de la vaina de algarroba. Adaptado de Felker, Takeoka, & Dao (2013).

Grados & Cruz (1996) propusieron la separación en tres fracciones de la vaina para la posterior obtención de diversos productos (Figura 1.4). Los mismos autores informaron la siguiente composición para la pulpa del fruto de *P. pallida*: 46% de sacarosa, 32% de

fibra total, 8% de proteína, 2% de azúcares reductores, 0,8% de pectinas, 0,8% de grasas y 0,8% de polifenoles. El endocarpio del *P. pallida* representa un 35% del peso del fruto y su composición es principalmente de fibra insoluble (más del 70%); también contiene un 4% de proteínas, 1,6% de azúcares solubles y 1,3% de lípidos. En la semilla se pueden distinguir tres fracciones: la cáscara, en la que se destaca el contenido de taninos, el endospermo, compuesto básicamente por un polisacárido del tipo galactomanano con una proporción galactosa:manosa (1:1,4), similar a la de la goma guar (1:1,2) obtenida de la leguminosa asiática *Cyamopsis tetragonolobus*, y el germen, rico en proteína (65%) y aceite (7,2%).

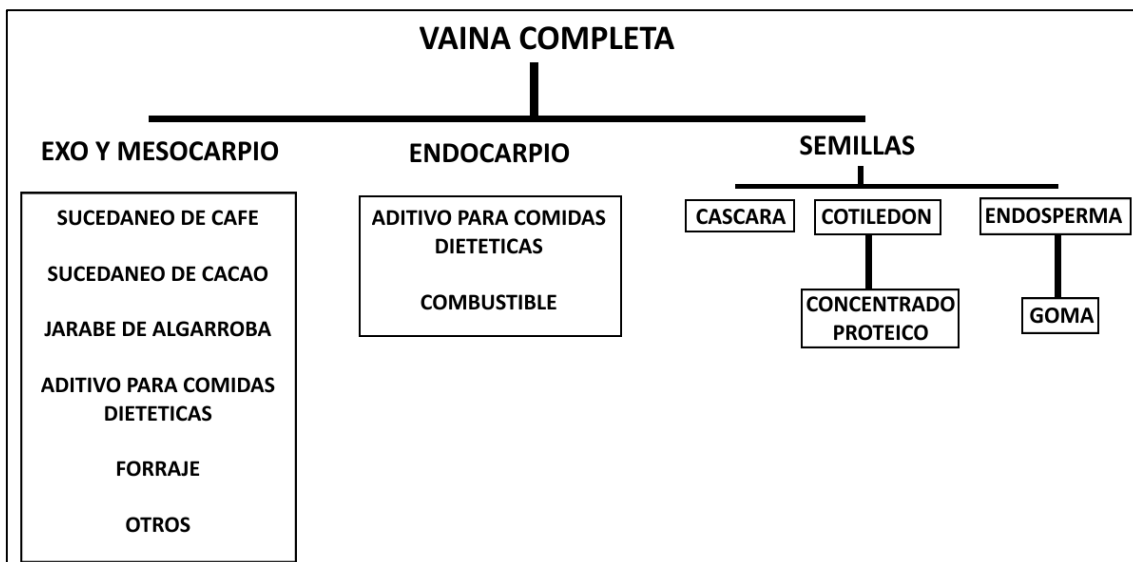


Figura 1.4. Posibles utilidades de la algarroba. Adaptado de Grados & Cruz (1996)

Felker et al. (2013) informaron para *Prosopis alba* un contenido proteico de 30% para las semillas completas y entre un 55 y 60% de proteína en las semillas sin cáscara para la misma especie. Los mismos autores destacan un contenido de azúcar (principalmente sacarosa) mayor al 50% en la fracción del mesocarpio de las vainas. Cardozo et al. (2010) por otro lado informaron un contenido de 42,19 y 27,13% (en base seca) de sacarosa y 3,73 y 3,17% (en base seca) de azúcares reductores para harinas de vainas completas de *Prosopis alba* y *Prosopis nigra* respectivamente. Los mismos autores indicaron un contenido de compuestos fenólicos cercano a 0,40% (expresado en g de ácido gálico cada 100 g de materia seca) y de flavonoides de 0,03 y 0,13 g (expresado en g equivalentes de quercitina cada 100 g de materia seca) para harinas de las mismas

especies. En un estudio sobre vainas y semillas de *Prosopis alba*, Sciammaro et al. (2015) informaron un contenido de proteína de 5,81% (base seca) para la harina de vaina completa y de 32,3% (base seca) para las semillas.

Las harinas de algarroba son dulces por su alto contenido de sacarosa y constituyen un alimento nutricionalmente valioso ya que aporta energía debido a su alto contenido de azúcares, tiene un contenido proteico apreciable y aporta lípidos de buena calidad. También contiene, entre otros minerales, potasio, calcio y magnesio. Sciammaro et al. (2015) informaron un contenido de cenizas de 3,4% (base seca) en las vainas completas de *Prosopis alba*, con un contenido de potasio cercano a 1000 mg /100 g de materia seca y seguido en concentración por calcio (superior a 200 mg /100 g de materia seca) y magnesio (69 mg /100 g de materia seca). Los mismos autores también informaron trazas de hierro, zinc y manganeso en los frutos de *Prosopis alba*.

A partir de estas harinas pueden obtenerse diferentes tipos de productos con fines alimentarios. Además de su aporte nutricional debe destacarse el alto contenido de fibra dietaria (principalmente fibra insoluble) presente en las harinas de algarroba. Se han informado contenidos de fibra dietaria total para pulpa (mesocarpio) de *Prosopis alba* entre 22,6 y 32,5% (base seca) y 32,2% (base seca) para pulpa de *Prosopis pallida*, mientras que para las vainas completas se han informado valores de 48,2 y 45,9% (base seca) para *Prosopis alba* y *nigra* respectivamente (Bravo, Grados, & Saura-calixto, 1994; Felker et al., 2013; González Galán, Duarte Corrêa, Patto de Abreu, & Piccolo Barcelos, 2008; Prokopiuk et al., 2000; Sciammaro et al., 2015).

La composición aminoacídica de las proteínas revela la presencia de importantes cantidades de aminoácidos esenciales, excepto (según la especie) de metionina, isoleucina y treonina (Felker & Bandurski, 1977; Marangoni & Alli, 1988). Por otro lado, el contenido relativamente alto de lisina de la algarroba la convertiría en un buen complemento de otras proteínas deficientes en este aminoácido, como son las de cereales (Marangoni & Alli, 1988).

Actualmente en nuestro país, el consumo es mayormente de tipo regional, aunque en los últimos años se ha intentado introducirlo al mercado de la Capital Federal y provincia de Buenos Aires.

1.3.2. Panificación con trigo

1.3.2.1. Harina de trigo

1.3.2.1.1. Trigo

El trigo (género *Triticum*) es uno de los tres granos más producidos a nivel mundial (junto al arroz y el maíz). Pertenece a la familia de las gramíneas y engloba a un gran número de especies y sub-especies, entre las que se encuentran las mayormente cultivadas por el hombre (*T. durum* y *T. aestivum*). En el mundo, el trigo es asociado principalmente con los productos panificados destinados a la alimentación humana (Barberis, 2014), esto es debido a las características únicas (descriptas más adelante) que la harina proveniente del mismo provee para la elaboración de dichos productos.

El cultivo de trigo se puede dar en condiciones climáticas y de suelo bastante diversas (dependiendo de las especies), aunque los mejores rendimientos se obtienen en climas templados con temperaturas entre los 10 y 24°C y con cantidades de lluvia entre los 400 y 500 mm de agua/ciclo. En la Figura 1.5 se observan las cosechas obtenidas por los productores de trigo más importantes durante las campañas 09/10, 10/11, 11/12 y 12/13 (FAO, 2014). Los principales productores son la Unión Europea, China e India, que en conjunto superan el 53% de la producción mundial. Le siguen en producción EEUU, Rusia, Canadá, Australia y Argentina.

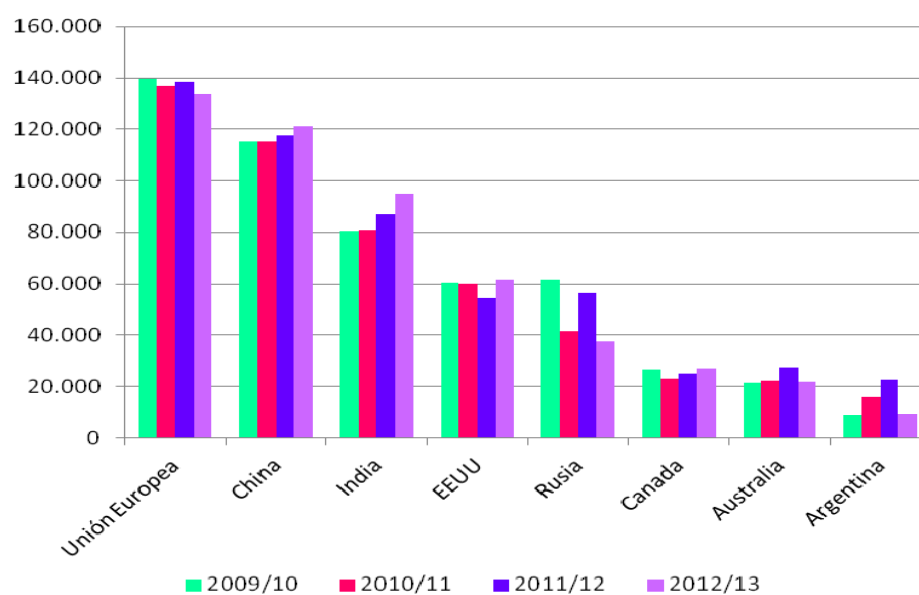


Figura 1.5. Principales productores mundiales de trigo. Fuente: FAO 2014.

En abril de 2014 el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estimó una producción mundial de trigo 2013/14 de 712,52 millones de toneladas, 8,53% superior respecto a la campaña 2012/13. En una nota informativa publicada en octubre de 2015 la FAO (FAO, 2015) prevé una producción mundial de trigo cercana a las 736 millones de toneladas, superando la producción récord alcanzada en 2014 en unos 3 millones de toneladas. El mismo informe prevé un consumo de 491 millones de toneladas de trigo como alimento durante 2015/2016, dando un consumo anual per cápita de 67Kg. El trigo es el segundo cereal más consumido del mundo, por debajo del maíz que se ha incrementado cerca de un 35% durante los últimos 10 años, según datos de la USDA. La industrialización del trigo da lugar a dos ramas de productos, los denominados de primera industrialización, entre los que se encuentra la harina, y los de segunda industrialización, tales como los panificados, las galletitas y las pastas.

1.3.2.1.1.1. Molienda del trigo

La harina de trigo es el resultado de la molienda de los granos de trigo (Figura 1.5). El mismo se compone de tres partes fundamentales: el salvado, el germen y el endospermo, representando aproximadamente el 14%, 3% y 83% en peso del grano respectivamente. El salvado está formado por diferentes capas que recubren el endospermo (desde el exterior hacia el interior): epidermis, epicarpio, celdas transversales, endocarpio, testa, epispermo y capa de aleurona; y su composición es principalmente fibras celulósicas y hemicelulósicas, cenizas y ácido fítico. El germen del trigo es rico en proteínas, lípidos y vitamina E. El endospermo contiene cerca del 70% de las proteínas del grano, situándose las mismas sobre todo en las partes más externas. Además el endospermo contiene la totalidad del almidón del grano.

La harina de trigo se obtiene del endospermo, pero debido a la forma del mismo, que posee un repliegue, es imposible eliminar los tegumentos externos (salvado) por abrasión del mismo. Para poder obtenerla debe realizarse la molturación de los granos, que consta de sucesivas trituraciones y luego separar las diferentes fracciones por tamización y separación por diferencias de densidad. Antes de comenzar con las etapas de molturación se realiza la limpieza y lavado de los granos. Luego se realiza un acondicionamiento de la humedad de los mismos (entre 15 y 17%) para optimizar el proceso de la molienda, logrando una textura dura y elástica para el salvado y blanda

para el endospermo, que facilitará la separación posterior entre ellos.

Los granos pasan a través de una serie de rodillos acanalados cada vez más próximos entre sí. El germen se aplana y puede separarse relativamente fácil por tamizado, mientras que para separar el endospermo del salvado la molienda debe repetirse varias veces. De esta forma se logran desprender los trozos de salvado que con la ayuda de tamices y equipos específicos de aspiración de aire son separados debido a poseer menor densidad que los fragmentos de endospermo. Una vez separado el endospermo se puede reducir su tamaño de partícula con el uso de rodillos lisos si se desea obtener harinas más finas. (Cheftel & Cheftel, 1976).

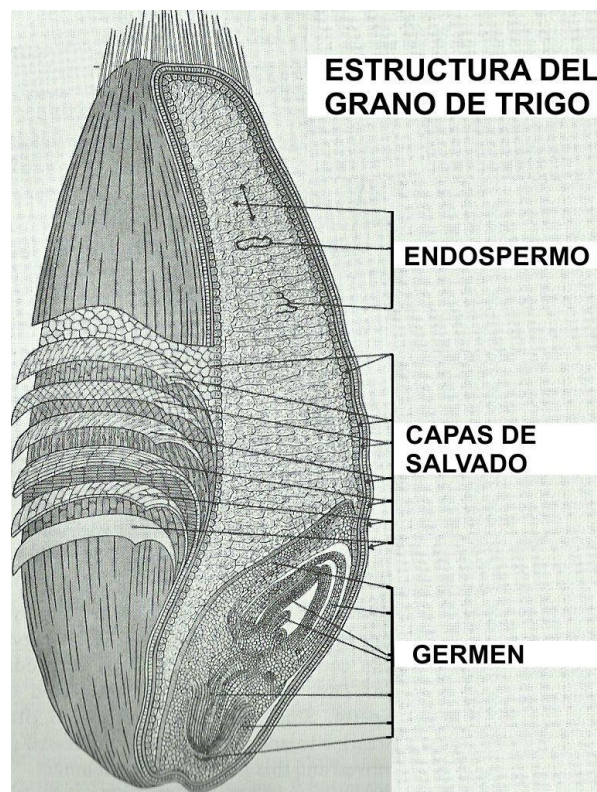


Figura 1.5. Estructura del grano de trigo. Imagen adaptada de Potter (1968).

El tipo de harina resultante de la molienda y sus posibles aplicaciones serán dependientes de la especie de trigo utilizada. Los granos de “trigo duro” (*T. durum*) presentan mayor facilidad a la molturación, triturándose de una forma más o menos regular, y dan lugar a harinas con una mayor granulometría. Este tipo de harinas son las utilizadas principalmente en la elaboración de pastas. Por otro lado, a partir de los “trigos blandos” (*T. aestivum*), donde los granos se fracturan en forma más aleatoria e

irregular, se obtienen harinas muy finas que se emplean mayormente en productos panificados (Hoseney & Rogers, 1990).

En la Argentina el cultivo de trigo se ha difundido a zonas no tradicionales en la producción del mismo, como son las provincias del Noroeste (NOA) y Noreste (NEA). Según datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, las principales provincias productoras de trigo (en orden decreciente) son: Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos y las provincias del NOA y del NEA (Lezcano, 2011).

En nuestro país el consumo de harina de trigo es de aproximadamente 80-90 Kg per cápita y su destino industrial aproximado es: 70% pan tradicional, 8% pastas secas, 2% pastas frescas, 7% galletitas, 3% pan industrial, 10% harina fraccionada (García, 2005).

1.3.2.1.2. Clasificación de las harinas de trigo

El Código Alimentario Argentino (CAA) en su Capítulo IX, artículo 661 (Res 167, 26.1.82) define como Harina al producto obtenido de la molienda del endospermo del grano de trigo y tipifica comercialmente a las harinas. La tipificación de las harinas se basa en 1) el contenido de cenizas determinado a 900-920 °C (calculadas sobre residuo seco), 2) la humedad determinada a 130 °C durante una hora, 3) la absorción farinográfica de agua (cantidad de agua que absorben 100 g de harina) y 4) el volumen de pan que puede obtenerse a partir de 100 g de harina.

En la Tabla 1.1 se muestran las características requeridas para los diferentes tipos de harinas.

Tabla 1.1. Tipificación comercial de las harinas según el CAA

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

1.3.2.1.3. Componentes principales de la harina de trigo

La composición de la harina de trigo promedio se muestra en la Tabla 1.2. Como ya se mencionó, cerca del 70% de la harina obtenida se utiliza en la fabricación de pan, siendo las harinas de trigo y en menor grado la de centeno las únicas que resultan panificables. Esta particularidad se debe a las características de las proteínas: gliadinas y gluteninas presentes en el grano. (Lindsay & Skerritt, 1999; Shewry, Popineau, Lafiandra, & Belton, 2001).

Tabla 1.2. Composición química aproximada de la harina de trigo.

Componente	Contenido (%)
Almidón	70 - 75
Proteínas	10,0 – 12,0
Lípidos	2,0
Pentosanos	2,0 – 3,0
Cenizas	0,5
Humedad	14

Los componentes mayoritarios de la harina de trigo son el almidón y las proteínas. Juntos son los principales responsables de las propiedades físicas y químicas de la harina y de los productos obtenidos a base de ella. A continuación se describen brevemente las características de estos componentes de la harina de trigo.

1.3.2.1.3.1. Almidón

El almidón es el hidrato de carbono de reserva de la mayoría de los vegetales, entre ellos el trigo. En el grano de trigo se encuentra en las células del endospermo empaquetado en forma de gránulos. Está compuesto por dos polisacáridos de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa, que representa cerca del 25% del almidón, está formada por residuos de glucosa unidos a través de enlaces α (1->4) (Figura 1.6A). Sus cadenas son lineales y presentan una estructura helicoidal, donde los grupos hidroxilo están orientados hacia el exterior, estableciéndose así un ambiente no polar hacia el interior de la hélice en el cual pueden incluirse moléculas tales como los ácidos grasos. La amilopectina (75% restante del almidón) es un polímero altamente ramificado formado

por cadenas de residuos de glucosa unidos a través de enlaces α (1- \rightarrow 4), como en la amilosa, conectadas unas a otras a través de enlaces α (1- \rightarrow 6) (Figura 1.6B).

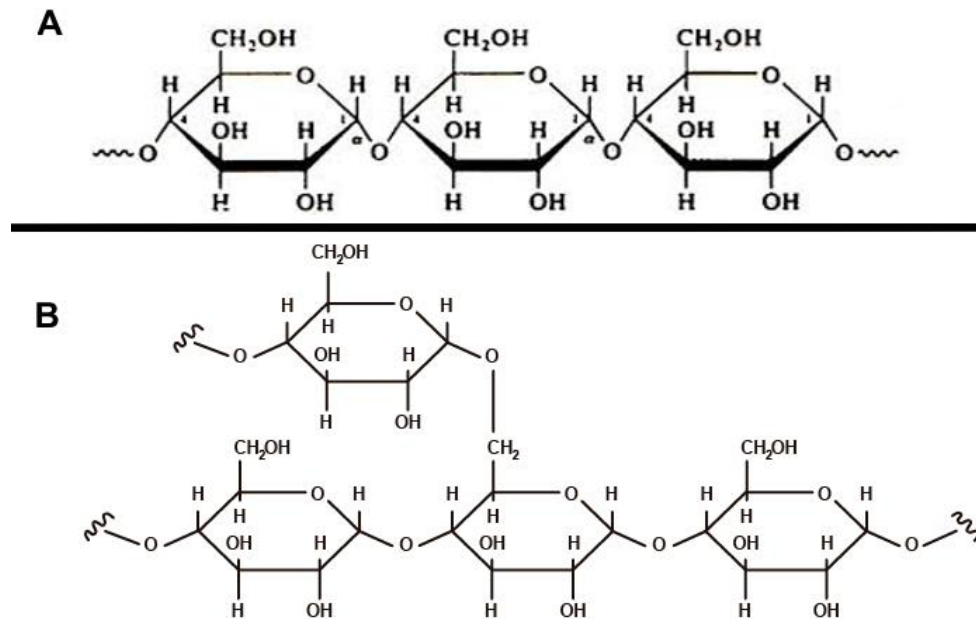


Figura 1.6. Estructura de **A)** Amilosa, **B)** amilopectina.

El tamaño de los gránulos de almidón es dependiente de la especie vegetal que se trate, variando notablemente entre tubérculos, raíces y los diferentes cereales. En la harina de trigo se evidencia una distribución bimodal en el tamaño de los gránulos de almidón, los de menor tamaño son esféricos y con diámetros de hasta 10 μm mientras que la población de gránulos de mayor tamaño presenta un tamaño de hasta 20 μm y un aspecto lenticular (Karlsson, Svalov, Olered, & Eliasson, 1983; Moon, Giddings, Moon, & Giddings, 1993). Al observarlos con un microscopio de luz polarizada presentan birrefringencia con la aparición de una cruz de Malta característica, la cual refleja el arreglo radial de las moléculas de almidón en el gránulo alrededor del centro biosintético, el hiliun (Jane, 2004). En la Figura 1.7 se ilustran las zonas amorfas y cristalinas del gránulo de almidón y el arreglo radial de las cadenas de amilopectina.

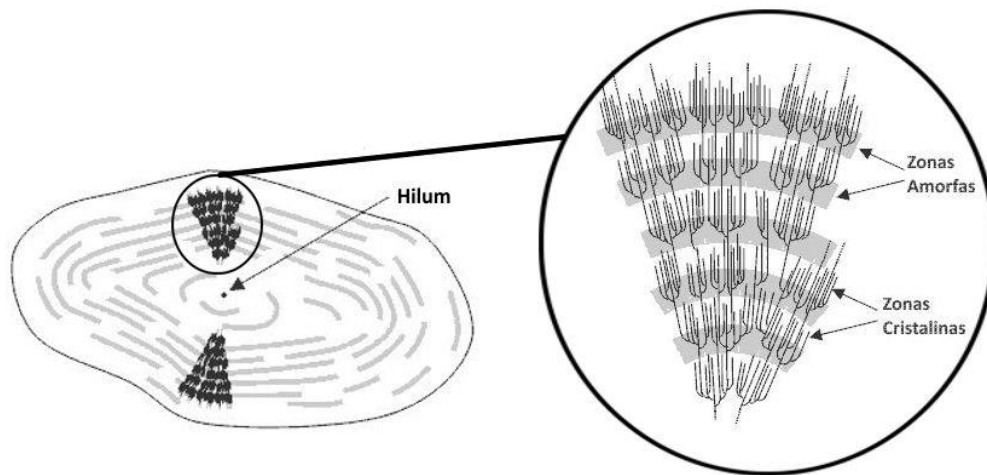


Figura 1.7. El gránulo de trigo y la disposición de las cadenas de amilopectina que dan lugar a las zonas amorfas y cristalinas.

La cristalinidad de los gránulos está fundamentalmente ligada a la amilopectina. Las zonas cristalinas del gránulo corresponden a aquellas donde las cadenas poco ramificadas de amilopectina se organizan de forma paralela unas con otras, estabilizadas por puentes de hidrógeno. Por otro lado, las zonas amorfas del gránulo son aquellas donde predominan las ramificaciones de la amilopectina que impiden una estructuración de las cadenas. En este caso las interacciones de puente hidrógeno resultan más débiles debido a la mayor distancia entre las cadenas. Este hecho explica por qué la gelatinización del almidón comienza en las zonas amorfas del gránulo, como se discute más adelante.

Cuando se prepara una suspensión de almidón en agua los gránulos absorben parte de la misma y son capaces de incrementar su tamaño entre 10 y 30% (Dengate, 1984). Al calentar la suspensión de almidón se produce la gelatinización del mismo. El proceso comienza en las zonas amorfas (vítreas) de los gránulos (por absorción de agua y pasaje al estado gomoso) y continúa en las zonas cristalinas, el incremento de temperatura debilita los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas de amilopectina y se pierde la birrefringencia de los gránulos debido a la pérdida de la estructuración. El tamaño de los gránulos se incrementa, parte de la amilosa es lixiviada al medio y se incrementa la viscosidad del sistema.

Al analizar la gelatinización del almidón en una suspensión (exceso de agua) por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se puede observar una endoterma cuya

temperatura de pico y amplitud térmica depende de la procedencia del almidón. Para el caso del almidón de trigo la endoterma puede encontrarse aproximadamente entre 50 y 80 °C. Analizando la gelatinización por DSC pero con restricción de la cantidad de agua se produce un incremento en la amplitud térmica de la endoterma y un desdoblamiento del pico (Ghiasi, Hosney, & Varriano-Marston, 1982). Una continuidad del calentamiento (o la aplicación de un esfuerzo de cizalla) provoca un incremento en la ruptura de los gránulos y una mayor salida de amilosa al medio.

Cuando se enfría el almidón gelatinizado se produce la gelificación de la amilosa que rodea los gránulos. Con el paso del tiempo se produce la retrogradación del almidón, que involucra una cristalización tanto de la amilosa como de la amilopectina. Durante las primeras horas se produce la retrogradación de las moléculas lineales de amilosa, mientras que el proceso lleva de días a semanas para el caso de la amilopectina que se encuentra alojada dentro los gránulos gelatinizados.

Durante el amasado de la harina de trigo con agua, el almidón absorbe cerca del 40% del agua agregada (Stauffer, 1998) y actuaría como relleno en la matriz de la masa contribuyendo a aumentar su viscoelasticidad. Lindahl & Eliasson (1986) propusieron la existencia de interacciones entre el almidón y las proteínas del gluten y que las mismas se producen a través de una interacción superficial entre el gránulo y las gliadinas y gluteninas que constituyen el gluten. Tolstoguzov (1997) por otra parte, ha propuesto que en la masa coexisten dos fases, y que el almidón y las proteínas del gluten se encontrarían formando parte de una de ellas.

El proceso de horneado de una masa de trigo provoca una gelatinización del almidón en un entorno de limitación de agua. La gelatinización contribuye al volumen de pan y a la estabilización de la estructura de la miga (Eliasson, 2003). Durante el almacenamiento, el almidón retrograda y provoca, junto con otros procesos, el endurecimiento de la miga de pan (Pateras, 1998).

1.3.2.1.3.2. Las proteínas del gluten

Desde el punto de vista de la funcionalidad de las proteínas, se pueden distinguir dos grupos de proteínas de trigo:

- **Proteínas no formadoras de gluten:** representan entre un 15-20% del total de las proteínas del trigo (según clasificación de Osborne son las albúminas y globulinas). En su mayoría son proteínas monoméricas, estructurales o fisiológicamente activas (enzimas).
- **Proteínas formadoras de gluten:** son las proteínas de reserva del grano de trigo y constituyen entre el 80 y el 85% de las proteínas totales. Como gluten se designa a la red formada por gluteninas y gliadinas hidratadas durante el amasado.

La fracción de gluteninas comprende agregados proteicos que se mantienen unidos por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes intermoleculares, y cuya masa molecular varía entre 500.000 y más de 10 millones de Da (Wieser, 2007). Cuando las gluteninas son tratadas con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) más un agente reductor, como el β -mercaptoetanol, se obtienen dos grupos de proteínas: las subunidades de bajo peso molecular (LMW-GT) y las subunidades de alto peso molecular (HMW-GT) (Wieser, 2000). Las subunidades LMW-GT poseen la habilidad de formar puentes disulfuro que permiten su incorporación dentro de los polímeros de gluteninas. En general, estas proteínas se relacionan con la resistencia y la elasticidad de la masa (Metakovskii, Wrigley, Bekes, & Gupta, 1990; Cornish, Bekes, Allen, & Martin, 2001). Shewry et al. (2001) presentaron un modelo estructural de HMW-GT, basado en datos espectroscópicos, donde muestran a las subunidades de gluteninas de alta masa molecular como moléculas alargadas que poseen una estructura β -espiral repetitiva en la región central, mientras que los dominios N- y C-terminal poseen una estructura similar a las proteínas globulares, presentando α -hélices y estructura desordenada. En los dominios terminales se encuentran la mayoría de los residuos de cisteína que proveen de los sitios para la formación de puentes disulfuro intermoleculares. A las gluteninas, sobre todo a las HMW-GT, se les asigna la capacidad de conferir a la masa las propiedades viscoelásticas, debido a la repetición de las estructuras tipo giro- β .

Las gliadinas son un grupo altamente polimórfico de proteínas monoméricas con un bajo nivel de aminoácidos cargados. Poseen una masa molecular que varía entre los 30.000 y 80.000 Da. Las gliadinas interactúan con las gluteninas a través de enlaces no covalentes y son las responsables de las características extensibles de la red de gluten. La Figura 1.8 muestra un esquema de la estructura del gluten presentado por Shewry et

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

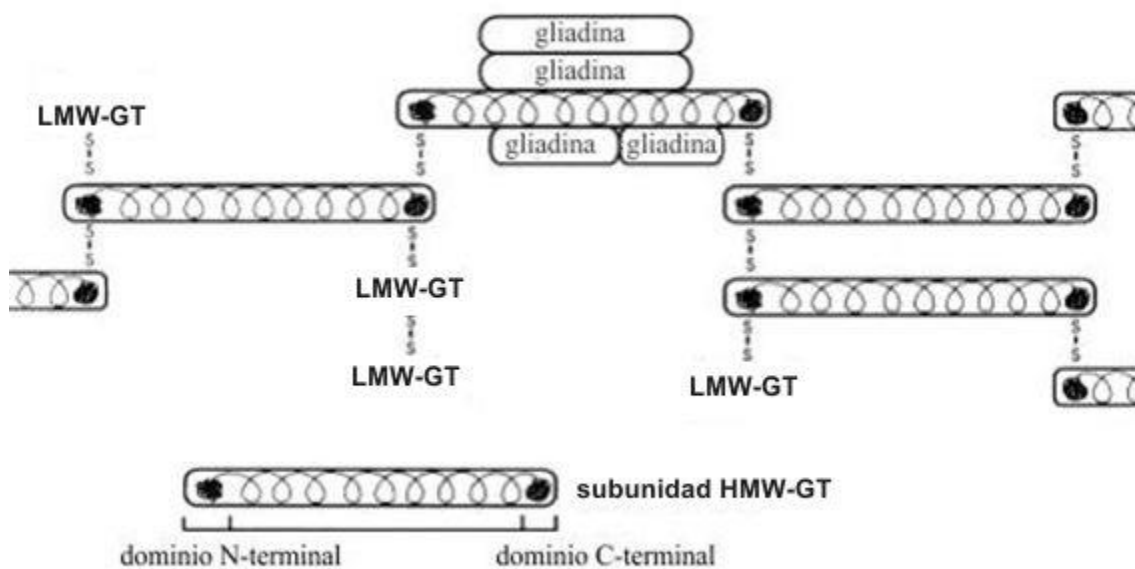


Figura 1.8. Esquema de la estructura de la matriz de gluten. Imagen adaptada de Shewry et al. (2001).

1.3.2.2. El proceso de panificación

Como ya se mencionó, la capacidad de la harina de trigo para formar una masa viscoelástica está íntimamente relacionada con las características de las proteínas de reserva del grano de trigo (gliadinas y gluteninas) que permiten la obtención del pan y otros productos leudados.

Existen diferentes procesos de panificación, aunque todos comparten ciertas etapas

generales que se basan en la formación de una masa con adecuadas características viscoelásticas, incorporación de aire (O_2 y N_2 mayoritariamente), formado de las piezas, fermentación y horneado. Todas las etapas contribuyen a la calidad final del producto, aunque las propiedades más relevantes se obtienen durante la etapa de amasado. Los cambios deseables resultantes de un desarrollo óptimo de la masa están asociados a la capacidad de la masa de retener burbujas de gas (CO_2) y permitir, durante las fases de fermentación y horneado, la expansión uniforme de la pieza. Para mejorar la expansión de la masa y la retención de gas es necesario obtener masas con un adecuado balance entre tenacidad, elasticidad y extensibilidad. Además la reducción de la resistencia y elasticidad son importantes en la modificación de la estructura de las burbujas durante el proceso (Cauvain, 2002).

1.3.2.2.1. Amasado

Durante el amasado los componentes de la harina son hidratados y como resultado de la entrega de energía mecánica se produce el desarrollo de la red cohesiva y viscoelástica de gluten. Durante esta etapa se incorpora aire al sistema. Al final del amasado la masa panaria debe tener las características viscoelásticas óptimas para el procesado posterior (Belton, 2003). Cuando el amasado es insuficiente o excesivo las propiedades viscoelásticas del gluten y de la masa obtenida serán pobres y esto afectará el éxito de las etapas siguientes y la calidad de los productos resultantes.

El O_2 incorporado a la masa es rápidamente consumido por las levaduras, mientras que el N_2 quedará retenido en forma de burbujas. Estas se convertirán en los alveolos de la miga del pan durante la fermentación y horneado con la migración del CO_2 generado hacia los mismos. Inicialmente el CO_2 se encuentra soluble en la fase acuosa hasta la saturación de la misma. La obtención de un pan de buena calidad por lo tanto está relacionada con un proceso de amasado donde se produzca un desarrollo óptimo de la red de gluten (con un balance entre las propiedades viscosas y elásticas del mismo) y una adecuada incorporación de gas (Maloney & Foy, 2003; Campbell, 2003; Gan, Ellis, & Schofield, 1995).

1.3.2.2.2. Laminado

La función del laminado es extender la estructura alveolar y reorientar las proteínas del gluten.

1.3.2.2.3. Reposo

Durante el mismo se busca la relajación parcial de las tensiones generadas durante el amasado. Esto facilita la división y moldeado de la masa. Además durante el reposo hay producción de sustancias que aportan sabor y aroma característicos al producto.

1.3.2.2.4. División, boleado y armado

La división o cortado de la masa responde al tamaño de las piezas de pan que se pretendan obtener. El cortado genera rupturas en la estructura del gluten que se recuperan parcialmente con el boleado de las piezas. Luego se realiza un reposo de las piezas boleadas y finalmente se procede al armado con la forma que se desee para los panes. El armado suele realizarse en máquinas destinadas a dicho fin o puede realizarse manualmente.

1.3.2.2.5. Fermentación

Las piezas formadas en la etapa anterior se dejan reposar y fermentar a temperatura controlada (aproximadamente 30 °C) por acción de las levaduras. Durante el proceso se libera la mayor parte del CO₂, que produce la expansión de la masa debido al crecimiento de los alveolos. Junto a la producción de CO₂ hay generación de etanol y se producen cambios tanto en la estructura como en el sabor y aroma. La fermentación se extiende hasta lograr el desarrollo del volumen adecuado para las piezas y su estructura se fijará durante el horneado.

1.3.2.2.6. Horneado

En esta etapa las levaduras producen CO₂ hasta que son inactivadas por el calor y se produce la expansión del gas retenido en la masa. Hay inactivación de enzimas (amilasa), pérdida parcial de agua, gelatinización del almidón y coagulación de las proteínas. Todo ello contribuye a la fijación de la estructura final del pan. Además se produce la formación de la corteza, que implica una gran pérdida de humedad en la superficie de

la masa y se promueve la reacción de Maillard que confiere el color, aroma y sabor característicos al producto. Debe tenerse en cuenta que la masa debe ser capaz de retener el gas y soportar la expansión generada durante los primeros minutos del horneado.

1.3.2.2.7. Enfriamiento

Es importante cuando el pan se envasa en rebanadas, para que no se rompa al cortarse y evitar el crecimiento de mohos que ocurriría de envasarse la pieza caliente (Pateras, 1998). La pérdida de humedad excesiva debe evitarse porque constituye una pérdida económica a la vez que acelerará el envejecimiento del pan.

1.3.2.2.8. Envasado

El pan suele envasarse en bolsas de polietileno que actúan como buena barrera a la humedad, evitando la deshidratación del producto.

1.3.2.2.9. Envejecimiento del pan

El envejecimiento (*staling* en inglés) es el conjunto de cambios físico-químicos que lleva a la pérdida de la calidad del pan durante el almacenamiento. Durante el mismo se endurece la miga, hay pérdida de cohesividad y se pierde el aroma característico a recién horneado, entre otros cambios. El proceso comienza en cuestión de horas luego del horneado. Se produce una reorganización de las moléculas de almidón y se recupera cierta cristalinidad (perdida durante el horneado debido a la gelatinización). (Atwell, Hood, Lineback, Varriano-Marston, & Zobel, 1988; Gray & Bemiller, 2003; Rodríguez-Sandoval, Fernández-Quintero, & Alaya-Aponte, 2005).

Además del endurecimiento, en la miga se produce pérdida de elasticidad y un ablandamiento de la corteza. Estos cambios son debidos a la migración de agua desde la miga y a la retrogradación de amilopectina. (Czuchajowska & Pomeranz, 1989; He & Hosney, 1990; Piazza & Masi, 1995; Hug-Iten, Handschin, Conde-Petit, & Escher, 1999; Baik & Chinachoti, 2000; Gray & Bemiller, 2003).

El almidón es el componente del pan que tiene el papel más importante durante los cambios que se producen en el envejecimiento. La amilosa gelifica rápidamente luego de obtener el producto y recristaliza parcialmente durante las primeras horas formando

dobles hélices. También se produce cristalización parcial de cadenas cortas de amilopectina en esta etapa. En los días siguientes se produce la recrystalización de la amilopectina que se encuentra en los gránulos gelatinizados de almidón, provocando una pérdida en la retención de agua de la miga y por lo tanto promoviendo la migración de la misma hacia el entorno (Kim & D'Appolonia, 1977; Morad & D'Appolonia, 1980; Miles, Morris, Orford, & Ring, 1985; Rodriguez-Sandoval et al., 2005). En la Figura 1.9 se esquematizan los procesos de gelatinización y retrogradación del almidón.

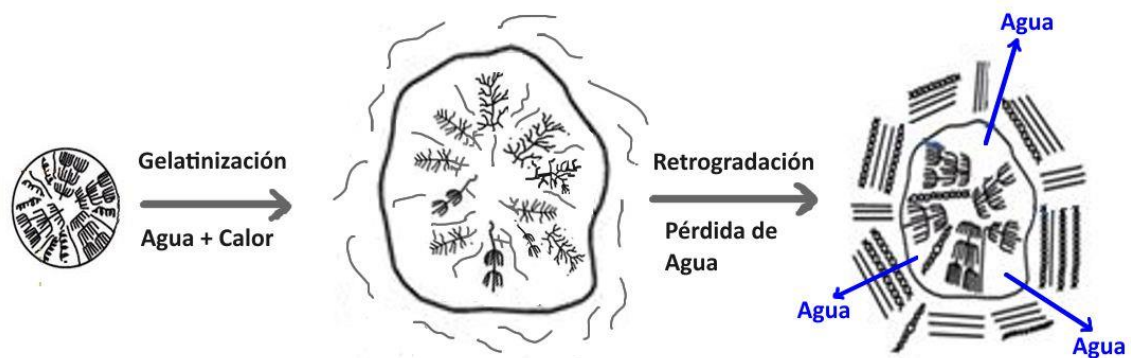


Figura 1.9. Gelatinización y retrogradación del almidón.

1.3.2.3. Aditivos de panificación

En la fabricación de panificados, como en la de otros alimentos existe una amplia gama de aditivos mejoradores. Su utilización tiene la finalidad de mejorar la calidad del producto final, facilitar etapas del procesamiento, suplir alguna propiedad que pueda estar disminuida por razones inherentes a la materia prima, extender la vida útil del producto, entre otras.

Entre los aditivos más utilizados en panificación se encuentran los agentes redox, los emulsificantes, los hidrocoloides y las enzimas.

Los agentes redox son capaces de modificar la fortaleza de las masas. Por lo general se utilizan agentes oxidantes para adicionar harinas que dan lugar a masas débiles. Éstos son capaces de promover la generación de enlaces disulfuro entre las moléculas del gluten. Uno de los mejoradores más utilizados en panificación es el ácido ascórbico (vitamina C), que ha sido indicado por diversos autores como un acondicionador de la harina de trigo. El Código Alimentario Argentino autoriza la utilización de ácido ascórbico (AA) según las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y permite un límite máximo de

adición en harinas de 0,04 g/100 g. Los niveles normalmente utilizados de adición en harinas para la fabricación de pan varían entre 0,002 y 0,015 g/100 g (Joye, Lagrain, & Delcour, 2009). En realidad el AA es un agente reductor y el mismo es comúnmente utilizado en la industria alimentaria como preservador (antioxidante). Para justificar la acción beneficiosa que se le atribuye al AA en panificación debe mencionarse la presencia natural de glutatión en las harinas de trigo; este último tiene una influencia negativa en el desarrollo de la red de gluten ya que el mismo interfiere con la formación de los puentes disulfuro entre las proteínas durante el amasado. El AA es convertido primeramente a ácido dehidroascórbico por acción del O₂ que es incorporado a la masa durante el amasado, reacción catalizada por la enzima ácido ascórbico oxidasa que se encuentra naturalmente en las harinas de trigo. Luego el ácido dehidroascórbico oxida al glutatión presente y por lo tanto impide que este interfiera en el entrecruzamiento de las proteínas del gluten. (Cauvain & Young, 2001; Roth, 2013)

La generación de enlaces disulfuro está directamente relacionada con la obtención de una matriz de gluten más tenaz y elástica, y por lo tanto confiere dichas propiedades a la masa. Este mejorador está indicado en la preparación de masas con harinas que no tienen suficiente fuerza, debido a una pobre calidad o cantidad de gluten. Debe remarcarse que existe un dosaje óptimo para la incorporación de este y otros oxidantes y que dicho nivel es dependiente de la harina utilizada, ya que un exceso de los mismos promueve la formación de masas demasiado tenaces y que llevan a la obtención de panes con pobres volúmenes.

Los emulsificantes están reconocidos por ser mejoradores de la masa (mejoran la retención de gas y la estabilidad de la masa), de la miga (dan migas más suaves y con alveolado más uniforme) y a su vez por retrasar el envejecimiento del pan. Entre los más utilizados en panificación se pueden mencionar el Estearoil Lactilato de Sodio (SSL), los Ésteres de Mono y Diglicéridos de Ácido Diacetil Tartárico (DATEM), el Estearoil Lactilato de Calcio (CSL) y los Polisorbatos, entre otros (Cauvain & Young, 2001; Stampfli, & Nersten, 1995). El Código Alimentario Argentino establece en su Capítulo IX un límite máximo de adición en harinas de 0,5 g/100 g para los emulsionantes mencionados. El mecanismo por el cual ejercen su efecto está basado en su habilidad para formar complejos con la amilosa. Este proceso varía de acuerdo al emulsificante, la cantidad utilizada y el balance hidrofílico-lipofílico que posee cada uno. Rao, Nussinovitch, &

Chinachoti (1992) y Kamel & Ponte (1993) informaron que estos factores influyen en la interacción de estos aditivos con la amilopeptina durante la recristalización de la misma y el aumento del volumen del pan. Gómez (2011) ha informado también interacciones entre la cola lipídica del SSL y las regiones hidrofóbicas de las proteínas del gluten, modificando así la estructura de la matriz proteica en la masa.

Se ha demostrado que los hidrocoloides son capaces de generar cambios significativos en las propiedades tanto de las masas como de los productos panificados obtenidos a partir de las mismas. Existen informes de la utilización de goma xántica, goma guar, garrofín, celulosas modificadas, carragenanos, alginatos, pectinas, entre otros hidrocoloides en panificación, con diferentes resultados. En general se ha indicado que el uso de hidrocoloides modifica los procesos de gelatinización y retrogradación del almidón, las propiedades reológicas de las masas, la calidad del producto final y el envejecimiento del pan (Armero, 1999). La forma en la que interaccionan los hidrocoloides con los principales componentes de las masas es dependiente de la naturaleza química de los mismos (Linlaud, Ferrer, Puppo, & Ferrero, 2011). Un aspecto importante a tener en cuenta es que los hidrocoloides por lo general modifican la absorción de agua al adicionarse a las mezclas y por lo tanto debe ajustarse el nivel de agua en las formulaciones. También cabe remarcar que estos compuestos son considerados fibra dietaria (Prosky, 1999).

En cuanto a las enzimas utilizadas en panificación se reconocen diferentes tipos: proteasas, utilizadas para degradar parcialmente el gluten y reducir la tenacidad de las masas, aumentando su extensibilidad y dando lugar a panes de mayor volumen (Lyons, 1982); lipasas, que hidrolizan triglicéridos para generar mono y diglicéridos y ácidos grasos libres, son utilizadas para mejorar la estabilidad de la masa y mejoran el volumen, la textura y la vida útil del pan (Moayedallaie, Mirzaei, & Paterson, 2010); α -amilasas, utilizadas para reducir los tamaños de las cadenas de amilosa y amilopeptina y generar moléculas más pequeñas denominadas dextrinas, generando un aumento en los sustratos para el accionar de las levaduras y a la vez reduciendo la retrogradación (Cauvain & Young, 2001); transglutaminasas, que generan un aumento en el entrecruzamiento de la red de gluten y por lo tanto un refuerzo de la misma, dando mayor tenacidad a la masa (útil en masas débiles) (Caballero, Gómez, & Rosell, 2007).

enzima. La misma autora indico que la enzima condujo a masas con valores mayores de resistencia a la deformación y con menores valores de extensibilidad, adjudicando dichas observaciones al refuerzo de la estructura generada por la enzima.

Teniendo en cuenta la acción de la enzima transglutaminasa, esta ha sido foco de estudio en busca de la recuperación de la calidad panadera en panificados a base de mezcla de harina de trigo con otras harinas ricas en proteínas o fibra (Basman et al., 2003; Roccia, Ribotta, Ferrero, Pérez, & León, 2012; Schoenlechner, Szatmari, Bagdi, & Tömösközi, 2013) con diversos resultados.

Por lo antes expuesto, la enzima transglutaminasa es uno de los aditivos a tener en cuenta para la panificación con harina de algarroba, presumiendo los posibles inconvenientes que puede producir la incorporación de esta última sobre las propiedades de la masa panaria, debido fundamentalmente a un desarrollo no adecuado de la red de gluten (por dilución de las proteínas y posibles interferencias que puedan generar los componentes de la harina de algarroba) y que como resultado provoque la obtención de panes de menor calidad.

1.3.3. Panificación con mezcla de harinas

Existe una gran diversidad de panificados con mezcla de harinas de trigo y harinas provenientes de otros cereales, legumbres u otros vegetales. Además de los provenientes de la incorporación de legumbres mencionados previamente, hay panificados con incorporación de harinas de mandioca, sorgo, amaranto, plátano, arroz, cebada, entre otras fuentes (Ayo, 2001; Carson, Setser, & Sun, 2000; Chung-Hee & Sun-Young, 2005; Eddy, Udofia, & Eyo, 2007; Mepba, Eboh, & Nwaojigwa, 2007; Noomhorm, Bandola, & Kongserree, 1994) .

Como se mencionó en la sección 1.2, las harinas de leguminosas pueden proporcionar beneficios tanto nutricionales como funcionales cuando se añaden a una formulación de pan. Desde un punto de vista nutricional, además de incrementar (por lo general) el contenido proteico del producto, las proteínas de leguminosas tienen un perfil de aminoácidos complementario con el de los cereales y al combinarse en una masa compuesta se obtiene una mezcla de proteínas con alto valor nutricional (Fenn, Lukow, Humphreys, Fields, & Boye, 2010); la funcionalidad de estas harinas esta principalmente asociada a su perfil lipídico saludable y a su contenido de fibra dietaria.

La mejora nutricional conlleva al mismo tiempo el problema de la pérdida de calidad panadera en el producto final, asociado mayormente a una “dilución” de las proteínas del gluten. Los principales problemas informados se refieren a los cambios en la reología de las masas obtenidas. El reemplazo parcial de harina de trigo por harinas de leguminosas en las masas produce pérdidas en la elasticidad, cohesividad y extensibilidad de las mismas, lo que genera menor capacidad de retención de gas y de expansión de las piezas durante el leudado (Ribotta, Arnulphi, León, & Añón, 2005; Rocca, Ribotta, Pérez, & León, 2009). Esto conduce a productos con menor volumen específico y migas más densas y menos tiernas (Fenn et al., 2010; Hefnawy et al., 2012). En cuanto a los panificados con agregado de fibra o de harinas con alto contenido de fibra, cabe mencionar que aunque su incremento es algo deseable a nivel funcional, la misma cambia las propiedades de las masas y por lo tanto las características del producto final. En general, la fibra aumenta la absorción de agua de la masa, siendo el tamaño de las partículas de la fibra un factor importante (Katina, 2003), es por eso que las cantidades de agua deben ser ajustadas adecuadamente. Además se pueden generar reducciones de la estabilidad y extensibilidad de las masas y cambios en la tenacidad. La adhesividad suele también volverse excesiva y complicar la manipulación de las masas, hecho que debe tenerse en cuenta fundamentalmente cuando se trata de panificaciones a gran escala, con procesos altamente mecanizados (Armero, 1999). A pesar de los problemas tecnológicos mencionados la incorporación de fibra en productos de panadería se ha logrado con bastante éxito en los últimos años. Muchas fibras de origen diferente (de lino, de avena, celulosas, de cebada, almidón resistente, entre otras) se han logrado incorporar en productos de panadería tales como panes, pasteles, galletas, magdalenas, panecillos, pizzas, tortillas, crepes, donas y otros adecuando parámetros de proceso, formulaciones o con incorporación de aditivos mejoradores (Gelroth & Ranhotra, 2001).

HIPÓTESIS

La harina de algarroba puede ser un ingrediente en panificación que dé lugar a productos más saludables que el pan de trigo, aprovechando su contenido de fibra dietaria y minerales y la complementación de sus proteínas con las del trigo.

El reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba (que no posee proteínas formadoras de gluten) en la formulación genera pérdida de la calidad panadera en el producto, relacionada con cambios a nivel de microestructura, particularmente de la red de gluten.

Controlando las variables de proceso, las proporciones de los ingredientes y la adición de aditivos mejoradores (enzimas, emulsionantes, oxidantes) se pueden obtener productos panificados de buena calidad a partir de mezclas de ambas harinas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características fisicoquímicas y funcionales de mezclas de harina de algarroba (*Prosopis spp*) y de harina de trigo para la obtención de productos panificados más saludables y la calidad de dichos productos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar las harinas y estudiar el comportamiento reológico y la microestructura de las masas compuestas trigo-algarroba. Estudiar las propiedades térmicas de las masas.

Establecer las condiciones de proceso óptimas para la panificación con diferentes cantidades de harina de algarroba.

Evaluar el efecto de la harina de algarroba y de los aditivos (SSL y ácido ascórbico) sobre la calidad panadera y nutricional de los productos obtenidos y la aceptabilidad sensorial de los mismos.

Evaluar el efecto de la enzima transglutaminasa en las propiedades reológicas y microestructurales de las masas compuestas y en la calidad panadera de los productos obtenidos.

Estudiar el envejecimiento de los panes y su relación con el contenido de harina de algarroba.

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Harina de trigo

La harina de trigo empleada en esta tesis fue tipificada como tipo 000 (Código Alimentario Argentino). La misma fue provista por Molino Campodónico Ltda. (La Plata, Argentina). Esta harina de trigo fue enriquecida según Ley 25.630 (Decreto Reglamentario Nº 597/2003 sobre *Prevención de las anemias y malformaciones del tubo neural* sancionada el 31/07/2002 y promulgada el 22/08/2002); adicionándole sulfato ferroso, niacina, ácido fólico y vitaminas B₁ y B₂.

Los parámetros alveográficos de la harina empleada proporcionados por el Molino, fueron: P = 102 mm de H₂O, L = 124 mm, W = 384*10⁻⁴ J.

Durante el período del trabajo de tesis, la harina fue fraccionada en recipientes plásticos con cierre hermético (5 kg) y conservada en cámara a -18 °C.

2.1.2. Harina de algarroba

La harina de algarroba (*Prosopis alba*) BAGUALA fue suministrada por productores locales de Santiago del Estero (Argentina) y almacenada en las mismas condiciones que la harina de trigo. La composición informada por el proveedor fue la siguiente: proteínas 13,88%; materia grasa 3,78%; carbohidratos 73,79%; azúcares totales 34,98%; azúcares reductores 4,73%; almidón 1,91%; fibra bruta 13,25%; fósforo 127,78 mg/100 g; calcio 170,16 mg/100 g; hierro 160,1 mg/1000 g; magnesio 63,16 mg/100 g; potasio 821,13 mg/100 g.

2.1.3. Cloruro de sodio

Se empleó sal de mesa marca CELUSAL, FINA corrediza (Argentina).

2.1.4. Levadura

La levadura utilizada tanto para la optimización de los tiempos de fermentación como para la elaboración de los panes fue levadura fresca prensada marca CALSA S.A (Argentina).

2.1.5. Margarina

Para la preparación de masas y panes se utilizó margarina marca Dánica, Flora Dánica

SA (Argentina). La composición informada por el fabricante fue: materia grasa total 59%; hidratos de carbono 0,1%; azúcares totales menor a 0,1%; sodio 0,2%.

2.1.6. Estearoil lactilato de sodio (SSL)

El emulsificante fue provisto por la empresa Alpha CISA (Argentina) quienes informaron en la ficha de calidad del producto que todas sus características fisicoquímicas y organolépticas estuvieron dentro de los límites establecidos por la norma (Código Alimentario Argentino, Capítulo XVIII Aditivos Alimentarios, Art. 1398, Res. 334): color marfil claro a mediano; olor característico; valor de acidez 60-80 mg K(OH)/g; valor de esterificación 150-190 mg de K(OH)/g; contenido de láctico 31-34%; sodio 3,5-5%; metales pesados máximo 10 ppm.

2.1.7. Ácido ascórbico

Se adquirió vitamina C de grado farmacológico en droguería del mercado local.

2.1.8. Enzima Transglutaminasa

La enzima transglutaminasa (80-140 u/g), Probind TX, fue provista por la empresa BDF Ingredients (Girona, España).

2.2. Métodos

2.2.1. Composición de las harinas

Se determinaron el contenido de humedad, proteínas, lípidos, fibra dietaria total, cenizas de ambas harinas según los métodos que se describen a continuación. El contenido de hidratos de carbono se calculó por diferencia.

2.2.1.1. Humedad

La determinación de humedad se realizó por gravimetría, a través del método indirecto, que se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Se realizó según método AACC 44-19 (2000), en el cual la muestra ($3 \pm 0,001$ g) se seca en estufa durante dos horas a 135 °C. Se utilizó una estufa San Jor (Argentina). El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso medido antes y después del calentamiento de la muestra. El ensayo se realizó por triplicado.

El porcentaje de agua se calculó de acuerdo a la ecuación 2.1.

$$\text{Humedad \%} = \left(\frac{m - m_s}{m} \right) * 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde:

m = masa de muestra (antes del secado)

ms = masa de muestra después del secado

2.2.1.2. Cenizas

Se determinó el contenido de cenizas empleando el método directo según AACC 08-01 (2000) basado en la oxidación completa de la materia orgánica, quedando las cenizas como residuo. Se pesaron ($3 \pm 0,0001$ g) de harina en una cápsula de porcelana previamente calcinada y pesada. La muestra se carbonizó con mechero en triangulo de pipa y luego se calino a 550 °C en una mufla INDEF Mod. 331 (Hornos Eléctricos S.A., Argentina) hasta obtención de residuo blanquecino y peso constante. La determinación se realizó por triplicado.

El contenido de cenizas se calculó de acuerdo a la ecuación 2.2:

$$\text{Cenizas \%} = (m_a - m_b) * \left(\frac{100}{m} \right) \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde:

m_a = masa de cápsula + muestra calcinada

m_b = masa de cápsula vacía

m = masa de muestra

2.2.1.3. Proteínas

La determinación del contenido de proteínas se realizó por el método de Kjeldahl de acuerdo al método AOAC 920-152. En este método se determina el contenido de nitrógeno total. La digestión de la materia orgánica se realiza con H₂SO₄ concentrado, en presencia de la mezcla catalizadora K₂SO₄ anhidro y Cu₂SO₄.5H₂O en relación 10:1 en un digestor (BÜCHI K-435, Suiza). Una vez finalizada esta etapa se procede a la liberación

del amonio formado como amoniaco, empleando NaOH 32% p/v en un equipo semiautomático (BÜCHI K-350, Suiza), que se destila sobre 50 ml de H₃BO₃ 4% p/v en presencia de indicador de Mortimer. Se valoró directamente el borato de amonio formado utilizando HCl 0,1032 N. Se realizó un blanco para evaluar la posible presencia de compuestos nitrogenados en los reactivos empleados.

El porcentaje de nitrógeno se calculó empleando la ecuación 2.3:

$$Proteína \% = (V_{HCL} - Vb) * Na * 0.014 * F * \left(\frac{100}{m}\right) \quad Ec. 2.3$$

donde:

V= volumen de HCL gastado para titular la muestra (ml)

Vb= volumen de HCL gastado para titular el blanco (ml)

Na= normalidad del HCL usado para titular

0,014= peso del miliequivalente de N en g

F= factor de conversión de nitrógeno a proteína (en este caso se utilizó 6,25)

m = masa de muestra pesada (g)

2.2.1.4. Lípidos

La determinación de lípidos se realizó por extracción semi-continua empleando una mezcla de solventes orgánicos para su extracción utilizando una modificación de la técnica AACC 30-25.01 (2000) en la cual se emplea el extractor de Soxhlet. Los lípidos de la harina fueron extraídos con éter de petróleo (fracción 30-60°) llevándose a cabo unas siete sifonadas para lograr una extracción completa. Una vez finalizada se evaporó el solvente y se pesó el residuo (extracto etéreo). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

El porcentaje de lípidos se calculó empleando la ecuación 2.4:

$$Lípidos \% = \frac{(m1 - m0) * 100}{m} \quad Ec. 2.4$$

donde:

m1= masa del balón con extracto etéreo luego de evaporado el solvente (g)

m_0 = masa del balón vacío (g)

m = masa de la muestra (g)

2.2.1.5. Fibra dietaria total

Se determinó el contenido de fibra dietaria total (FDT) de las harinas según AACC 32-05 (2000), utilizando el método enzimogravimétrico. A la muestra ($1 \pm 0,001$ g) de harina se le adicionó buffer fosfato pH = 6, luego fue tratada con α -amilasa termoestable a 100 °C y digerida por vía enzimática con proteasa y amiloglucosidasa para eliminar las proteínas y el resto de almidón. Posteriormente, se precipitó la fibra dietaria (FD) por adición de etanol 95% v/v y se reposó durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo la FD fue filtrada y lavada en pasos sucesivos con etanol 78%, etanol 95% y acetona pura, posteriormente fue secada (105 °C) y pesada. A uno de los residuos de FD se le determinó el contenido de cenizas incinerando la muestra a 550 °C, y al otro se le determinó contenido de proteínas por el método de Kjeldahl.

La FDT (ecuación 2.8) se determinó como el peso de la fibra dietaria filtrada al que se le descontó el contenido de proteínas (ecuación 2.6) y cenizas (ecuación 2.7):

$$FD \% = (M_1 - M_0) * \frac{100}{m} \quad \text{Ec. 2.5}$$

$$P \% = V_{HCL} * N_{HCL} * P_{meq} * F * \frac{100}{M_1 - M_0} \quad \text{Ec. 2.6}$$

$$C \% = \frac{(M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} * 100 \quad \text{Ec. 2.7}$$

$$FDT \% = FD\% - (P\% + C\%) \quad \text{Ec. 2.8}$$

donde:

M_1 = masa del filtro con celite junto con el residuo de fibra dietaria (g)

M_0 = masa del filtro con celite (g)

m = masa de muestra (harina) (g)

M_2 = masa del filtro con celite junto a las cenizas (g)

V_{HCL} = volumen de HCl gastados en la titulación de la muestra (ml)

N_{HCl} = normalidad del HCl

P_{meq} = peso miliequivalente del nitrógeno (g/meq)

F = factor de conversión de Kjeldahl (6,25)

P % = % de proteínas en el residuo

C % = % de cenizas en el residuo

2.2.2. Masas Panarias

2.2.2.1. Caracterización reológica de las masas

2.2.2.1.1. Diseño experimental

Para la caracterización reológica de masas se utilizaron dos diseños experimentales, dependiendo del ensayo:

- *Diseño central compuesto de 2 factores*, con su posterior análisis por metodología de superficies de respuesta (RSM) que permitió obtener ecuaciones de segundo orden (ecuación 2.9) para los parámetros medidos en función de los factores X_1 (g de harina de algarroba/100 g de harina de trigo) y X_2 (g de agua/100 g de harina de trigo). El diseño central compuesto se muestra en la Tabla 2.1 para sus valores codificados y decodificados. Los valores de harina de algarroba variaron entre 0 y 70 g (cada 100 g de harina de trigo) y los de agua entre 50 y 80 (cada 100 g de harina de trigo). En todos los casos se utilizó 2% de NaCl y 4% de margarina (en base 100 g de mezcla de harinas).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{22} X_2^2 \quad \text{Ec. 2.9}$$

donde:

Y= respuesta de la masa

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$ son los coeficientes de regresión

- *Diseño de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba*, con niveles de reemplazo de harina de 15, 25 y 35%. A su vez en los ensayos reológicos realizados por Análisis Mecánico Dinámico (DMA) y Análisis de Perfil de Textura (TPA) (secciones 2.2.2.1.3.2 y 2.2.2.1.4.2) se estudió la incorporación de enzima transglutaminasa en dos niveles (0,1 y 0,01% base harina). El agua agregada corresponde a la absorción farinográfica. El diseño se resume en la Tabla 2.2.

Tabla 2.1. Diseño central compuesto utilizado en el estudio de masas compuestas.

Formulación	Cantidad de algarroba (X ₁)		Cantidad de agua (X ₂)	
	codificado	decodificado (g)	codificado	Decodificado (g)
1	-1	10,25	-1	54,39
2	-1	10,25	1	75,61
3	1	59,75	-1	54,39
4	1	59,75	1	75,61
5	-1,41421	0	0	65
6	1,41421	70	0	65
7	0	35	-1,41421	50
8	0	35	1,41421	80
9	0	35	0	65
10	0	35	0	65
11	0	35	0	65

Tabla 2.2. Diseño de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba y aplicación de enzima transglutaminasa.

	Nivel de reemplazo de harina (%p/p)			
	-	15%	25%	35%
Harina de trigo (g)	100	85	75	65
Harina de algarroba (g)	-	15	25	35
Agua (g)	59,1	56,3	54,1	52,4
Margarina (g)	4	4	4	4
NaCl (g)	2	2	2	2
Transglutaminasa (g)	0,1 – 0,01	0,1 – 0,01	0,1 – 0,01	0,1 – 0,01

En la Figura 2.1 se pueden observar los puntos evaluados con el Diseño Central Compuesto (puntos azules) y con el diseño monofactorial de reemplazo de HT por HA (puntos rojos).

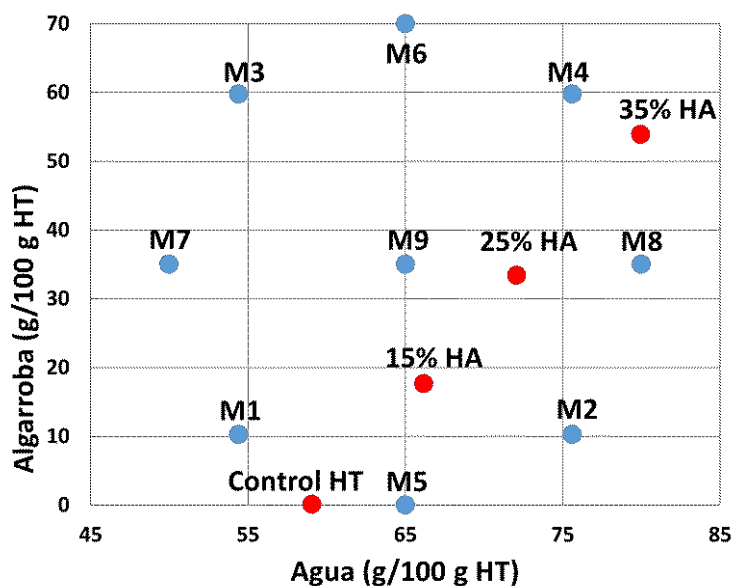


Figura 2.1. Formulaciones de las masas evaluadas según los diseños DCC y monofactorial.

2.2.2.1.2. Ensayos farinográficos

Se realizaron para la harina de trigo y para las mezclas con reemplazo parcial de harina de trigo por harina de algarroba, con agregado de cloruro de sodio 2 g cada 100 g de harina total.

Los ensayos fueron llevados a cabo en un farinógrafo de Brabender (Brabender, Duigsburg, Alemania) con amasadora de 300 g de acuerdo al método IRAM 15885:2000. Este equipo mide la fuerza realizada por las paletas durante el mezclado a velocidad constante y la absorción de agua necesaria para alcanzar la consistencia deseada.

A partir de los farinogramas se calcularon los siguientes parámetros:

- 1- Absorción de agua (volumen de agua para obtener una masa con consistencia máxima de 500 UF)
- 2- Tiempo de desarrollo (tiempo para alcanzar la máxima consistencia)
- 3- Estabilidad (tiempo que transcurre desde que la parte superior de la curva supera los 500 UF hasta que cae por debajo de los 500 UF)
- 4- Aflojamiento (diferencia de consistencia entre el punto de máxima consistencia y el punto alcanzado 12 minutos después)

2.2.2.1.3. Ensayos de textura

Se empleó un texturómetro TA.XT2i, Stable Micro System (Surrey, Reino Unido) utilizando el programa Texture Expert (v.1.2) para estudiar el comportamiento reológico de las masas, aplicando grandes deformaciones. Se utilizaron dos tipos de ensayo: análisis de perfil de textura (TPA) y ensayos de relajación de esfuerzo (creep recovery, en inglés).

Los ensayos de TPA se realizaron sobre las masas correspondientes a los dos diseños descritos en la sección 2.2.2.1.1, mientras que las medidas de relajación de esfuerzo sobre las masas formuladas según el diseño central compuesto.

2.2.2.1.3.1. Preparación de las masas para los ensayos

Para cada formulación, correspondiente a un punto del diseño central compuesto, primero se mezclaron los ingredientes sólidos y la margarina fundida durante un minuto en una amasadora planetaria Kenwood Major (Kenwood, Italia), luego se agregó el agua correspondiente a ese punto y se amasó durante 23 minutos. El primer minuto se amasó a 50 rpm y el resto del tiempo a 90 rpm hasta completar el tiempo antes mencionado. La masa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos cubierta con film para evitar pérdidas de humedad superficial. Luego se laminó hasta un espesor de 1 cm de forma manual utilizando espesores de dicha altura y un cilindro de acrílico. Una vez laminada, se la dejó reposar otros 10 minutos.

Para las masas correspondientes al diseño de reemplazo con harina de algarroba, la cantidad de agua utilizada y el tiempo de amasado fueron la absorción de agua y el tiempo de desarrollo calculados a partir de los farinogramas (sección 2.2.2.1.2).

2.2.2.1.3.2. Análisis de perfil de textura

Se cortaron discos de masa de 3 cm de diámetro y 1 cm de espesor con un sacabocado. A cada disco de masa se lo sometió a un ciclo de doble compresión empleando una deformación del 40% de la altura original con una sonda de aluminio SMSP/75 (de 7,5 cm de diámetro) y una celda de 25 kg. Se esperó 5 s entre ambos ciclos. La velocidad del ensayo fue de 0,5 mm/s. Se ensayaron 20 discos por cada formulación. Se registró la fuerza (expresada en Newtons) en función del tiempo (expresado en segundos) obteniéndose un gráfico como el de la Figura 2.2, del cual se obtuvieron los parámetros

descriptos a continuación (Steffe, 1996).

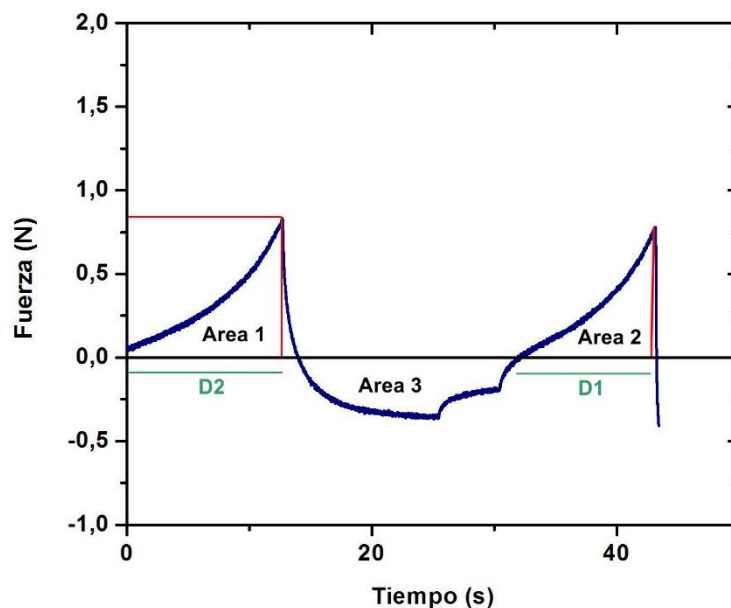


Figura 2.2. Curva típica obtenida por TPA para una masa panaria típica del presente trabajo.

Dureza: fuerza máxima del primer ciclo de compresión. Se expresa en unidades de fuerza (N).

Consistencia: suma de las áreas positivas del primer (Área 1) y segundo (Área 2) pico. Posee unidades de N*s.

Cohesividad: cociente entre el área de la segunda compresión (Área 2) y el área de la primera compresión (Área 1). Es un parámetro adimensional.

Adhesividad: área del pico negativo después del primer ciclo de compresión (Área 3), representa el trabajo necesario para despegar el émbolo de la superficie del alimento. Se mide en N*s.

Elasticidad: altura que recupera el alimento durante el tiempo transcurrido entre el primer ciclo y el segundo y es la relación entre las distancias D1 y D2 ($D1/D2$). Es un parámetro adimensional.

Resiliencia: cociente del área entre el máximo y el final del primer pico respecto al área entre el inicio y el máximo del mismo pico. Es un parámetro adimensional.

Gomosidad: producto de la dureza por la cohesividad. Se expresa en N. (Este parámetro se midió solo para las migas de los panes, como se describe en 2.2.3.2.2.5).

Masticabilidad: producto de la gomosidad por la elasticidad. Se expresa en N. (Al igual que la gomosidad, solo se midió en la miga de los panes).

2.2.2.1.3.3. Ensayos de relajación

Fundamento

El ensayo de relajación consiste en deformar el material aplicando una compresión a deformación constante (Figura 2.3.A) y registrándose la fuerza que opone el material para mantener dicha deformación en función del tiempo.

Cuando el ensayo de relajación se aplica sobre diversos materiales, se observan diferentes comportamientos (Figura 2.3.B): si el material es sólido (elástico ideal) no experimenta relajación (Figura 2.3.B.curva a). Si el material posee comportamiento viscoso ideal (liquido), se relaja instantáneamente (Figura 2.3.B. curva d). Los materiales viscoelásticos poseen un comportamiento intermedio entre ambos, se relajan en forma gradual y el valor de esfuerzo final (σ_e) dependerá de qué tipo de comportamiento predomine. Si predomina el comportamiento sólido sobre el líquido se alcanzará un valor de equilibrio positivo (Figura 2.3.B. curva b); en el caso que predomine el comportamiento fluido sobre el sólido el esfuerzo final será cero (Figura 2.3.B. curva c) (Steffe, 1996).

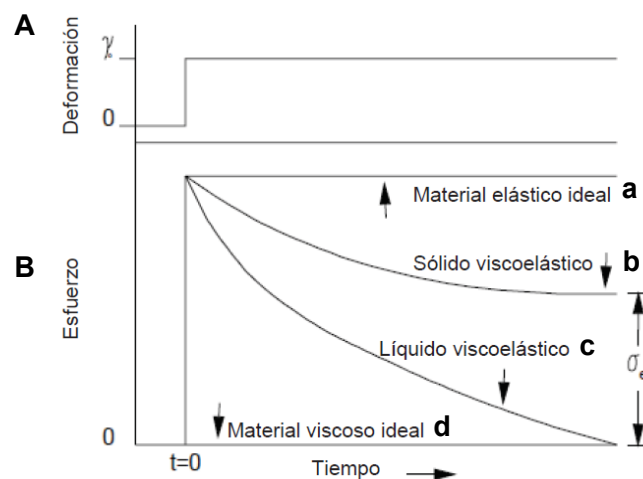


Figura 2.3. A) Deformación en función del tiempo. **B)** Curvas de relajación de diferentes materiales. γ_0 : deformación aplicada. σ_e : valor de esfuerzo alcanzado en el equilibrio (Adaptado de Steffe, 1996).

El comportamiento viscoelástico de los materiales se puede representar mediante diferentes modelos. El comportamiento de fluido ideal obedece a la Ley de Newton (ecuación 2.10), y se representa mediante un pistón trabajando dentro de un cilindro, mientras que el del sólido ideal está representado por un resorte y obedece a la Ley de Hooke (ecuación 2.11). El pistón simboliza la disipación de energía en forma de calor mientras que el resorte representa la energía almacenada en el material.

$$\sigma = \eta * \dot{\gamma} \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde:

σ : esfuerzo de corte (Pa)

η : Coeficiente de viscosidad dinámica (Pa*s)

$\dot{\gamma}$: gradiente de velocidad o velocidad de deformación (s^{-1})

$$\sigma = E * \gamma \quad \text{Ec. 2.11}$$

donde:

σ : esfuerzo (Pa)

E: modulo elástico cuando la tensión es uniaxial (Pa)

γ : deformación relativa (-)

Se considera que el material viscoelástico internamente trabaja con diferente combinación de resortes y pistones. Los modelos más sencillos son dos, el modelo de Maxwell con el resorte y el pistón en serie (Figura 2.4.a) y el modelo de Kelvin-Voigt con el resorte y el pistón conectados en paralelo (Figura 2.4.b).

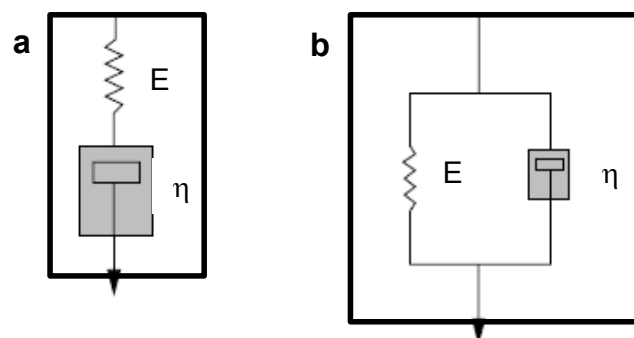


Figura 2.4. a) Modelo de Maxwell. b) Modelo de Kelvin-Voigt.

El modelo de Maxwell es el que frecuentemente se ha utilizado para interpretar los datos de las curvas obtenidas en los ensayos de relajación de fluidos viscoelásticos. Como los elementos están en serie, puede suponerse que la deformación total del material es igual a la suma de las dos deformaciones (ecuación 2.12):

$$\gamma = \gamma_{resorte} + \gamma_{pistón} \quad \text{Ec. 2.12}$$

Diferenciando la Ec. 2.12 respecto del tiempo y usando las definiciones provenientes de las ecuaciones 2.10 y 2.11 puede obtenerse la ecuación general del modelo de Maxwell (Ec. 2.13):

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{1}{E} * \left(\frac{d\sigma}{dt} \right) + \frac{\sigma}{\eta} \quad \text{Ec. 2.13}$$

Reordenando la ecuación 2.13 obtenemos la siguiente expresión:

$$\eta * \dot{\gamma} = \sigma + \left(\frac{\eta}{E} \right) * \left(\frac{d\sigma}{dt} \right) = \sigma + T_{rel} * \left(\frac{d\sigma}{dt} \right) \quad \text{Ec. 2.14}$$

donde:

T_{rel} es el tiempo de relajación definido como la relación entre el componente viscoso y el componente elástico (η/E).

Como el ensayo de relajación consiste en aplicar una deformación constante en el tiempo, $\dot{\gamma}_0$, entonces $\dot{\gamma} = d\gamma/dt = 0$, la ecuación anterior queda de la siguiente forma:

$$0 = \sigma + T_{rel} * \left(\frac{d\sigma}{dt} \right) \quad \text{Ec. 2.15}$$

Integrando la ecuación respecto del tiempo, obtenemos:

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{\left(\frac{-t}{T_{rel}} \right)} \quad \text{Ec. 2.16}$$

donde σ_0 es el esfuerzo al inicio de la deformación, el cual decae exponencialmente en función del tiempo.

El modelo de Maxwell no considera el esfuerzo en el equilibrio. Por esta razón, el comportamiento viscoelástico en los alimentos puede ser mejor descrito empleando el modelo generalizado de Maxwell (Hassan, Alhamedan, & Elansari, 2005; Lima, & Singh, 2001), que consiste en varios elementos de Maxwell y un resorte, conectados en paralelo. El resorte contempla el término del esfuerzo en el equilibrio. El modelo que mejor ajusta en las masas contiene dos elementos de Maxwell asociado a un resorte (Figura 2.5).

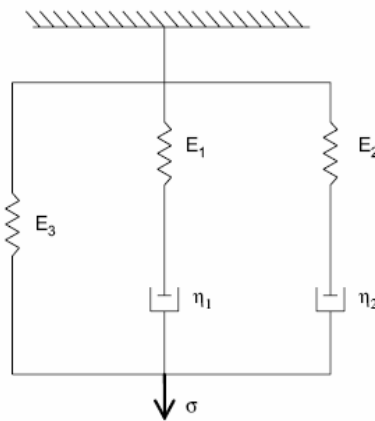


Figura 2.5. Modelo de Maxwell generalizado aplicado a las masas.

La ecuación obtenida del modelo de Maxwell generalizado es la siguiente:

$$\sigma(t) = \sigma_1 e^{-t/T_1} + \sigma_2 e^{-t/T_2} + \sigma_E \quad \text{Ec. 2.17}$$

donde $\sigma(t)$ representa el esfuerzo medido durante el ensayo de relajación, t representa el tiempo.

El tiempo de relajación (T_i) está definido como la relación entre la viscosidad y el módulo elástico ($T_i = \eta_i / E_i$).

El módulo elástico (E_i) es definido como la relación entre el esfuerzo y la constante de deformación ($E_i = \sigma_i / \epsilon_0$). Donde ϵ_0 es el cociente de la deformación respecto a la altura inicial de la muestra.

Protocolo experimental de los ensayos de relajación

Los discos de masa se sometieron a una compresión de 40% a 0,5 mm/s durante 20 minutos empleando el texturómetro. El ensayo se realizó a 25 °C. Se registró la fuerza en función del tiempo. Para evitar deshidratación de las muestras durante el ensayo, los bordes fueron cubiertos con vaselina. El ensayo se realizó por triplicado para cada formulación. Se ajustó la curva de esfuerzo en función del tiempo utilizando el modelo de Maxwell generalizado (Ec. 2.17) con el programa OriginPro 8.0 (Origin Lab Corporation, MA, Estados Unidos) considerando dos elementos de Maxwell la ecuación 2.17 quedaría según la ecuación 2.18 de la siguiente forma:

$$\sigma(t) = \sigma_1 e^{-t/T_1} + \sigma_2 e^{-t/T_2} + \sigma_E \quad \text{Ec. 2.18}$$

donde:

σ_i = factores pre-exponenciales (equivalentes a σ_1 y σ_2 de la ecuación 2.17).

T_i = son los tiempos de relajación, definidos como la relación entre el componente viscoso y elástico (η_i/E_i).

σ_E = representa el esfuerzo del equilibrio.

2.2.2.1.4. Ensayos dinámicos

Fundamento

Los ensayos reológicos dinámicos son ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento viscoelástico en los alimentos. Los resultados obtenidos a partir de ellos son muy sensibles a la composición química y estructura física del material estudiado (Steffe, 1996) por lo que constituyen una herramienta para el estudio estructural de los sistemas.

La muestra se coloca entre un sistema de platos paralelos rugosos a temperatura controlada, donde el plato inferior se encuentra fijo y el superior oscila radialmente a una frecuencia fija (ω) entonces la deformación oscilatoria del material en función del tiempo está dada por la ecuación 2.19:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad \text{Ec. 2.19}$$

donde:

γ = deformación del material (-)

γ_0 = amplitud de deformación (-)

ω = velocidad angular (rad/s o Hertz (Hz))

t = tiempo (s)

El gradiente de deformación periódico se puede evaluar derivando la ecuación 2.19:

$$\frac{\delta\gamma}{\delta t} = \gamma_0 * \omega * \cos(\omega t) \quad \text{Ec. 2.20}$$

Si la amplitud de deformación que se aplica es pequeña, de forma que nos encontramos en el rango de viscoelasticidad lineal, el esfuerzo producido está dado por la ecuación 2.21:

$$\sigma = \sigma_0 * \text{sen}(\omega t + \delta) \quad \text{Ec. 2.21}$$

donde:

σ = esfuerzo (kPa)

σ_0 = amplitud del esfuerzo (kPa)

δ = ángulo de desfase que separa al esfuerzo de la deformación (°)

t = tiempo (s)

Para un material perfectamente elástico, la onda de deformación se encontrará en fase con el esfuerzo (σ) aplicado. Por lo tanto para un sólido ideal el ángulo de desfase (δ) entre el esfuerzo aplicado y la deformación será de 0 °. Si en cambio se realiza para un material viscoso ideal, la onda que representa la deformación oscilatoria se encuentra exactamente fuera de fase ($\delta = 90$ °) con respecto a la correspondiente al esfuerzo (Steffe, 1996).

Los materiales viscoelásticos presentan un comportamiento intermedio entre el correspondiente al viscoso ideal y al elástico ideal, por lo tanto las funciones trigonométricas que representan la deformación y el esfuerzo presentan ángulos de

desfasaje entre 0 y 90° (Figura 2.6).

La ecuación 2.21 también puede escribirse como:

$$\sigma = G' \gamma + \frac{G''}{\omega} \quad \text{Ec. 2.22}$$

$$G' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cos \delta \quad \text{Ec. 2.23}$$

$$G'' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \text{sen } \delta \quad \text{Ec. 2.24}$$

donde:

G' = módulo de almacenamiento o módulo dinámico elástico (Ec. 2.23) relacionado con la respuesta del material como un sólido. Se expresa en pascales (Pa).

G'' = módulo de pérdida o módulo dinámico viscoso (Ec. 2.24) relacionado con la respuesta del material como un fluido. Se expresa en Pa.

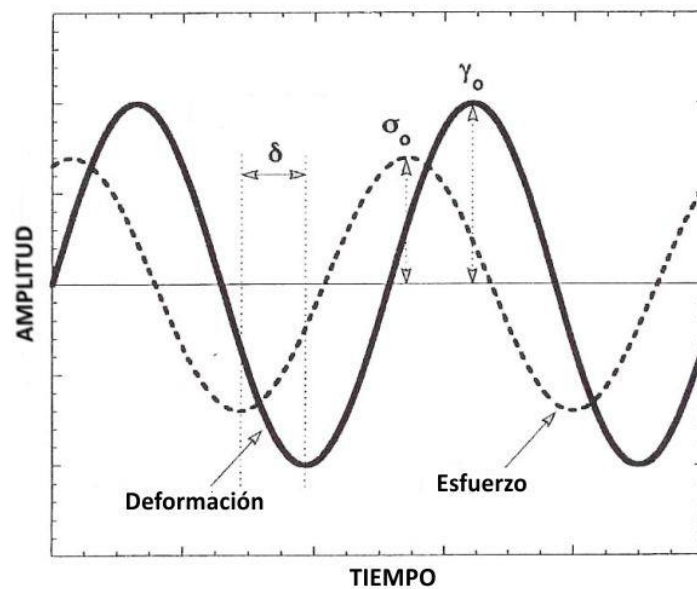


Figura 2.6. Desfasaje entre esfuerzo sinusoidal aplicado y deformación de un material viscoelástico.

Otras funciones que describen el comportamiento viscoelástico de la muestra y su dependencia con la frecuencia son el módulo complejo (G^*) (Ec. 2.25) y la tangente del

ángulo de desfasaje (Ec. 2.26).

$$G^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} = [(G')^2 + (G'')^2]^{1/2} \quad \text{Ec. 2.25}$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ec. 2.26}$$

La $\tan \delta$ se vincula con la relación entre la energía perdida por la muestra por ciclo respecto a la energía almacenada por ciclo (Steffe, 1996).

La Figura 2.7 se muestran los espectros mecánicos típicos para una solución diluida (A), una solución concentrada (B) y un gel.

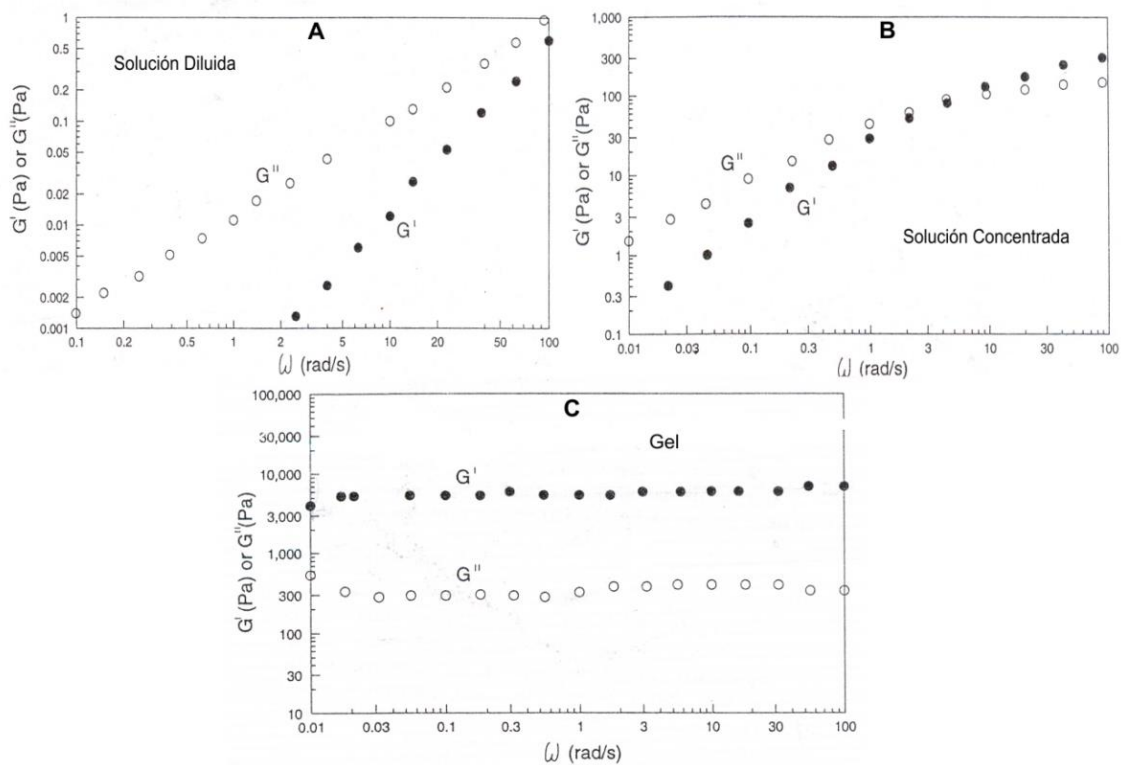


Figura 2.7. Espectros mecánicos típicos para: soluciones diluidas (A) y concentradas (B) y para geles (C). Adaptado de Steffe (1996).

En la Figura 2.8 se muestran espectros mecánicos típicos para masas a base de harina de trigo, aplicando niveles de deformaciones dentro del límite de viscoelasticidad lineal. Puede observarse que el módulo elástico G' se mantiene por encima del módulo viscoso G'' en todo el rango de frecuencias evaluado y que ambos módulos presentan dependencia (incremento) con la frecuencia aplicada.

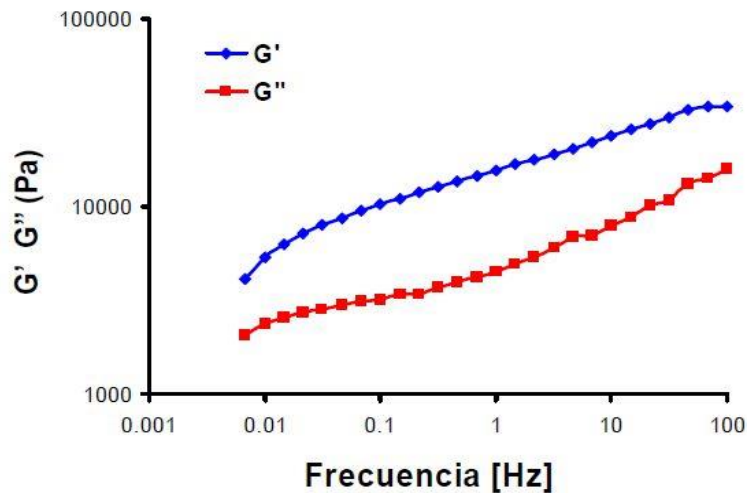


Figura 2.8. Espectro mecánico típico para una masa a base de harina de trigo.

Fuente: Gómez (2011).

2.2.2.1.4.1. Ensayos en reómetro oscilatorio con deformación radial

Protocolo experimental

Sobre las masas preparadas según el diseño central compuesto descrito en el inciso 2.2.2.1.1 y la metodología explicada en 2.2.2.1.3.1 se llevaron a cabo las mediciones en un reómetro de esfuerzo controlado RS600 (Haake, Alemania) utilizando el programa RheoWin data Manager 3.30. Para los diferentes ensayos se utilizó un sensor de platos rugosos paralelos, el plato superior móvil (PP35/S) de 35 mm de diámetro y el plato inferior fijo (D35/S). Se trabajó a temperatura controlada (25 °C). La separación de platos fue de 1,5 mm. Para evitar la deshidratación de la muestra durante los ensayos se cubrieron los bordes con vaselina sólida.

Se realizaron barridos de deformación y de frecuencia sobre las masas.

Barrido de deformación

Se realizó un barrido de deformación a una frecuencia de 1 Hz entre 0,5 y 200 Pa para determinar el máximo de deformación (γ_0) de las muestras en el rango de viscoelasticidad lineal. Se define como rango de viscoelasticidad lineal de un material a aquel en el cual las propiedades del mismo no dependen de la magnitud del esfuerzo aplicado, de la deformación realizada o de la velocidad de aplicación de la deformación. El ensayo se realizó por triplicado. Se registró el módulo complejo G^* en función del esfuerzo y a partir de ellos se determinó que la de deformación límite en el rango de viscoelasticidad lineal fue de aproximadamente 10 Pa para los sistemas estudiados.

Barrido de frecuencia

Se realizó un barrido de frecuencia entre 0,005 Hz y 100 Hz a deformación constante dentro del rango viscoelástico lineal ($\gamma = 5$ Pa), según ensayo anterior. Se obtuvieron el módulo elástico o de almacenamiento (G'), el módulo viscoso o de pérdida (G''), el módulo complejo (G^*) y la tangente del ángulo de desfasaje $\tan \delta = G''/G'$ en función de la frecuencia.

2.2.2.1.4.2. Ensayos de análisis mecánico dinámico (DMA)**Fundamento**

En el análisis mecánico dinámico se aplica una perturbación (deformación) oscilatoria a un material y se mide la respuesta del mismo en función de la temperatura o la frecuencia. En este caso se trata de oscilaciones de compresión, es decir axiales y no radiales.

Las curvas de respuesta pueden mostrar cambios en el módulo elástico o de almacenamiento E' (equivalente a G'), en el módulo de pérdida o viscoso E'' (equivalente a G'') y en la tangente del ángulo de desfasaje, $\tan \delta$.

Las ecuaciones utilizadas para la caracterización de los materiales por DMA son análogas a las ecuaciones 2.23, 2.24 y 2.26:

$$E' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cos \delta \quad \text{Ec. 2.27}$$

$$E'' = \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \text{sen } \delta \quad \text{Ec. 2.28}$$

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad \text{Ec. 2.29}$$

Protocolo experimental

Los ensayos se llevaron a cabo en un reómetro de sólidos RSA III (TA Instruments, Estados Unidos) acoplado a un horno para realizar medidas entre -60 y 150 °C. Para ello se utilizó un sensor de platos paralelos cilíndricos de 15 mm de diámetro.

Esta serie de ensayos se realizaron en las masas correspondientes al diseño de reemplazo parcial con harina de algarroba descrito en la sección 2.2.2.1.1, con y sin agregado de enzima transglutaminasa, según se describió en la Tabla 2.2.

Preparación de las masas

Se utilizó un Mezclador PolyLab QC (Haake ThermoScientific, Alemania), el mezclado/amasado se realizó a una velocidad de 63 rpm controlando la temperatura (aproximadamente 25 °C).

Se registró el torque en función del tiempo de mezclado, obteniéndose las curvas características. A partir de las mismas se obtuvieron los tiempos óptimos de mezclado, que se definieron como los tiempos en que se registran los máximos valores de torque (máxima consistencia de la masa). Luego del mezclado, la masa se dejó relajar durante 10 minutos a temperatura ambiente (cubierta con film plástico para evitar deshidratación) y posteriormente se laminaron manualmente con un espesor de 5 mm. Los mencionados tiempos óptimos se determinaron para las formulaciones sin agregado de enzima y los mismos fueron aplicados para la preparación de las masas con y sin enzima (en sus 2 niveles) correspondientes.

Para realizar las medidas reológicas, se cortaron porciones de masa de aproximadamente 15 mm de diámetro (utilizando espátulas) y se colocaron entre los platos paralelos de la sonda de medida. Luego se comprimió hasta una separación de platos aproximada de 2,5 mm, se retiró el exceso de masa y se cubrieron los bordes con vaselina sólida para evitar deshidratación. Se dejó relajar la masa durante 5 minutos a una temperatura de 25 °C antes de comenzar con los ensayos que se describen a

continuación.

Barrido de deformación

El mismo se realizó a una frecuencia de 1 Hz entre 0,01 y 10% de deformación a temperatura constante (25 °C) y se determinó el máximo de deformación para las muestras en el rango de viscoelasticidad lineal. El ensayo se realizó por duplicado. Se registraron los módulos: elástico (E') y viscoso (E'') y la tangente del ángulo de desfasaje ($\tan \delta$).

Barrido de frecuencia

Las medidas fueron llevadas a cabo por triplicado aplicando una deformación de 0,03% entre frecuencias de 0,016 y 16 Hz a una temperatura constante de 25 °C. Se registraron E' , E'' y $\tan \delta$.

Rampas de ascenso-descenso de temperatura

Con el objetivo de estudiar el comportamiento viscoelástico de las masas durante el calentamiento/enfriamiento se realizaron medidas por triplicado registrando E' , E'' y $\tan \delta$ en función del tiempo/temperatura.

Los ensayos se realizaron aplicando una deformación de 0,03% y a una frecuencia de 1 Hz. El rango de temperatura fue de 25 °C a 85 °C con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Una vez alcanzados los 85 °C comenzó la rampa de enfriamiento sin modificación de la deformación y frecuencia aplicadas pero con una velocidad de descenso de temperatura de 10 °C/min, hasta alcanzar los 25 °C.

Al finalizar las rampas calentamiento/enfriamiento se realizaron barridos de deformación (1 Hz de frecuencia y deformación entre 0,01 y 10%) y de frecuencia (deformación de 0,03% entre 0,016 y 16 Hz de frecuencia) sobre las masas "cocidas" registrándose E' , E'' y $\tan \delta$ al igual que en el resto de ensayos.

2.2.2.2. Caracterización fisicoquímica y microestructural de las masas

Se realizaron diferentes ensayos para estudiar la posible interacción entre los componentes de la masa, y poder obtener conclusiones respecto a la estructura de la misma. Se emplearon las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para

estudiar la movilidad molecular, microscopía laser confocal de barrido (CLSM, por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) para visualizar la masa a nivel molecular y calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) para evaluar la gelatinización del almidón.

2.2.2.2.1 Movilidad molecular

Fundamento

A través de la técnica de RMN ^1H , los núcleos son excitados por unos pocos milisegundos y cuando el pulso se detiene, vuelven al estado fundamental emitiendo una señal. Se registra la intensidad de señal del protón (^1H) en función del tiempo obteniéndose un decaimiento exponencial de la señal (curva de relajación).

La señal de eco de espín en $t = 0$ es proporcional al número de núcleos de hidrógeno de cada especie. En el presente trabajo, las curvas de decaimiento se ajustaron utilizando la Ec. 2.30 mediante el programa OriginPro 8 (Estados Unidos).

$$I = A * e^{-\left(\frac{t}{\lambda}\right)} \quad \text{Ec. 2.30}$$

donde:

I = Intensidad de señal.

A = Representa la intensidad de señal de los protones a tiempo cero.

λ = tiempo de relajación spin-spin (λ) de los núcleos de hidrógeno. Se expresa en milésimas de segundo (ms).

t = tiempo (ms).

Protocolo experimental

La movilidad molecular de las masas preparadas según se explicó en 2.2.2.1.3.1 correspondientes al diseño central compuesto descrito en 2.2.2.1.1 se analizó mediante ensayos de relajación utilizando un equipo de baja resolución Brücker Minispec (Brücker, Estados Unidos). Una porción de masa fue introducida en el tubo de vidrio de 1 cm de diámetro, hasta alcanzar los 3 cm de altura y los tubos fueron cerrados para evitar la deshidratación de la muestra. Se midió la intensidad de señal en el tiempo

usando la secuencia de Carr–Purcel–Meiboon–Gill con un tiempo entre pulsos de 200 μ s. El empleo de secuencia de pulsos es necesario cuando se miden tiempos de relajación del orden de los milisegundos. El decaimiento de la Intensidad de señal en el tiempo se modeló con la ecuación exponencial mencionada, obteniéndose los tiempos de relajación spin-spin (λ) de los núcleos de hidrógeno presentes en la masa. Esta medida fue realizada por cuadruplicado a 20 °C.

2.2.2.2.2. Microscopía láser confocal de barrido (CSLM)

Fundamento

La microscopía láser confocal de barrido es una técnica de observación que ofrece múltiples ventajas frente a la microscopía óptica tradicional ya que permite obtener imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal y además permite obtener secciones ópticas de la muestra a partir de las cuales se pueden obtener reconstrucciones tridimensionales de la misma. Esto básicamente se logra a través de 1) la eliminación de la luz fluorescente procedente de los planos fuera de foco, 2) la utilización de un láser como fuente de luz lográndose de este modo que una pequeña región de la muestra sea iluminada con gran intensidad y 3) la presencia de dos diafragmas (pinhole), uno entre la fuente de luz y el objetivo y otro entre el objetivo y el detector. En la Figura 2.9 se muestra un esquema del funcionamiento del microscopio confocal.

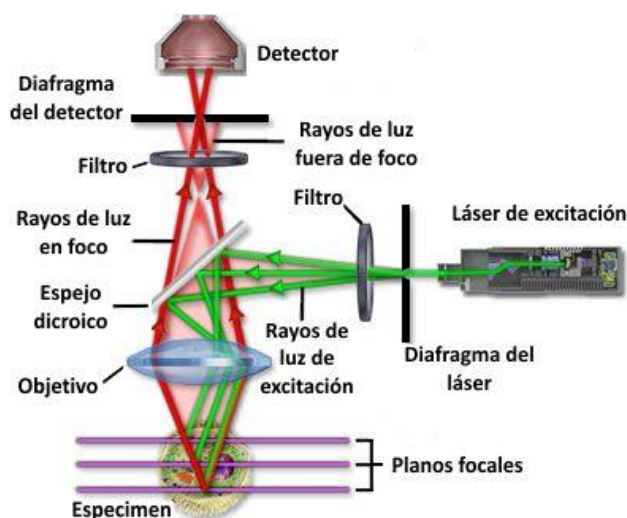


Figura 2.9. Funcionamiento de un microscopio confocal (Imagen obtenida en www.olympusfluoview.com/theory/confocalintro.html; accedido en octubre de 2015).

Preparación de las muestras

Se estudiaron las masas correspondientes a los diseños central compuesto y de reemplazo de harinas (con y sin enzima transglutaminasa) descritos en la sección 2.2.2.1.1.

Se realizó un marcado no covalente con Rodamina B (Biopack) e Isotiocianato de Fluoresceína (Sigma). El contraste obtenido a través de la tinción depende del balance entre la afinidad de los fluoróforos por las fases a ser teñidas. Las soluciones de fluoróforos se realizaron utilizando agua destilada como solvente. Las concentraciones empleadas fueron Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) 0,01% y Rodamina B (Rod B) 0,001%, utilizando agua destilada como solvente.

Las masas correspondientes al diseño central compuesto se prepararon como se describe en el ítem 2.2.2.1.3.1, mientras que las correspondientes al diseño de reemplazo de harina se prepararon según lo descrito en la sección 2.2.2.1.4.2.

Se tomó una porción de masa y se extendió sobre un portaobjetos con la ayuda de una varilla de acrílico, inmediatamente se cubrió con la solución que contenía los fluoróforos. Se dejó una hora en reposo en un recipiente cerrado y en la oscuridad, luego se lavó con agua para eliminar el exceso de fluoróforo y se cubrió con un portaobjetos. Se utilizaron como controles las masas sin fluoróforos y las masas con FITC y Rod B por separado. Las masas se prepararon por duplicado.

Observación microscópica

Se empleó un microscopio confocal invertido LEICA TCS SP5 (Mannheim, Alemania) equipado con láseres de Argón y HeNe para el estudio de las masas correspondientes al diseño central compuesto y un microscopio confocal ZEISS LSM 7 DUO (Alemania) para las masas correspondientes al diseño de reemplazo de harina.

Se utilizaron como longitudes de onda de excitación 488 nm (para FITC) y 568 nm (para Rod B) y como longitudes de onda de emisión 518 nm y 625 nm para FITC y Rod B respectivamente.

Se realizaron observaciones de varios campos con diferentes aumentos (entre 10X y 63X) con la finalidad de buscar las mejores condiciones para el estudio de las masas. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó con el programa provisto por el fabricante de cada microscopio y con el programa Image J 1.43u.

2.2.2.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Fundamento

La microscopía electrónica de barrido basa su funcionamiento en la aplicación de un haz de electrones en lugar de un haz de luz (como es el caso de la microscopía óptica) para incidir la muestra. Los electrones son acelerados por un cañón de electrones mediante la aplicación de una diferencia de potencial que va de 1 KV a los 30 KV y al alcanzar la superficie de la muestra se pueden detectar diferentes radiaciones: electrones radiodispersados, electrones secundarios, rayos X y otras menos importantes; para su detección el microscopio puede estar equipado con uno o más detectores. El poder de resolución de este tipo de microscopios puede ser mayor a los 20 nm y permite el análisis morfológico superficial de las muestras.

Preparación de las muestras

Se analizaron las masas control y con 35% de algarroba, correspondientes al diseño de reemplazo con harina de algarroba (2.2.2.1.1) sin agregado de enzima transglutaminasa y con agregado de enzima en las dos concentraciones propuestas en el diseño. Se cortaron discos de masa (preparadas según se describió en 2.2.2.1.4.2) de 2 mm de diámetro y 1 mm de espesor con un sacabocado. Los discos de masa se guardaron en solución de glutaraldehído 2,5% v/v a una temperatura de 4 °C hasta el momento de realizar la deshidratación. La deshidratación se realizó mediante lavados seriados de las muestras en soluciones con concentraciones crecientes de acetona (0, 25, 50, 75 y 100% v/v). Se realizaron tres lavados de cinco minutos con agitación para cada concentración y al llegar al último lavado con acetona se procedió a realizar el secado por punto crítico con CO₂ en un secador Baltec CPD30 (Liechtenstein). Las muestras se almacenaron en ambiente libre de humedad hasta el momento del montaje y posterior metalización con oro de las mismas con un metalizador Jeol Fine Coat JFC1100 (Japón).

Observación microscópica

Se realizaron observaciones de cara externa, fractura y desgarro de las muestras. Para ello se utilizó un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360 LV (Japón) equipado con detectores de electrones secundarios y de electrones retrodifundidos. Se

obtuvieron imágenes de diversos campos para las muestras con aumentos entre 150X y 1500X.

2.2.2.2.4. Gelatinización del almidón por calorimetría diferencial de barrido

Fundamento

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite el estudio de diferentes transiciones térmicas que involucran al almidón y que se hallan vinculadas al proceso de panificación y almacenamiento del pan (gelatinización y retrogradación). En esta técnica se mide la diferencia de temperatura entre la muestra y un material de referencia durante un calentamiento o enfriamiento programados y se compara el flujo de calor (energía/tiempo) de la muestra con el de la referencia. La referencia debe ser un material inerte que no sufra ningún cambio físico ni químico en el rango de temperatura ensayado. Cuando la muestra sufre algún cambio de fase o alguna transición, la energía absorbida o liberada se refleja en un cambio de temperatura entre la muestra y el material de referencia, el cual es proporcional al flujo de calor. Las transiciones térmicas pueden obtenerse al graficar el flujo de calor como función de la temperatura o el tiempo, obteniéndose picos cuya área es proporcional al cambio de entalpía y la dirección (hacia arriba o hacia abajo) indica si se trata de un proceso exotérmico o endotérmico.

En la Figura 2.10 se muestran los termogramas típicos obtenidos para almidones y para harinas cuando gelatinizan en condiciones de restricción de agua.

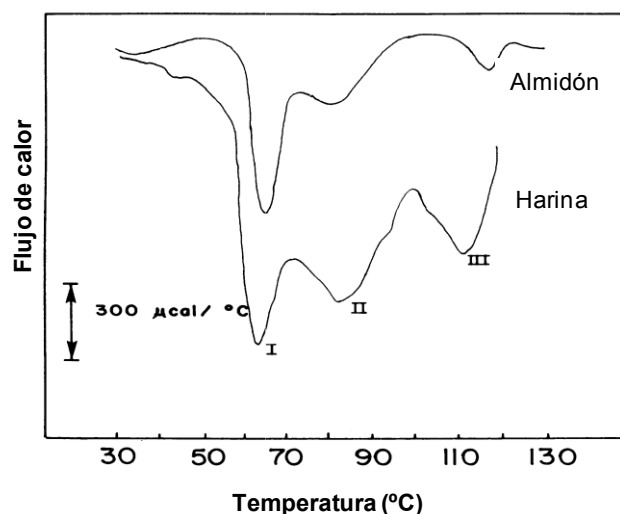


Figura 2.10. Termogramas obtenidos por DSC. Adaptado de Ghiasi et al. (1982).

En los termogramas se observa un pico desdoblado de gelatinización (picos I y II) y el pico asociado al complejo amilosa-lípido (pico III).

Protocolo Experimental

Para estudiar el efecto de la harina de algarroba en los procesos de gelatinización y retrogradación del almidón en masas frescas, se pesaron alrededor de 10 miligramos de masa en cápsulas de aluminio las cuales fueron selladas herméticamente y sujetas a un ciclo de calentamiento desde 5 °C hasta 140 °C a una velocidad de 10 °C/min en un calorímetro diferencial de barrido Q100 (TA Instruments, Estados Unidos). Como referencia se empleó una capsula vacía. La calibración del equipo se llevó a cabo empleando indio, ácido láurico y ácido esteárico como patrones de calibración. Por medio del software TA Instruments Universal Analysis 2000 Versión 4.2E (Estados Unidos) se calcularon los siguientes parámetros: la temperatura de inicio (T_0), las de pico (T_I y T_{II}) y la de finalización (T_F), la variación de entalpía (ΔH_G) asociada a la gelatinización y la temperatura de pico de disociación del complejo amilosa-lípido (T_{III}). El ensayo se realizó por triplicado.

2.2.3. Panes

2.2.3.1. Diseño experimental

La elaboración de panes se realizó de acuerdo a un diseño en el que se reemplazó parcialmente harina de trigo por harina de algarroba en la formulación, como se explicó en la sección 2.2.2.1.1, con el agregado de 3% (base harina total) de levadura fresca prensada, además de los componentes indicados en la sección mencionada. También se evaluó la calidad panadera en los productos obtenidos a partir de las masas con adición de la enzima transglutaminasa, de acuerdo al diseño de aplicación mencionado en la misma sección.

Sobre las formulaciones del diseño con 15% y 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba se evaluó la utilización de los aditivos mejoradores de panificación SSL y ácido ascórbico (AA), ambos presentes en las listas positivas del Código Alimentario Argentino, en su CAPÍTULO XVIII (Aditivos Alimentarios). Para ello se aplicó un diseño central compuesto de dos factores: X_1 (g de AA /100 g de harina total) y X_2 (g de SSL /100 g de harina total). Los límites para cada factor y el diseño completo se resumen en la

Tabla 2.3. Los niveles máximos fueron seleccionados de acuerdo a lo permitido por el CAA para la aditivación de harinas. El análisis de los parámetros medidos se realizó aplicando RSM obteniéndose ecuaciones de segundo orden (ecuación 2.31)

Tabla 2.3. Diseño central compuesto utilizado para evaluar el efecto de aditivos.

Formulación	Cantidad de ascórbico (X_1)		Cantidad de SSL (X_2)	
	codificado	decodificado (g/100g harina total)	codificado	decodificado (g/100g harina total)
1	-1	0,0059	-1	0,0732
2	1	0,0341	-1	0,0732
3	-1	0,0059	1	0,4268
4	1	0,0341	1	0,4268
5	-1,41	0	0	0,25
6	1,41	0,04	0	0,25
7	0	0,02	-1,41	0
8	0	0,02	1,41	0,5
9	0	0,02	0	0,25
10	0	0,02	0	0,25
11	0	0,02	0	0,25

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{22} X_2^2 \quad \text{Ec. 2.31}$$

donde:

Y= respuesta de la miga

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$ son los coeficientes de regresión

2.2.3.2. Elaboración de los panes

Primero se mezclaron los ingredientes sólidos y la margarina fundida durante un minuto en una amasadora planetaria Kenwood Major (Italia), luego se agregó el agua correspondiente a la absorción farinográfica (calculada según se indicó en 2.2.2.1.2) y la

levadura suspendida en parte del agua. Se amasó durante el tiempo de desarrollo óptimo obtenido del farinograma; el primer minuto a 50 rpm y el resto del tiempo a 90 rpm. La masa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos cubierta con film para evitar pérdidas de humedad superficial. Luego se laminó con un espesor de 1 cm. Una vez laminada, la masa se dejó reposar otros 10 minutos.

Posteriormente se cortaron y bollaron piezas de 90 g, se dejaron descansar 10 min y se armaron las piezas tipo pan francés en una armadora de pan MPZ (Argentina).

Las piezas se fermentaron en cámara a 30 °C y humedad relativa de 72%.

La cocción se realizó durante 25 min a 210 °C en un horno eléctrico de convección (Ariston, Argentina). Una vez finalizado el horneado, los panes se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a evaluar la calidad del producto obtenido como se describe más adelante.

2.2.3.2.1. Curvas de fermentación

Se realizaron las curvas de fermentación para las masas correspondientes al diseño de reemplazo de harina (sin aditivos) con el objeto de evaluar el comportamiento de las masas frente al leudado y determinar el tiempo óptimo de fermentación.

Las masas para este ensayo se prepararon como se describió en el inciso 2.2.3.2, pero en lugar de cortar piezas de masa de 90 g se cortaron de 50 g, se bollaron y se colocaron en probetas de 500 ml (5 cm de diámetro) provistas de un émbolo móvil (Figura 2.11). Las probetas se colocaron en una cámara fermentadora a 30 °C y se midió el incremento del volumen en función del tiempo, inicialmente cada 5 min y luego cada 10 min hasta que el volumen de la masa comenzara a descender.

En la Figura 2.11 se ejemplifica el incremento de volumen en la masa con el paso del tiempo y como se midió el mismo.

Los datos se graficaron con el software OriginPro 8 (OriginLabCorporation, Estados Unidos) y se modelaron con la función sigmoidea de Boltzmann (ecuación 2.32). La selección de dicho modelo fue empírica, siendo la misma la que presentó mejor ajuste para las muestras analizadas.

$$y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + e^{(t-x_0)/dx}) \quad \text{Ec. 2.32}$$

donde:

Y = incremento de volumen (cm^3)

t = tiempo (min)

A_1 , A_2 , x_0 y dx son constantes

A_2 corresponde al máximo incremento de volumen. El tiempo óptimo de fermentación se determinó como el tiempo requerido para alcanzar $\frac{3}{4}$ de dicho máximo, debido a que durante el inicio del horneado continúa leudando la masa hasta que se fija la estructura y hasta producirse la muerte de las levaduras.

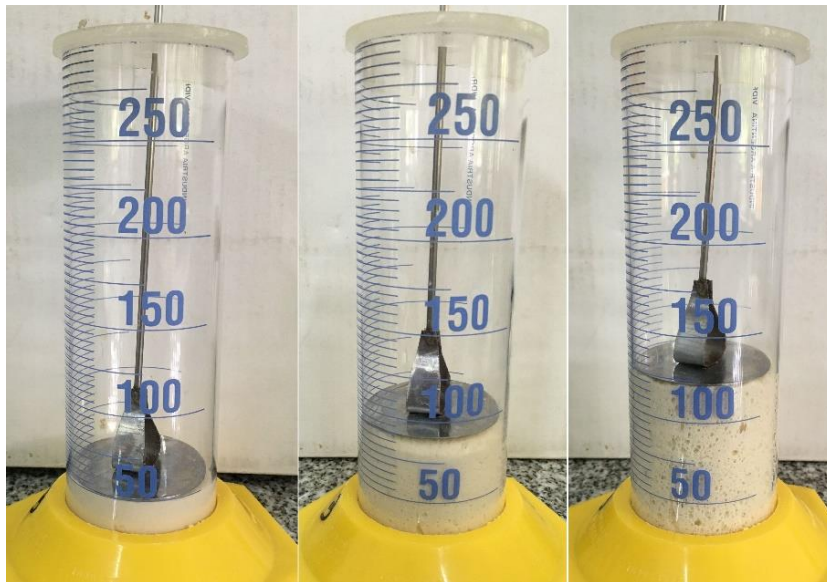


Figura 2.11. Medida de aumento de volumen de la masa durante la fermentación para determinar los tiempos óptimos de leudado.

2.2.3.2.2. Evaluación de la calidad panadera

La evaluación de la calidad panadera de los panes obtenidos se realizó a través de diferentes ensayos: volumen específico de las piezas, color de corteza, color de miga, alveolado de la miga, textura de miga y humedad de miga.

2.2.3.2.2.1. Volumen específico de los panes

Se determinó el volumen específico de 8 panes de cada formulación por desplazamiento de semillas de colza en un pan-volumenómetro. Se midió el volumen inicial ocupado por

las semillas, luego se agregó un pan (de masa conocida) y se leyó el nuevo volumen alcanzado. El desplazamiento que presentan las semillas es directamente proporcional al volumen del pan. El volumen específico se calculó como el cociente entre la diferencia de volumen y la masa de la pieza de pan.

2.2.3.2.2. Color de la corteza

Las determinaciones del color de la corteza de los panes se realizó con un colorímetro de superficie Minolta CR 400 Series (Japón) calibrado con patrones estándares ($Y = 93,2$, $x = 0,3133$, $y = 0,3192$). Se trabajó en el sistema de medida de color CIELab (Figura 2.12) (C.I.E., 1986), que define el color a partir de las coordenadas L^* , a^* y b^* . Las magnitudes L^* , a^* y b^* son adimensionales. L^* representa la luminosidad y varía entre 0 (negro) y 100 (blanco). El corte del eje L^* con el plano que forman a^* y b^* es el punto acromático. El valor de a^* es una medida de la intensidad de color rojo; en el desplazamiento sobre el eje a^* hacia valores positivos del punto acromático se observan los rojos y hacia los valores negativos los verdes. El valor b^* es una medida de la intensidad de color amarillo; en el desplazamiento sobre el eje b^* hacia valores positivos del punto acromático se observan los amarillos y hacia los valores negativos los azules. Para cada formulación se tomó el color a 8 piezas de pan, donde cada medida fue realizada por triplicado.

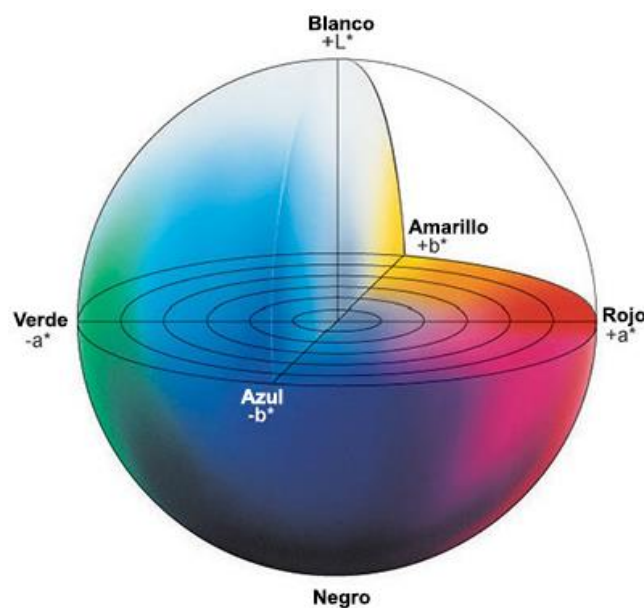


Figura 2.12. Espacio de color CIELab. (Imagen reproducida de <http://sensing.konicaminolta.com.mx>).

2.2.3.2.2.3. Color de miga

Como se indicó para color de corteza, se midió el color de la miga a rodajas de 8 piezas de pan para cada formulación.

2.2.3.2.2.4. Alveolado de la miga

Se tomaron rodajas de la parte media de los panes (ocho por formulación) y fueron escaneadas en un escáner HP Scanjet 4070 Photosmart (Hewlett-Packard, Estados Unidos). Las imágenes se recortaron de manera tal de tomar la parte central (Figura 2.13.A) de cada rodaja (25x25 mm). Debido a las diferencias en la coloración de las migas, dependiente de la formulación, se llevaron todas las imágenes a un nivel fijo de luminosidad (Figura 2.13.B), luego fueron transformadas a escala de grises (Figura 2.13.C) y se aplicó el umbral “Huang” (elegido empíricamente entre los proporcionados por el software por ser el que mejor reflejaba la diferenciación pared de miga/alveolos) para binarizar la imagen (Figura 2.13.D) en zonas blancas (miga) y negras (alveolos). Finalmente, sobre las imágenes binarizadas se calcularon los parámetros alveolares descritos abajo. El software utilizado para el acondicionamiento de las imágenes y análisis del alveolado fue ImageJ 1.48q (National Institutes of Health, Estados Unidos). Los parámetros calculados fueron:

- Densidad alveolar: número total de alveolos por unidad de área (mm^2)
- Tamaño medio de los alveolos: es el promedio del área ocupada por cada alveolo
- Área ocupada por alveolos (%): es la suma de las áreas ocupadas por cada alveolo dividido el área total del campo donde se efectuó la medición. Corresponde a la fracción de aire de la miga.
- Circularidad: es una medida de la “regularidad” de la forma de los alveolos, el valor máximo es 1 y corresponde a un círculo perfecto, al disminuir el valor de circularidad significa que el alveolo se asemeja más a una elipse.

Los alveolos con tamaño superior a 30 mm^2 se descartaron para las estadísticas de tamaño medio y circularidad ya que los mismos se conformaban de varios alveolos que el análisis de las imágenes con el software no permitió individualizar, pero fueron tomados en cuenta para calcular el área ocupada por los alveolos.

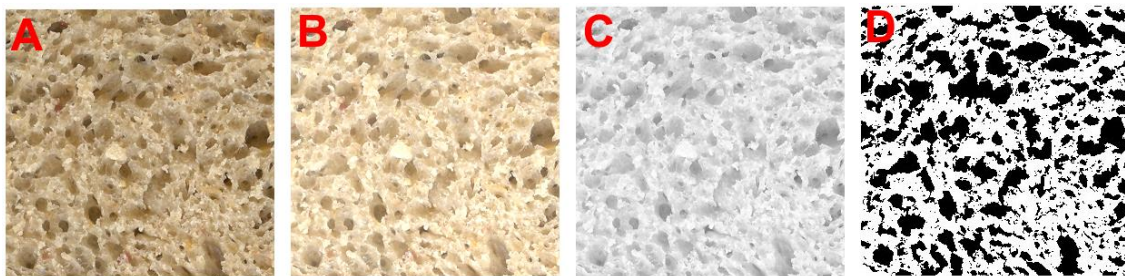


Figura 2.13. Procesamiento de las imágenes para el análisis del alveolado. **A**, imagen original del escaneo de la miga; **B**, imagen luego del ajuste de luminosidad; **C**, imagen transformada a escala de grises; **D**, imagen binarizada.

2.2.3.2.2.5. Textura de la miga

De la parte media de cada pieza de pan, se obtuvieron dos rodajas de 2 cm de espesor y 3 cm de diámetro. Las muestras de miga se analizaron con un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) provisto de una célula de carga de 25 kg mediante un ensayo de análisis de perfil de textura (TPA). Las muestras se sometieron a un ciclo de compresión doble hasta el 40% de la altura original utilizando una sonda plana (SMSP/75) de 75 mm de diámetro y a una velocidad de movimiento de 1 mm/s. El ensayo se realizó por octuplicado para cada condición. Se determinaron: dureza (N), consistencia (N*s), elasticidad (-), resiliencia (-), gomosidad (N), y masticabilidad (N), según se describió en la sección 2.2.2.1.3.2 (TPA de masas).

2.2.3.2.2.6. Humedad de la miga

Se determinó humedad de las migas por método indirecto (2h a 135 °C) según se describió para las harinas en la sección 2.2.1.1.

2.2.3.2.3. Caracterización de la miga por CSLM

La misma técnica utilizada para la caracterización de las masas, descrita en 2.2.2.2.2, se utilizó para realizar observaciones sobre la miga de los panes con y sin reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba.

Preparación y observación microscópica de las muestras

Se estudiaron las migas de los panes correspondientes a las formulaciones control (sin algarroba) y con el máximo reemplazo con harina de algarroba (35%). Para ello se

realizaron con un bisturí delgados cortes de miga de pan fresco que fueron colocados sobre portaobjetos y posteriormente se cubrieron con soluciones conteniendo los fluoróforos Rod B (Biopack) 0,001%, FITC (Sigma) 0,01% y Calcoflúor White (Sigma) 0,01%, con el objetivo de realizar tinciones diferenciales, no covalentes de los componentes de la miga. Luego de aproximadamente 30 minutos se lavó el excedente de fluoróforos con agua destilada y se cubrieron las muestras con cubreobjetos para finalmente realizar las observaciones.

Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio confocal de filtros "Fluoview FV-1000" de Olympus (Japón). Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron de 405 nm, 488 nm y 559 nm, mientras que las de emisión fueron de 422 nm, 518 nm y 625 nm para Calcoflúor White (CF), FITC y Rod B respectivamente. Se obtuvieron micrografías de diferentes campos con aumentos entre 4X y 40X.

2.2.3.2.4. Efecto de aditivos

El efecto de los aditivos (SSL y AA) sobre la calidad panadera se evaluó por RSM de acuerdo al diseño central compuesto explicado en 2.2.3.1. Los ensayos llevados a cabo para evaluar la calidad de los panes fueron los mismos que para los panes sin agregado de aditivos (sección 2.2.3.2.2).

2.2.3.3. Ensayos de conservación

Los panes frescos se envasaron en bolsas de polietileno y almacenaron durante 1, 3 y 6 días a 20 °C, luego de transcurrido dicho tiempo se tomaron muestras. El envejecimiento del pan se analizó a través de medidas de humedad y perfil de textura de la miga y el proceso de retrogradación del almidón por calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X.

2.2.3.3.1 Análisis de perfil de textura de la miga

Se procedió según se explicó en la sección 2.2.3.2.2.5.

2.2.3.3.2 Humedad de la miga

Se procedió según se explicó en la sección 2.2.3.2.2.6.

2.2.3.3.3. Caracterización fisicoquímica y microestructural de panes

2.2.3.3.3.1 Microscopía óptica de luz polarizada

La estructura cristalina de muestras de la harina de trigo, harina de algarroba, mezcla de las harinas y miga de pan liofilizada y molida (para los panes control y con 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba) se observó por microscopía de luz polarizada en un microscopio Olympus BX60 (Japón) preparando dispersiones de las muestras en aceite mineral sobre portaobjetos. Se obtuvieron micrografías con diferentes aumentos.

2.2.3.3.3.2 Recristalización del almidón - Difracción de Rayos X

Fundamento

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

Protocolo experimental

Muestras de miga de pan control y pan con 35% de reemplazo con harina de algarroba, almacenadas durante 0 (miga de pan fresco) y 6 días a 20 °C se congelaron en freezer a -80 °C y se liofilizaron. Las muestras liofilizadas se pulverizaron y acondicionaron para ser analizadas por duplicado en un difractómetro PW 1032 (Philips, Holanda) con un voltaje de 40 kV y una corriente de 20 mA. Los difractogramas se obtuvieron usando radiación Cu-K α , la exploración de ángulos 2θ se realizó de 4 a 40 ° a una velocidad de 1 °/min y con un tamaño de paso de 0,02 °. Los difractogramas obtenidos se analizaron con el software PeakFit v4.12 (SeaSolve Software Inc., Estados Unidos), como se describe a continuación, para calcular los valores de cristalinidad total, cociente entre el área cristalina (suma de todas las áreas de los picos detectados por encima de la zona amorfa) y el área total (área cristalina + área amorfa).

El protocolo de acondicionamiento de los difractogramas consta de un suavizado de la

curva (en nuestro caso el que mejor se adaptó a nuestros datos fue el de tipo Gaussiano), el posterior seccionamiento de la curva entre los valores del ángulo 2θ de interés (10 a 30° para nuestro caso) y el trazado de la línea de base. Luego se ajustan el área amorfa y los picos de cristalinidad bajo la curva definida por el difractograma acondicionado y finalmente se obtienen las áreas de cada pico de cristalinidad y el área de la zona amorfa, pudiendo calcularse con estos datos la cristalinidad total.

En la Figura 2.14 se pueden observar algunos estadios del procedimiento seguido para el acondicionamiento de los difractogramas para el cálculo de la cristalinidad en las muestras.

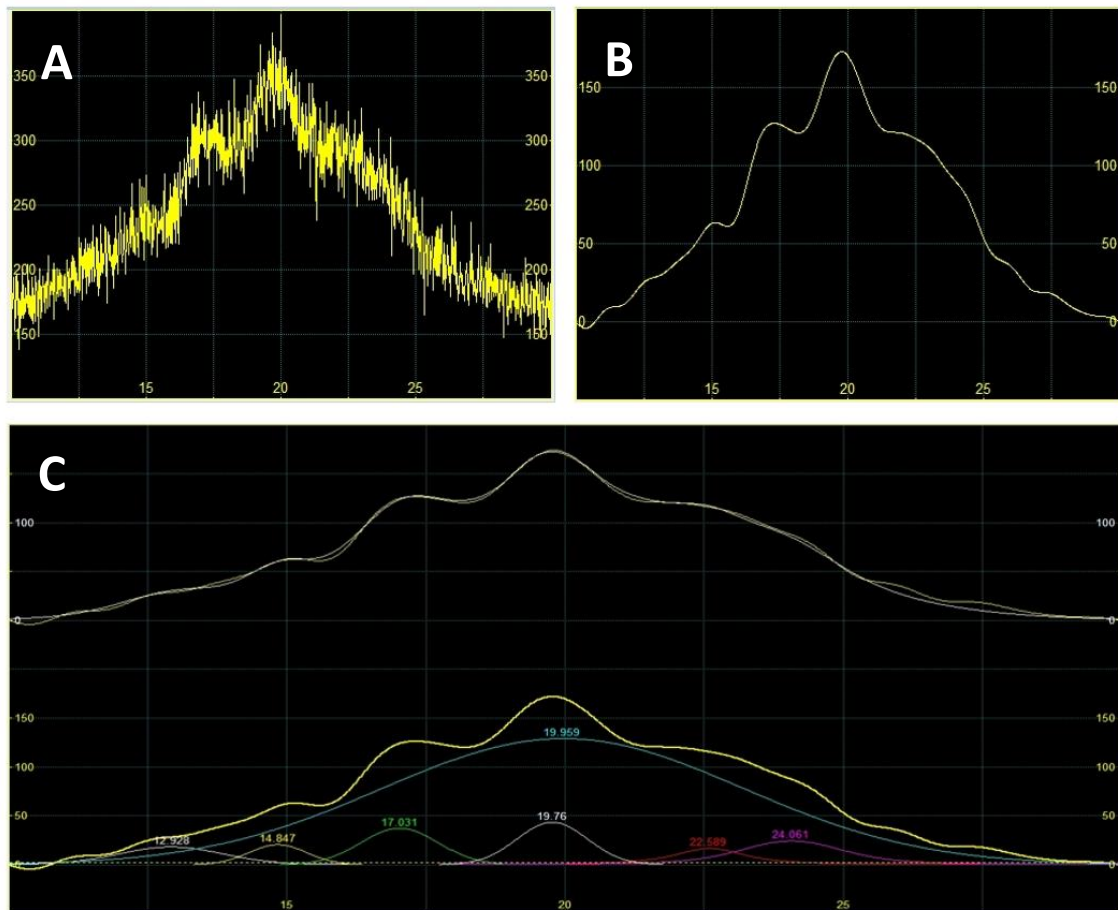


Figura 2.14. Acondicionamiento de los difractogramas para el cálculo de la cristalinidad total. **A:** difractograma original; **B:** gráfico suavizado, con línea de base situada entre los límites de interés; **C:** cálculo de las áreas amorfa y cristalinas.

2.2.3.3.3. Recristalización de amilopectina - DSC

Se simuló el horneado de las masas frescas correspondientes al diseño de reemplazo

con harina de algarroba (sección 2.2.2.1.1) realizando un procedimiento como el explicado para el estudio de la gelatinización del almidón (ítem 2.2.2.2.3), pero en este caso calentando hasta 105 °C ya que durante el horneado la miga del pan no supera dicha temperatura. Luego se almacenaron las capsulas a 20 °C durante 0, 1, 3 y 6 días.

Una vez alcanzado el tiempo de almacenamiento se procedió a realizar un calentamiento de 5 °C a 140 °C a una velocidad de 5 °C/min y se analizaron los termogramas para evaluar la retrogradación de amilopectina.

Se determinaron las temperaturas de: inicio (T_{R0}), de pico (T_R) y final (T_{RF}) y la entalpía asociada al pico de retrogradación (ΔH_R) y se calculó el índice de retrogradación (IR) de acuerdo a la ecuación 2.33.

$$IR (\%) = \left(\frac{\Delta H_R}{\Delta H_G} \right) * 100 \quad \text{Ec. 2.33}$$

donde:

ΔH_G = Entalpía de gelatinización en masa fresca (día 0 de almacenamiento)

2.2.3.4. Composición porcentual – Análisis nutricional

Se determinó la composición proximal de los panes obtenidos según el diseño expuesto en la sección 2.2.3.1 (sin aditivos).

El contenido de humedad se determinó como se explicó en 2.2.1.1.

Para determinar el contenido de cenizas, proteínas, fibra dietaria y lípidos primero se cortaron los panes en pequeños trozos y se secaron en estufa a 105 °C hasta peso constante, luego se molió y sobre el pan molido se determinaron cenizas, proteínas y fibra dietaria según lo explicado en 2.2.1 para composición de las harinas. En cuanto al contenido de lípidos el mismo se determinó por el método AACC 30-10 (AACC, 2000).

2.2.3.5. Análisis sensorial

Se realizó un análisis de aceptabilidad sensorial para los panes compuestos trigo-algarroba sin aditivos obtenidos según se explicó en 2.2.1.

Para ello se empleó panel sensorial no entrenado de cincuenta personas. El mismo estuvo compuesto por 29 mujeres y 21 hombres con un rango de edades entre 25 y 60

años. A los evaluadores se les solicitó que indicaran su nivel de agrado sobre 3 muestras de pan, correspondientes a las formulaciones con 15, 25 y 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba.

Se utilizó una escala hedónica de nueve puntos, correspondiendo 1 a “disgusta mucho” y 9 a “gusta mucho”, para que los panelistas indiquen su nivel de agrado sobre los siguientes parámetros: 1- Aspecto; 2- Color; 3- Aroma; 4- Textura; 5- Sabor; 6- Aceptabilidad global. Además se les solicitó que indicaran si alguna vez habían consumido productos con algarroba, pudiendo responder: 1- Si, ocasionalmente, 2- Si, frecuentemente o 3- No, nunca antes; con la finalidad de obtener información acerca del conocimiento/consumo de productos con algarroba por parte del consumidor.

Las muestras fueron presentadas en una bandeja de manera aleatoria y codificadas con números de tres cifras seleccionados al azar junto a la planilla correspondiente (Figura 2.15). Finalmente se decodificaron las planillas y se analizaron los resultados para cada parámetro mediante un ANOVA con una significancia de 0,05.



Figura 2.15. Presentación de las muestras para el análisis sensorial de los panes.

2.2.4. Análisis estadístico

Los ANOVA mono o bifactoriales, comparaciones de medias (test de LSD), modelado de superficies de respuesta y análisis de covarianza (ANCOVA) se realizaron con el software Statgraphics Centurion XV versión 2.15.06 (StatPoint Technologies, Estados Unidos) con niveles de significancia de 5%.

Los modelados de las curvas de fermentación y de las curvas de relajación de esfuerzo y de relajación en los ensayos de RMN se realizaron con el software OriginPro 8 (Origin Lab Corporation, Estados Unidos).

CAPITULO III
CARACTERIZACION DE MASAS A BASE DE
HARINAS DE TRIGO Y ALGARROBA

3.1. Composición de las harinas

La composición de las harinas de trigo y de algarroba utilizadas para los ensayos en masas y panes se resume en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición porcentual de las harinas.

Componente	Harina de Trigo	Harina de Algarroba
Humedad (%p/p)	13,74 ± 0,11	6,01 ± 0,03
Proteínas (%p/p)	12,11 ± 0,03	11,13 ± 0,04
Lípidos (%p/p)	1,32 ± 0,04	1,13 ± 0,04
Cenizas (%p/p)	0,70 ± 0,01	3,59 ± 0,04
H. de C. (%p/p)*	72,13	78,14
Fibra Dietaria (%p/p)	3,74 ± 0,03	26,77 ± 0,95

Valores promedio ± DS; *H. de C. = 100 – Hum. % - Prot. % - Líp. % - Cen. %

Los valores de composición obtenidos para la harina de trigo se encuentran dentro de los esperados, aunque el contenido de cenizas es levemente superior para una harina tipificada como 000 (Código Alimentario Argentino, 2014). En cuanto a la composición de la harina de algarroba se puede observar un nivel levemente inferior en el contenido de proteínas respecto a la harina de trigo, así mismo se observa un contenido de minerales considerablemente mayor y se destaca el alto contenido de fibra dietaria de esta harina. Los valores concuerdan con los informados anteriormente por diferentes autores para *P. alba* y otras especies relacionadas. Los rangos informados varían entre 10,1 y 14,0% de proteínas, entre 20,0 y 30,0% de fibra dietaria entre 3,4 y 4,4% de minerales y entre 2,5 y 2,8% de materia grasa (Becker, Sayre, & Saunders, 1984; Felker et al., 2013; Marangoni & Alli, 1988; Meyer et al., 1986). Por otra parte en un estudio reciente Sciammaro et al. (2015) informaron la composición de harina de algarroba (*P. alba*) proveniente de una región cercana a la utilizada en esta tesis. En dicho estudio se encontraron valores similares en el contenido de fibra dietaria total y de cenizas (25,1% y 3,37% en base seca respectivamente).

3.2. Caracterización reológica de las masas

Las propiedades reológicas de las masas son de gran importancia para poder desarrollar productos con la calidad deseada. En las masas de trigo, el gluten tiene una importancia fundamental puesto que le confiere propiedades elásticas y de extensibilidad a la misma que permiten su maquinado y la posterior expansión durante la fermentación y horneado para dar lugar a la miga. Es por ello que resulta importante caracterizar el comportamiento reológico de las masas al incorporar nuevos ingredientes en las formulaciones y poder realizar los cambios necesarios para poder facilitar el procesamiento y la obtención de productos de buena calidad. A continuación se describen los resultados obtenidos para los diferentes ensayos reológicos llevados a cabo sobre las masas compuestas harina de trigo-harina de algarroba.

3.2.1. Perfiles farinográficos

Los farinogramas obtenidos para la harina de trigo y para las mezclas de harinas trigo-algarroba (con 15, 25 y 35% de reemplazo) con agregado de 2% de NaCl se muestran en la Figura 3.1.

El farinograma obtenido para la muestra de harina de trigo (Fig. 3.1.A) muestra un incremento rápido de la consistencia (llegando en menos de 2 minutos a las 500 Unidades Brabender (UB)), que se puede asociar a la hidratación del almidón. Seguido a esto se observa un leve incremento de consistencia que se prolonga hasta los 18 minutos, asociado al desarrollo de la red de gluten.

En el caso de las mezclas harina de trigo-harina de algarroba también se puede observar un rápido incremento en la consistencia, pero en este caso alcanzando valores menores (cerca de 400 UB) a los registrados para la muestra de harina de trigo. El incremento inicial es seguido por una leve meseta en la que se mantiene el valor de consistencia para luego volver a incrementarse (dando lugar a un segundo pico) y llegar a un máximo bien marcado. Para el caso de la mezcla con mayor contenido de algarroba (Fig. 3.1.D) se observó un mantenimiento más prolongado de la consistencia en el tiempo, respecto a las mezclas con 15 y 25% de harina de algarroba, lo que estaría indicando una mayor estabilidad.

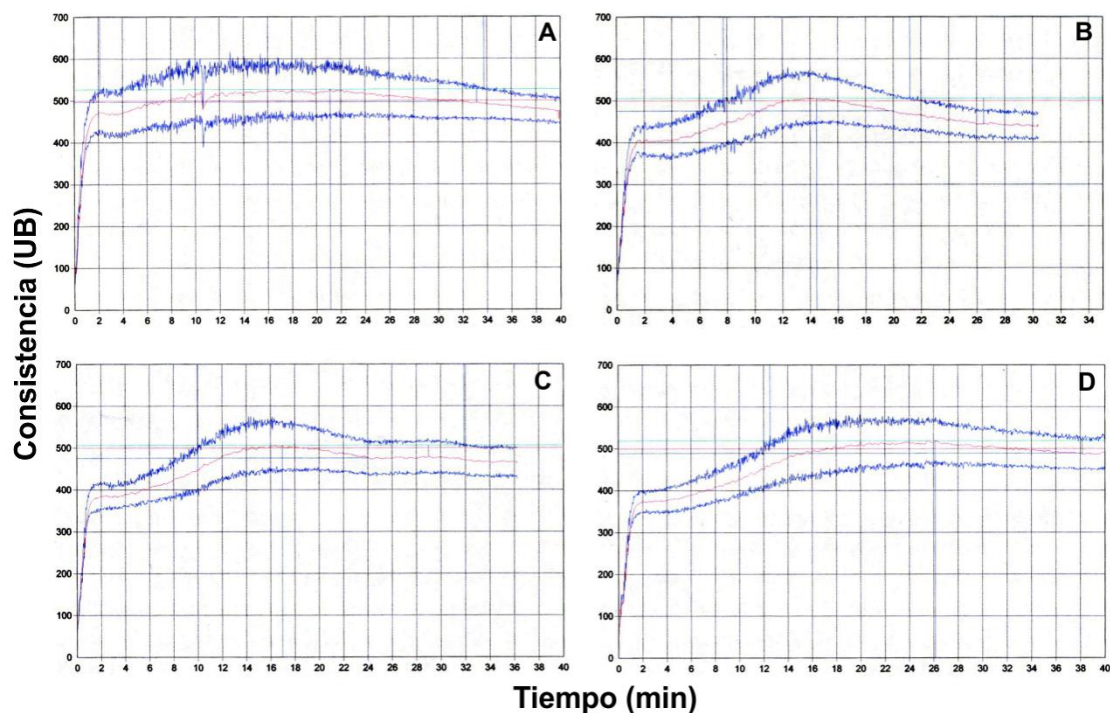


Figura 3.1. Farinogramas típicos obtenidos para la harina de trigo **(A)** y para las mezclas con 15 **(B)**, 25 **(C)** y 35% **(D)** de reemplazo de harina de trigo por algarroba con agregado de 2% de NaCl.

El comportamiento mostrado por las mezclas trigo-algarroba puede compararse con el reportado por Salinas & Puppo (2013) al utilizar inulina enriquecida con oligofructosa para suplementar masa de trigo hasta un nivel de 12% (base harina). Katina (2003) describe que al iniciar el mezclado en harinas con agregado de fibra se observa una rápida absorción del agua libre y pareciera que el agua se encuentra en defecto, pero luego de unos minutos de mezclado la masa desarrolla sus propiedades características alcanzando su punto óptimo de consistencia. Además la misma autora destaca la baja tolerancia al sobre-mezclado que suelen tener las masas enriquecidas en fibra. En un estudio sobre panificación con mezcla de harinas de trigo y de algarrobo europeo (*Ceratonia siliqua L.*), Salinas, Carbas, Brites, & Puppo (2015) informaron curvas farinográficas comparables a las obtenidas en esta tesis al realizar dichos ensayos utilizando la mezcla de harina de trigo y harina de pulpa de algarrobo europeo (rica en fibra y azúcares); y atribuyeron dicho comportamiento principalmente a la presencia de fibra.

Las modificaciones del perfil farinográfico informadas por Salinas & Puppo (2013) y por Salinas et al. (2015) fueron similares a las observadas en nuestros ensayos, lo que sugiere que la presencia de fibra en la harina de algarroba y su capacidad de retención de agua en particular y la velocidad de absorción de dicha agua, podría ser responsable de este tipo de comportamiento.

Los parámetros farinográficos obtenidos para la harina de trigo y para las mezclas con 15, 25 y 35% de harina de algarroba se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Parámetros farinográficos para la harina de trigo y las mezclas de harinas trigo-algarroba con 2% de NaCl.

Muestra	Absorción de agua %	Tiempo de desarrollo (min)	Estabilidad (min)	Grado de aflojamiento (UB)
Control	59,1±0,1 ^d	18,0±3,3 ^a	34,9±3,3 ^c	26,5±5,5 ^a
15%	56,3±0,1 ^c	14,5±0,0 ^a	12,7±0,8 ^a	62,5±1,5 ^b
25%	54,1±0,1 ^b	17,4±0,4 ^a	19,7±3,3 ^{ab}	39,5±12,5 ^{ab}
35%	52,4±0,1 ^a	23,1±3,1 ^a	28,1±4,3 ^{bc}	29,0±3,0 ^a

Valores promedio ±DS. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La absorción de agua farinográfica disminuyó al incrementar la proporción de harina de algarroba en las mezclas. Esta tendencia resulta opuesta a la hallada por otros autores al sustituir la harina de trigo por harinas de ciertas leguminosas como la soja, lupino, habas y garbanzo (Abdel-Aal et al., 1993; Doxastakis et al., 2002; Mohammed et al., 2012; Ribotta et al., 2005; Rosales-Juárez et al., 2008). Las mezclas analizadas por estos autores resultaron tener un mayor contenido de proteínas que la harina de trigo, razón a la que atribuyeron el aumento de la absorción de agua farinográfica.

En nuestro caso la sustitución de harina de trigo por harina de algarroba no da lugar a cambios sustanciales en el nivel de proteína total debido a que ambas harinas tienen un contenido similar de proteínas (12,11% en la harina de trigo y 11,13% en la harina de algarroba); sin embargo, la cantidad de gluten resulta disminuida, hecho que seguramente está influyendo en la reducción de la absorción de agua farinográfica. Esta disminución, también reportada por Salinas & Puppo (2013) y por Wang, Rosell, &

Benedito de Barber (2002) al añadir inulina a la masa, se puede relacionar con la diferente capacidad de absorción de agua de diferentes componentes de la harina de algarroba, principalmente fibra, en comparación con proteínas y almidón de la harina de trigo. Salinas et al. (2015) también informaron disminuciones de la absorción de agua farinográfica al incrementar el reemplazo de harina de trigo por harina de pulpa de algarrobo europeo en mezclas para panificación. A su vez el tamaño de las partículas de fibra influyen en la cantidad y en la velocidad de absorción de agua durante el amasado, siendo más lenta la absorción cuando el tamaño de las mismas es más grande (Katina, 2003).

No se registraron diferencias significativas en el tiempo de desarrollo (Tabla 3.2), esto indica que para las cuatro formulaciones el tiempo necesario para alcanzar el máximo de consistencia durante el amasado fue similar.

La estabilidad disminuyó significativamente en las mezclas con 15 y 25% de harina de algarroba, efecto también observado en mezclas de harinas de trigo y pulpa de algarrobo europeo por Salinas et al. (2015). Sin embargo, cuando se aumentó la proporción de harina de algarroba a un 35% y el agua se ajustó al valor óptimo, se registró una recuperación de la estabilidad, acercándose al valor medido para la masa control (sin harina de algarroba), un efecto también fue informado por los mencionados autores cuando se realizó un 30% de reemplazo de harina de trigo por harina de pulpa de algarrobo europeo. La estabilidad farinográfica es un indicador de la fuerza de la masa; valores más altos se corresponden con masas más fuertes que, a su vez, poseen mayor tolerancia al sobre amasado.

Los resultados farinográficos obtenidos concuerdan con la existencia de un efecto de dilución sobre las proteínas del gluten, conduciendo a la formación de una masa más débil cuando se realiza una sustitución de 15 a 25% de harina de trigo por harina de algarroba. Sin embargo, pareciera que dicho efecto negativo es parcialmente compensado cuando se utilizan los niveles más altos de harina de algarroba y se ajusta el contenido de agua de acuerdo a la absorción farinográfica. Esta compensación se debería a un aumento de la consistencia producido por los componentes de la harina de algarroba y no se ve reflejada en otros ensayos (presentados más adelante) en donde el agregado de mayor cantidad de harina de algarroba condujo a propiedades muy distintas del control (por ejemplo, textura de masa, textura de miga).

El grado de aflojamiento resultó máximo en la muestra con 15% de reemplazo de harina. En los niveles más altos de sustitución se observó un efecto de fortalecimiento, probablemente debido a la fibra y proteínas de la algarroba, que condujo a valores similares a los obtenidos para la masa control. Cabe mencionar que las semillas de *Prosopis* contienen un galactomanano (hidrocoloide) (Meyer et al., 1986) que podría ayudar a reforzar la estructura de la matriz y así contribuir a la formación de una masa menos blanda y más estable.

Otros autores han reportado disímiles efectos en la estabilidad al reemplazar parcialmente harina de trigo con harinas de diferentes leguminosas. Ribotta et al. (2005) han estudiado el efecto de harinas de soja, enzimo-activas y tratadas térmicamente, sobre masas de trigo con 5 a 12% de sustitución, obteniendo incrementos en las estabilidades al realizar la sustitución. Para mezclas de trigo-lupino con niveles de sustitución de 5 a 15%, Fenn et al. (2010) obtuvieron estabilidades inferiores, particularmente en los niveles más altos (15%) de lupino respecto a las masas sin sustituir.

Los farinogramas aportan información de valor práctico para la formulación de masas compuestas donde la harina de trigo haya sido parcialmente reemplazada por harina de algarroba, siempre con agua en cantidad óptima. Para un estudio en un rango más amplio de formulaciones, se prepararon masas compuestas utilizando un diseño central compuesto (descrito en la sección 2.2.2.1.1). Esto permitió, a través de la obtención de superficies de respuesta, analizar el comportamiento reológico en función de la variación simultánea de harina de algarroba y de agua.

3.2.2. Ensayos de textura

3.2.2.1. Análisis de perfil de textura

En la Figura 3.2 se observan los perfiles de textura de las masas 1, 4 y 9 del diseño central compuesto, que corresponden a las formulaciones con 10,25 g de algarroba y 54,39 g de agua (M1), con 59,75 g de algarroba y 75,61 g de agua (M4) y 35 g de algarroba y 65 g de agua (M9) cada 100 g de harina de trigo respectivamente y el perfil de textura para la masa control de harina de trigo (formulación no incluida en el diseño). Puede observarse el incremento en la dureza, correspondiente al máximo del primer pico, para las masas compuestas de trigo y algarroba respecto a la masa control de trigo. El valor

de dureza más alto ($6,78 \pm 0,43$ N), entre las masas mostradas en la figura, se registró para M4, que corresponde a la masa con mayor contenido de algarroba.

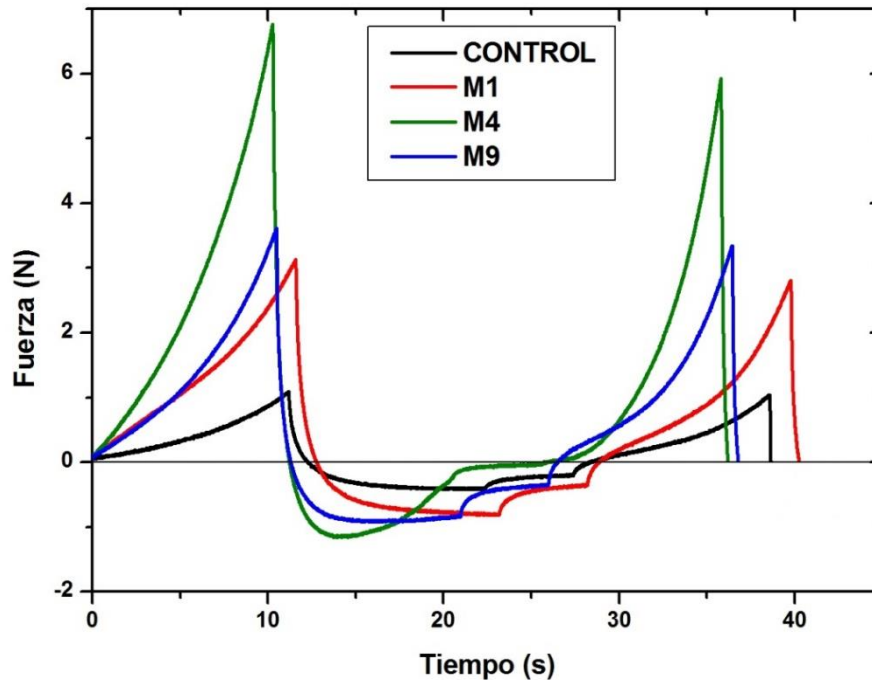


Figura 3.2. Perfiles de textura típicos para la masa **control** de trigo y distintas formulaciones del diseño experimental. **M1** (10,25/54,39), **M4** (59,75/75,61), **M9** (35/65) (algarroba (g/100g H. de trigo) / agua (g/100g H. de trigo)).

También se destaca el incremento en el área del pico negativo, que se corresponde con la adhesividad, para las masas compuestas respecto a la masa control. Efectos similares en el aumento de adhesividad han sido previamente informados al incorporar harinas de leguminosas ricas en fibra como poroto chino, garbanzo, soja y habas (Giménez et al., 2012; Hallén, İbanoğlu, & Ainsworth, 2004; Mohammed et al., 2012; Ribotta et al., 2005). Otros autores también han informado incrementos de la adhesividad en masas enriquecidas con fibra (Salinas & Puppo, 2014; Salinas, Zuleta, Ronayne, & Puppo, 2012). Una mayor adhesividad de la masa puede asociarse a una menor capacidad de retención de agua o a una velocidad de absorción de agua mas lenta. Esto puede generar que durante el ensayo el agua migre a la superficie de la masa e incrementar el valor de dicho parámetro.

A partir de los ensayos, se obtuvieron los valores de dureza, consistencia, cohesividad, elasticidad y resiliencia de acuerdo a las definiciones de la sección 2.2.2.1.3.2 para las masas correspondientes al diseño central compuesto.

Los coeficientes de determinación (ajustados a los grados de libertad correspondientes) obtenidos para los modelados de resiliencia, cohesividad y elasticidad fueron 0,94, 0,74 y 0,61 respectivamente. Los factores de los polinomios para los mencionados parámetros se muestran la Tabla 3.3.

En las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5 se pueden observar las superficies de respuesta obtenidas para resiliencia, cohesividad y elasticidad de las masas, respectivamente.

No se pudieron obtener modelados aceptables para dureza y consistencia debido a que la falta de ajuste del modelo resultó significativa ($p < 0,05$).

Tabla 3.3. Factores correspondientes a los modelados de resiliencia y cohesividad de las masas.

	Resiliencia	Cohesividad	Elasticidad
β_0	0,30138	0,3633	1,34007
β_1	0,00290	-0,004815	-0,03404
β_2	-0,00793	0,006994	-0,00551
β_{11}	-	-	-
β_{12}	$-3,6 \cdot 10^{-5}$	-	0,00044
β_{22}	$6,2 \cdot 10^{-5}$	-	-
R² ajustado	0,94	0,74	0,61
p-Falta de ajuste	0,3594	0,1979	0,1215

Subíndices: 1- Harina de algarroba, 2- Agua

La resiliencia se relaciona con la capacidad de una muestra para recuperarse al instante después de una deformación, por lo que también es conocida como elasticidad instantánea. El incremento en la cantidad de harina de algarroba en las formulaciones condujo a masas más resilientes, evidenciado por el coeficiente positivo en el modelo polinómico (β_1). El aumento del contenido de agua provocó un comportamiento opuesto (coeficiente β_2 negativo), pero en diferente grado para masas con alto o bajo contenido de algarroba, como se puede apreciar en la superficie de respuesta (Figura

3.3). En las formulaciones con niveles más altos de harina de algarroba, los cambios en la cantidad de agua generaron respuestas más marcadas en la resiliencia de la masa, observándose un gran aumento de la resiliencia cuando disminuía la cantidad de agua.

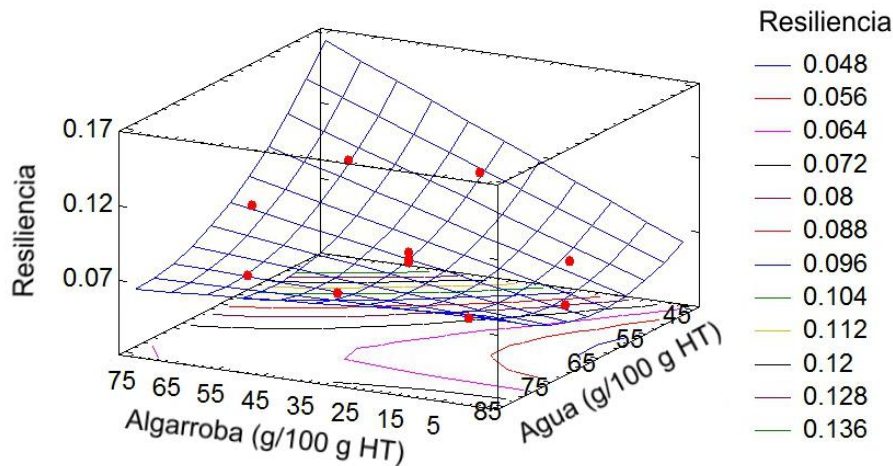


Figura 3.3. Superficie de respuesta obtenida para resiliencia de masa.

La cohesividad es un parámetro relacionado con la capacidad de los componentes estructurales para mantenerse juntos y está asociado a la integridad de la muestra. El modelo polinómico obtenido para este atributo resultó lineal con coeficiente negativo para la algarroba y positivo para el agua. Así, las formulaciones con bajas cantidades de algarroba y altos niveles de agua dieron lugar a las masas más cohesivas (Figura 3.4). Por el contrario, al incrementar los contenidos de algarroba y/o reducir los niveles de agua se obtuvieron masas menos cohesivas. Este efecto está indicando una menor integración de los componentes probablemente por un efecto combinado de interrupción de la red de gluten y una insuficiente cantidad de agua para el desarrollo de la misma. Salinas et al. (2012) informaron reducciones en la cohesividad de masas adicionadas con inulina y sales de calcio. Este comportamiento se relaciona, a su vez, con la menor estabilidad encontrada para las mezclas trigo-algarroba (respecto al control sin algarroba) en los ensayos farinográficos. Por lo expuesto, el papel del agua en el desarrollo de matrices cohesivas parece relevante.

Teniendo en cuenta que los farinogramas se obtienen en una óptima absorción de agua, la compensación parcial observada entre la dilución de gluten y el fortalecimiento sólo

podría ser posible en presencia de suficiente agua (situación que no ocurre en las masas con menores contenidos de agua correspondientes al diseño central compuesto).

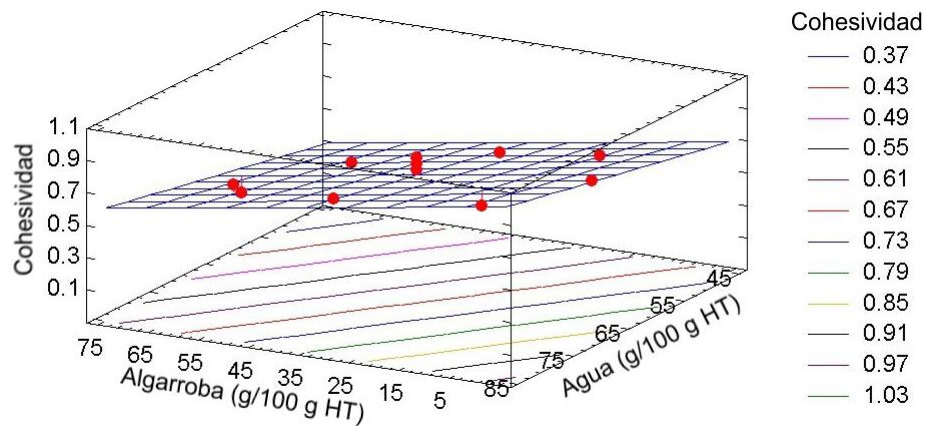


Figura 3.4. Superficie de respuesta obtenida para cohesividad de masa.

Como se observa en la Figura 3.5, la superficie de respuesta obtenida para el atributo elasticidad muestra que el incremento en el contenido de algarroba generó una disminución de la elasticidad de las masas (β_1 negativo), siendo más marcado el efecto en condiciones de defecto de agua. Para el caso de las masas con bajo contenido de algarroba, variaciones en el contenido de agua no produjeron cambios marcados en la elasticidad, por el contrario en las masas con más algarroba la elasticidad aumentó sensiblemente con la cantidad de agua. Siendo la elasticidad un parámetro ligado a un adecuado desarrollo de la red de gluten y teniendo en cuenta que la adición de algarroba puede interferir con el mismo, la cantidad de agua resultó crítica.

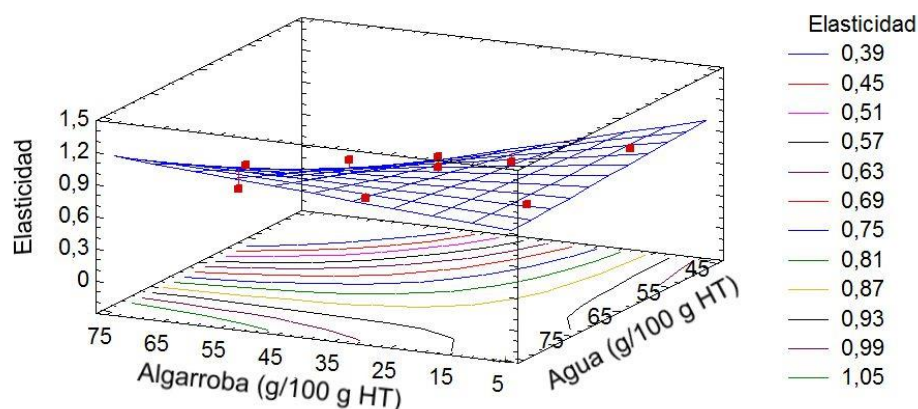


Figura 3.5. Superficie de respuesta obtenida para elasticidad de masa.

Dado que, como se mencionó anteriormente, se obtuvo falta de ajuste al intentar modelar los valores registrados para dureza y consistencia, se realizó un ANOVA para estudiar las diferencias entre los puntos experimentales del diseño central compuesto seleccionado. Las tendencias fueron las mismas para ambos parámetros. Para aquellas formulaciones con niveles altos de harina de algarroba y restricción de agua (muestras 3, 4 y 6), se observaron mayores valores de dureza y consistencia, al igual que para la formulación 7 que posee un nivel medio de algarroba y un muy bajo contenido de agua. Los resultados para dureza se muestran en la Figura 3.6.

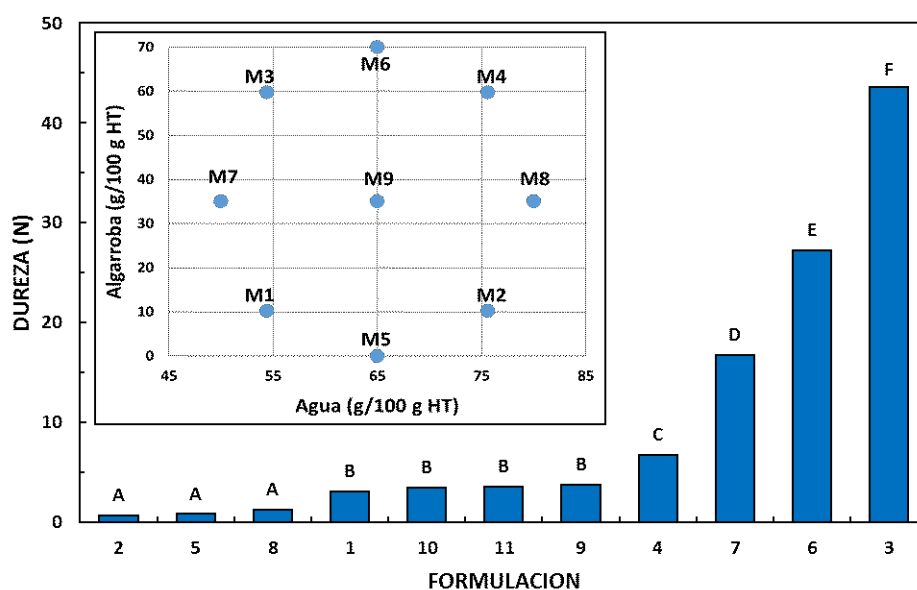


Figura 3.6. Valores de dureza (N) provenientes de las diferentes masas del DCC (imagen interior). Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

La masa control de harina de trigo (fuera del diseño central compuesto) exhibió los siguientes valores promedio (\pm DS) para los atributos texturales: dureza 1,283 (\pm 0,291) N; resiliencia 0,066 (\pm 0,004); cohesividad 0,790 (\pm 0,006); elasticidad 0,887 (\pm 0,013).

Si se toma como referencia para panificar la masa formulada solamente con harina de trigo (masa control), las masas compuestas que exhibieron baja dureza y resiliencia y niveles medios a altos de cohesividad y elasticidad deberían ser aptas para panificación. Las formulaciones ensayadas en el farinógrafo, con 15, 25 y 35% de sustitución de harina de trigo por harina de algarroba se corresponden con 17,65; 33,33 y 53,85 g de harina

de algarroba /100 g de harina de trigo, respectivamente. Teniendo en cuenta estos valores y las absorciones de agua farinográfica, que se corresponden con 66,2; 72,1 y 80,6 g de agua /100 g de harina de trigo para las mezclas con 15, 25 y 35% de reemplazo, se calcularon los valores de resiliencia, cohesividad y elasticidad aplicando cada modelo. En la muestra con el reemplazo de 15%, los valores de resiliencia, cohesividad y elasticidad calculados fueron 0,057; 0,742 y 0,890 respectivamente; con reemplazo del 25% los valores fueron 0,062; 0,707 y 0,868 respectivamente y en la masa con 35% de sustitución fueron 0,065; 0,668 y 0,976. Estos valores estimados se encuentran aceptablemente cerca de los de la masa control.

3.2.2.2. Estudios de relajación de las masas

Los ensayos de relajación de esfuerzo se llevaron a cabo sobre las masas formuladas a partir del diseño central compuesto descrito en 2.2.2.1.1. En la Figura 3.7 se pueden observar como ejemplo las gráficas obtenidas para las masas M1, M4 y M9 del diseño y la masa control de trigo.

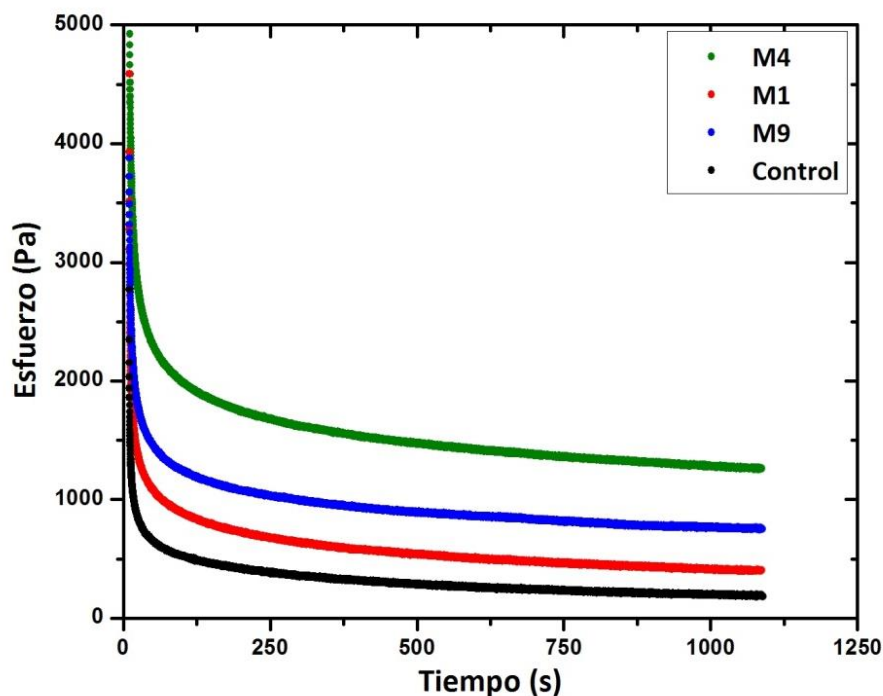


Figura 3.7. Curvas de relajación de esfuerzo obtenidas para masas las **M1**, **M4** y **M9** (correspondientes al DCC) y para la masa **control** de trigo elaborada con cantidad de agua farinográfica.

Las curvas resultantes se modelaron de acuerdo a la ecuación 2.18. Los coeficientes R^2 fueron mayores a 0,96 en todos los casos. Los parámetros de relajación de esfuerzo T_1 y T_2 variaron entre 240 y 372 s y entre 6,2 y 8,4 s, respectivamente. En cuanto al término de esfuerzo de equilibrio (σ_E), el mismo se mantuvo entre 90,73 y 7614,53 Pa para las diferentes formulaciones. Los esfuerzos de equilibrio más altos correspondieron a las masas con mayor contenido de harina de algarroba y menor contenido de agua. Campos, Steffe, & Ng (1997) relacionaron la mayor resistencia a la tensión en ensayos de relajación de esfuerzo con un menor desarrollo de la red de gluten en masas de trigo, situación que podría estar ocurriendo en el caso de las masas con algarroba y/o bajos contenidos de agua. Los mismos autores sugirieron que en masas no desarrolladas las proteínas fibrilares del trigo no estarían formando las estructuras laminares (características de una red de gluten bien desarrollada), sino que se encontrarían desorganizadas, conduciendo a una mayor fricción de unas con otras durante la deformación aplicada en el ensayo, incrementando así la mencionada resistencia a la tensión. Las masas compuestas trigo-algarroba podrían no tener un desarrollo adecuado de la red de gluten, como parecen mostrar los farinogramas, lo que generaría una situación análoga a la descrita por estos autores.

Valores mayores de T indican un decaimiento más lento durante la relajación del esfuerzo, que es típico de matrices viscoelásticas con un comportamiento más cercano al de un sólido (Correa, Añón, Pérez, & Ferrero, 2010). Los tiempos de relajación pequeños se asocian a la relajación de componentes de menor peso molecular, mientras que los tiempos mayores corresponden al fenómeno que involucra polímeros de alto peso molecular, que en el caso de las masas están directamente relacionados con la red de gluten (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003). En este trabajo de tesis, el parámetro T_1 sería el relacionado con la red proteica.

Al aplicar RSM para obtener los modelados de los parámetros, en el caso de σ_3 se obtuvo falta de ajuste, mientras que T_2 tuvo un ajuste deficiente ($R^2 = 0,48$). Por otro lado el tiempo de relajación T_1 se ajustó adecuadamente con un modelo lineal cuyos coeficientes se muestra en la Tabla 3.4. La superficie de respuesta correspondiente al tiempo de relajación T_1 , obtenida a partir del polinomio se muestra en la Figura 3.8.

Tabla 3.4. Factores correspondientes al modelado de T_1 .

	T_1
β_0	184,623
β_1	-1,34458
β_2	2,33494
β_{11}	-
β_{12}	-
β_{22}	-
R² ajustado	0,87
p-Falta de ajuste	0,2027

Subíndices: 1- Harina de algarroba, 2- Agua

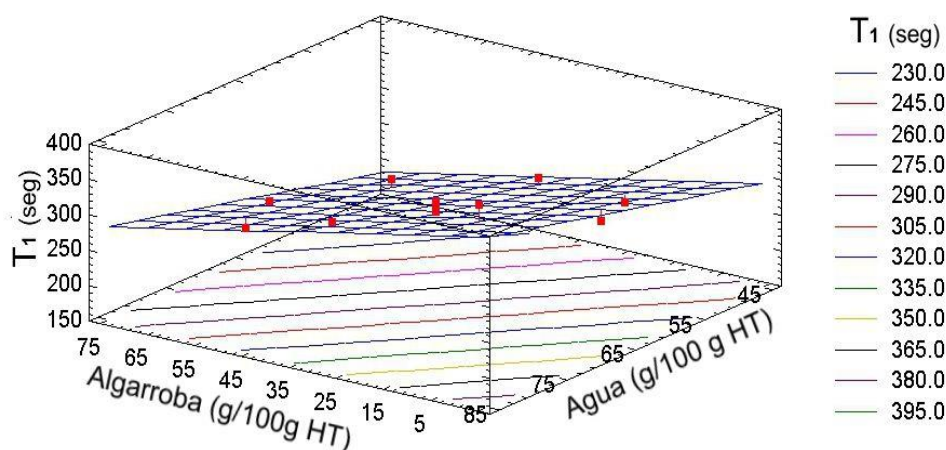


Figura 3.8. Superficie de respuesta obtenida para el tiempo de relajación de esfuerzo T_1 .

Las muestras con menor contenido de algarroba y mayor contenido de agua fueron las que evidenciaron mayores valores de T_1 . Este resultado puede asociarse con los valores obtenidos para los atributos texturales de cohesividad y elasticidad y podría estar relacionado con la formación de una matriz de gluten mejor estructurada. Así mismo puede inferirse que la presencia de altos niveles de algarroba y contenidos insuficientes de agua estaría impidiendo un adecuado desarrollo de dicha matriz.

3.2.3. Ensayos dinámicos en reómetro oscilatorio

Las mediciones viscoelásticas en el rango de viscoelasticidad lineal pueden otorgar información adicional sobre el comportamiento reológico de las muestras cuando no se produce ruptura de la estructura, es decir cuando las deformaciones aplicadas son muy pequeñas.

Se estudiaron las masas correspondientes al diseño central compuesto antes descrito. Las masas exhibieron un comportamiento viscoelástico en el rango de frecuencias ensayado, encontrándose el módulo elástico (G') por encima del viscoso (G'') en todo el rango. En la Figura 3.9 se muestran los espectros mecánicos para las formulaciones 1 y 4 del diseño, la última con mayor contenido de algarroba y de agua cada 100 g de harina de trigo. Se encontró una dependencia con la frecuencia para ambos módulos. Los resultados indican una prevalencia de las fuerzas elásticas por encima de las viscosas, que es característico de las masas, y el espectro de M4 se presentó por encima del de M1.

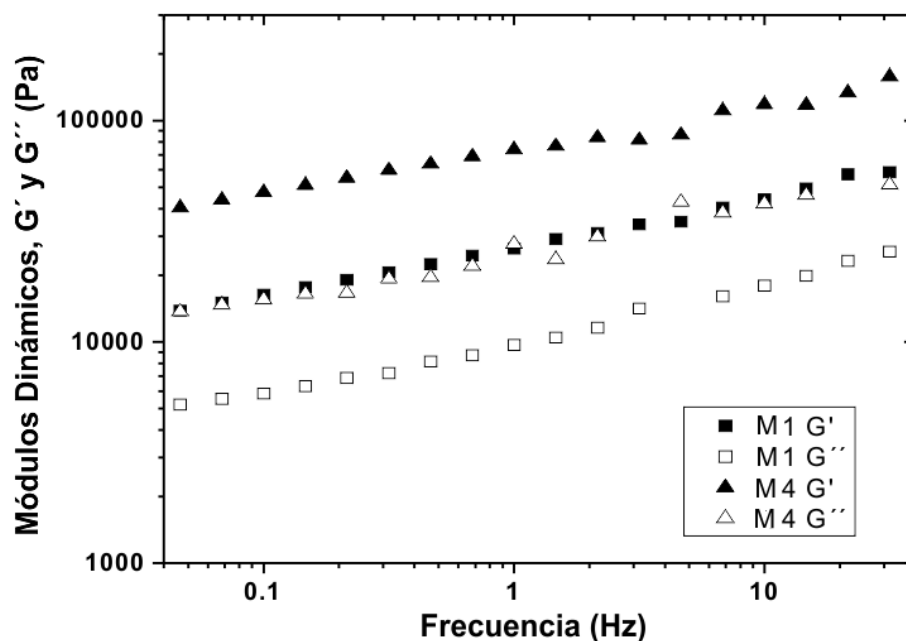


Figura 3.9. Espectros mecánicos obtenidos para las masas correspondientes a las formulaciones M1 y M4.

Los coeficientes de regresión para las expresiones polinómicas obtenidas para los módulos G' y el módulo complejo (G^*), medidos a 1 Hz se muestran en la Tabla 3.5. También se muestran los valores de R^2 ajustado y los valores de p para el test de falta de ajuste (nivel de confianza = 95%).

El módulo viscoso (G'') varió entre 6350 Pa (para M2) y 64295 Pa (para M6), pero el modelado evidenció falta de ajuste.

Tabla 3.5. Factores correspondientes al modelado de los módulos elástico y complejo.

	G'	G^*
β_0	241726	255446
β_1	6028,4	6458,8
β_2	-7337,4	-7782,7
β_{11}	25,7	27,0
β_{12}	-89,9	-96,4
β_{22}	59,2	63,1
R^2 ajustado	0,98	0,98
p-Falta de ajuste	0,0931	0,0950

Subíndices: 1- Harina de algarroba, 2- Agua

Como puede observarse en base a los coeficientes de la Tabla 3.5 y las superficies de respuesta obtenidas (Figura 3.10 y Figura 3.11), el aumento en la proporción de harina de algarroba incrementó los valores de G' y G^* (β_1 positivos), mientras que un efecto opuesto se verificó al incrementar la cantidad agua en las formulaciones (β_2 negativo). Dicho efecto resultó más pronunciado en las formulaciones con mayor nivel de harina de algarroba.

A pesar de que los ensayos dinámico-oscilatorios se llevaron a cabo en condiciones muy diferentes (sin ruptura estructural) a los ensayos de análisis de perfil de textura, las tendencias encontradas para los módulos dinámicos fueron similares a las encontradas para resiliencia.

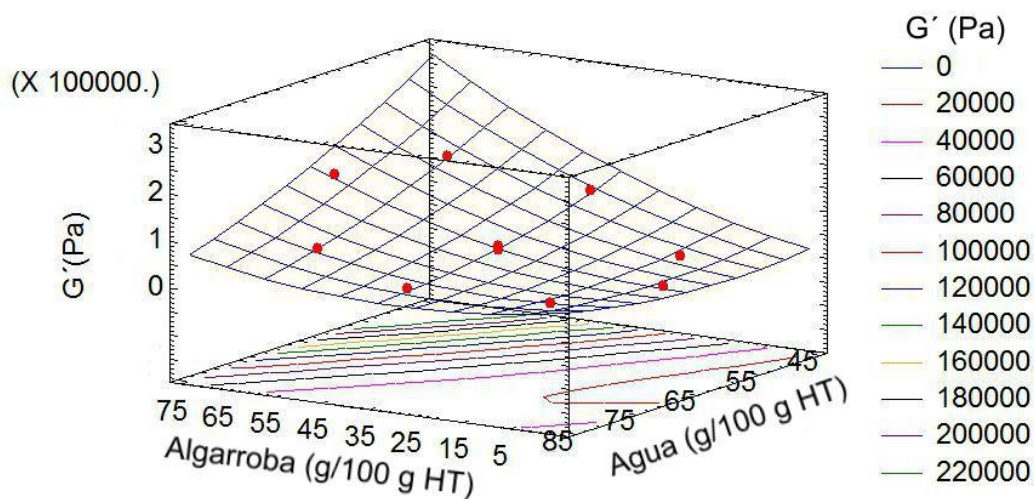


Figura 3.10. Superficie de respuesta obtenida para el módulo G' .

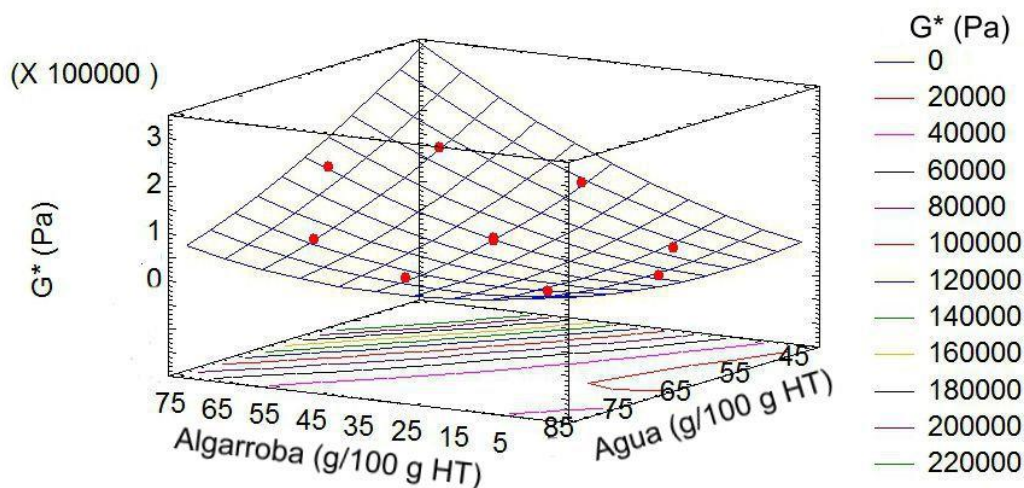


Figura 3.11. Superficie de respuesta obtenida para el módulo G^* .

3.3. Caracterización fisicoquímica y microestructural de las masas

3.3.1. Ensayos de relajación ^1H -RMN

Se estudió la movilidad molecular de las masas mediante ensayos de relajación ^1H spin-spin (T_2). Los protones son excitados por el lapso de milisegundos y al volver al estado fundamental emiten una señal pudiéndose registrar las curvas de decaimiento. El modelado exponencial permite obtener los tiempos de relajación que se asocian a la movilidad de las distintas poblaciones moleculares halladas. Tiempos de relajación más cortos corresponden a poblaciones moleculares con menor movilidad (estado tipo

sólido) mientras que tiempos más largos se asocian a poblaciones con mayor movilidad (estado tipo líquido).

En la Figura 3.12 se muestran las curvas típicas de decaimiento de intensidad de señal para las masas 2, 7 y 9 del diseño central compuesto que corresponden a las formulaciones con 10,25 g de algarroba y 75,65 g de agua; con 35 g de algarroba y 50 g de agua y con 35 g de algarroba y 65 g de agua cada 100 g de harina de trigo, respectivamente. En la misma se pueden apreciar cualitativamente las diferencias en el comportamiento de las masas con diferentes proporciones de harina de algarroba y de agua.

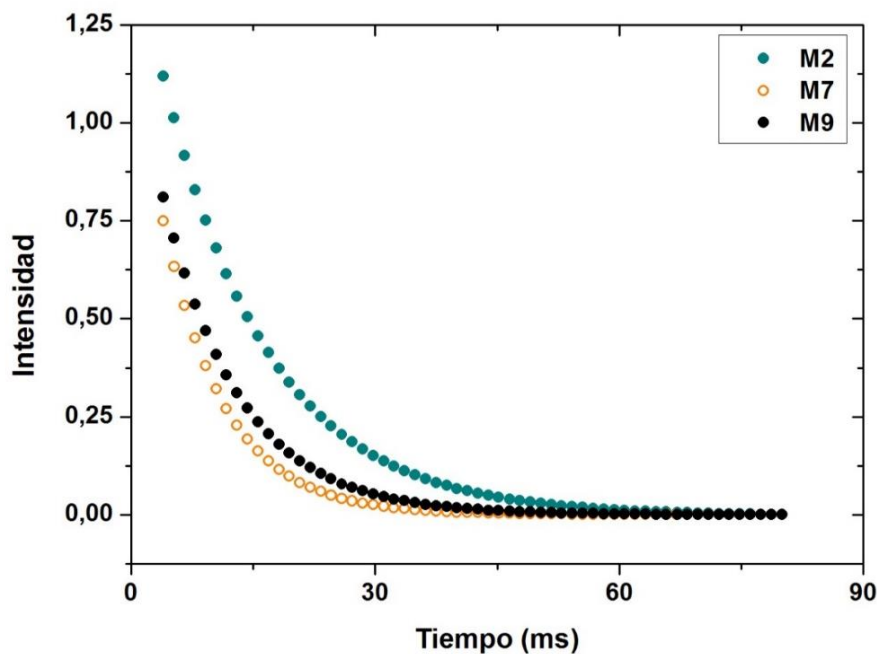


Figura 3.12. Curvas de relajación obtenidas para las masas **M2**, **M7** y **M9** del diseño.

Los ensayos revelaron que las muestras exhiben diferente movilidad molecular, como se ve reflejado por la constante λ (calculada a partir de la ecuación 2.30). La superficie de respuesta obtenida con los valores de λ para las muestras correspondientes al diseño central compuesto se muestra en la Figura 3.13 y los parámetros del modelo lineal que representan dicha superficie se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Factores correspondientes al modelado del tiempo de relajación spin-spin λ .

	λ
β_0	2,78807
β_1	-0,04845
β_2	0,14027
β_{11}	-
β_{12}	-
β_{22}	-
R² ajustado	0,86
p-Falta de ajuste	0,3009

Subíndices: 1- Harina de algarroba, 2- Agua

Un mayor tiempo de relajación (λ), que indica una mayor movilidad molecular, se puede relacionar en este caso una red proteica más flexible (Linlaud et al., 2011). Las masas con niveles más altos de algarroba mostraron menor movilidad, mientras que aquellas con los mayores contenidos de agua y los más bajos contenido de algarroba (masas M2, M5, M8) mostraron mayor movilidad. Salinas et al. (2012) informaron un descenso en los valores de λ al enriquecer harina de trigo con inulina (polímero de fructosa) en masas para panificación. Estas observaciones pueden asociarse a cambios en la distribución del agua en la matriz con la incorporación de fibra (proveniente de la algarroba en nuestro caso), pero además puede deberse a la presencia de una matriz polimérica más rígida para el caso de las masas con mayores contenidos de algarroba y menores cantidades de agua, que conduce a menores tiempos de relajación spin-spin (Lüsse & Arnold, 1998). Por el contrario, en un estudio de masas para panificación con reemplazo de harina de trigo por harina de algarrobo europeo (*Ceratonia siliqua L.*) y con contenido de agua optimizado por farinogramas, Salinas et al. (2015) informaron incrementos en los tiempos de relajación λ con el reemplazo, hecho que asociaron a las diferencias en la interacción del agua con los componentes de las harinas de trigo y de algarrobo europeo. Se puede deducir entonces que los tiempos de relajación λ resultan influenciados por el tipo de matriz y por la distribución del agua en el sistema, y que las tendencias en el caso de masas compuestas serán dependientes del tipo de harina que se utilice para el reemplazo.

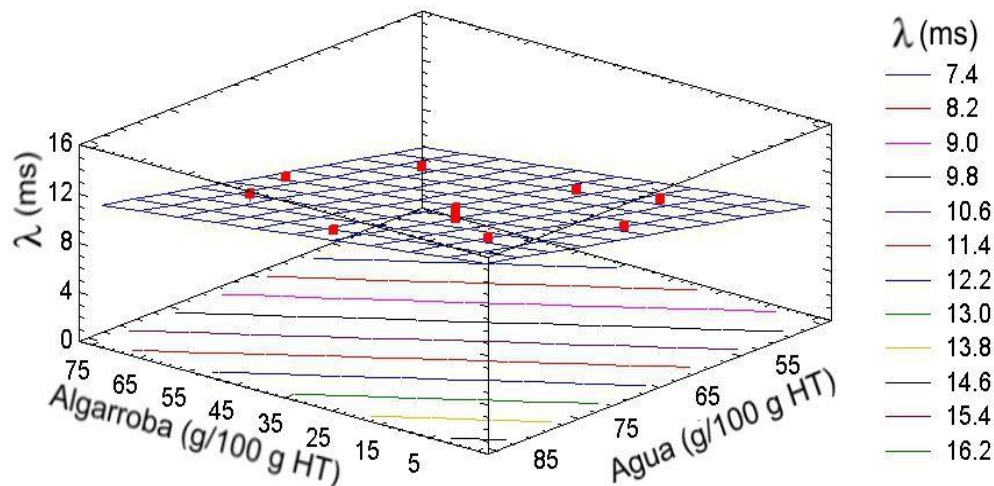


Figura 3.13. Superficie de respuesta obtenida para el tiempo de relajación λ (ms).

La superficie de respuesta obtenida para los valores de λ revela un comportamiento similar al observado en cohesividad y T_1 y una tendencia opuesta a la registrada para resiliencia.

Por lo expuesto hasta aquí se puede concluir que las masas con niveles medios a bajos de algarroba y niveles medios a altos de agua son las que presentaron mayor integridad entre sus componentes, un carácter viscoelástico más cercano al de un sólido, mayor flexibilidad y elasticidad y por lo tanto las mejores características para ser utilizadas en panificación. Teniendo en cuenta los requerimientos de la masa necesarios para obtener un producto final leudado de buena calidad con incorporación de harina de algarroba, es fundamental establecer adecuadamente el contenido de agua para la formulación.

3.3.2. Caracterización de las masas CSLM

Se estudiaron las masas compuestas obtenidas a partir de las formulaciones correspondientes al diseño central compuesto. Las micrografías obtenidas se pueden observar en la Figura 3.14.

Cuando la red de gluten está bien desarrollada, puede ser visualizada como una estructura filamentosa entrecruzada de color amarillo verdoso (Correa, Ferrer, Añón, & Ferrero, 2014). Este color es la consecuencia del efecto combinado de Rod B (color rojo), que es específico para las proteínas, y FITC (color verde), que tiñe las proteínas y el almidón. En las micrografías de masas compuestas trigo-algarroba pueden ser visualizadas estructuras aproximadamente globulares de color rojo, ubicadas

adyacentes y/o intercaladas a la red de gluten que presentan tamaños similares al de los gránulos de almidón; en algunos casos aparecen agrupadas entre sí. La afinidad de estas estructuras por la Rod B indica la presencia de proteínas. Así, estos cuerpos estarían conformados por proteínas probablemente unidas, en la mayoría de los casos, a otros componentes presentes en la harina de algarroba como fibra y polifenoles. La selectividad de la Rod B por proteína en sistemas complejos de proteína/polisacárido ya fue previamente informada por otros autores (Kim et al., 2008; Tromp, van de Velde, van Riel, & Paques, 2001; van de Velde, van Riel, & Tromp, 2002). Los gránulos de almidón se pueden distinguir como cuerpos redondeados, teñidos de verde que actúan como relleno de la matriz de gluten (Funami et al., 2008; Nagano, Tamaki, & Funami, 2008).

En las micrografías se pueden distinguir tres tipos de estructuras; 1) estructuras filamentosas con cierto grado de entrecruzamiento (M1, M4 y M9); 2) estructuras más o menos agregadas, con un pobre desarrollo de la red (M3, M6, M7 y M8) y 3) redes más groseras con filamentos gruesos (M2 y M5). Para la comparación con los resultados farinográficos, donde las muestras fueron referidas a 100 g de mezcla de harinas de trigo y algarroba, la masa con 25% de sustitución puede cotejarse con las micrografías obtenidas para M7, M8 y M9 (correspondientes a una sustitución de 25,9% y diferentes cantidades de agua). La muestra M7 corresponde a una masa con 37 g de agua cada 100 g de mezcla de trigo-algarroba y M9 corresponde a 48 g de agua cada 100 g de mezcla de trigo-algarroba; ambas muestras tienen una deficiencia de agua en comparación con la absorción de agua farinográfica para 25% de reemplazo (54,1%, Tabla 3.2). Por otra parte, M8 corresponde a 59 g de agua cada 100 g de mezcla de harina, lo que indica que se encuentra en una condición de exceso de agua. La muestra M9 mostró una red filamentosa debido quizá a que su deficiencia en agua no es crítica, con un valor relativamente cercano al óptimo farinográfico, pero las muestras M7 y M8 exhibieron un aspecto más desorganizado y agregado, posiblemente indicando un pobre desarrollo de la red en el primer caso por falta de agua y una red demasiado hidratada en el segundo (exceso de agua). Estos resultados sugieren que a valores cercanos al nivel de agua óptimo para el desarrollo de la matriz de gluten (a igual contenido de algarroba), resulta más desestabilizante un exceso que un pequeño defecto en el contenido de agua de la masa. Este mismo efecto se puede observar comparando las muestras M1 y M2

cuyo equivalente de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba es de 9,3%. Para las muestras M3 y M4 el reemplazo equivale a 37,4% y para M6 a 41,2% de reemplazo.

Las muestras M1 y M4, como M9, exhibieron una red más filamentosa. Ambos, M1 y M4, tuvieron contenidos de agua (47,3 y 49,3 g /100 g de la mezcla, respectivamente) no muy lejanos a los valores óptimos, según los ensayos de absorción farinográfica para reemplazos de harina de 15 y 35% respectivamente. Sin embargo, el mayor contenido de harina de algarroba en M4 condujo a una red más desorganizada y agregada que en M1. Las muestras M3 y M6, como M7, tenían un contenido deficitario de agua (por debajo de 40 g /100 g mezcla de harinas) y exhibieron una estructura agregada.

En las masas M2 y M5 se observa un exceso en el contenido de agua. La muestra M5 corresponde a una masa sin agregado de algarroba, pero su contenido de agua fue muy superior (65 g /100 g harina) al de la masa control preparada con el nivel óptimo según farinograma (59 g /100 g harina). La muestra M2 también tuvo exceso de agua con un valor un poco superior al de M5 (69 g /100 g mezcla). En ambas masas se observaron estructuras con fibras gruesas, poco entrecruzadas.

Estos resultados indican que la cantidad relativa de algarroba y de agua están influyendo en la estructura de la red de gluten. Una primera conclusión es que, en presencia de algarroba, la cantidad de agua es crítica, probablemente porque cambia la distribución de la misma entre los distintos componentes de la masa, en comparación con una masa de harina de trigo. Además, debe tenerse en cuenta la probable interacción de componentes de la algarroba (como fibra, proteínas, glúcidos de bajo peso molecular) con las proteínas del gluten. Las proteínas de algarroba, posiblemente de naturaleza globular por tratarse de una leguminosa, resultaron de muy difícil extracción a partir de la harina, lo que estaría confirmando una fuerte interacción con otros componentes. Este hecho sumado a las características observadas en las micrografías indica que probablemente una gran proporción de las proteínas de algarroba esté formando parte de partículas insolubles, dispersas en la masa e imposibilitadas de captar agua, lo que impediría la formación de estructuras gelificadas o combinadas (proteína de algarroba + proteína de trigo) que contribuyan a estabilizar la matriz de gluten.

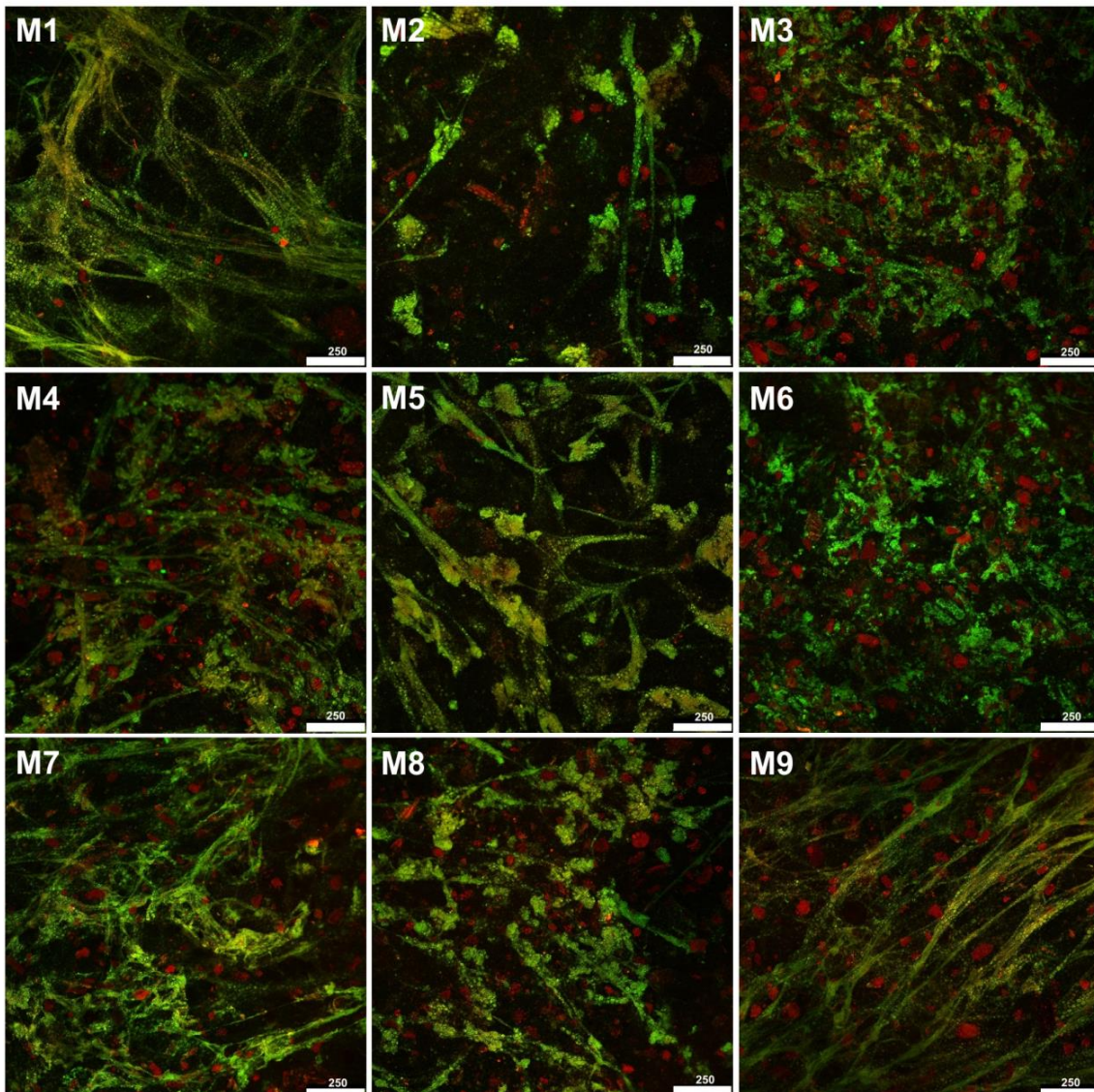


Figura 3.14. Micrografías obtenidas por CSLM (10x) para las masas trigo-algarroba correspondientes al diseño central compuesto (Tabla 2.1). Composición de cada mezcla (g de harina de algarroba cada 100 g de harina de trigo / g de agua cada 100 g de harina de trigo): **M1** (10,25/54,39); **M2** (10,25/75,61); **M3** (59,75/54,39); **M4** (59,75/75,61); **M5** (0/65); **M6** (70/65); **M7** (35/50); **M8** (35/80); **M9** (35/65).

Barra = 250 µm.

Respecto al rol de la fibra, Nawrocka, Szymańska-Chargot, Miś, Kowalski, & Gruszecki (2016) estudiaron a través de espectroscopía Raman el efecto de distintas fibras (de cacao, zanahoria, algarrobo europeo, avena, aronia, arándano, lino) sobre la red de gluten y encontraron que éstas inducían un cambio conformacional, disminuyendo la estructura de α -hélice con un incremento simultáneo de la conformación hoja plegada β -antiparalela. Los autores atribuyeron a este cambio conformacional la agregación o plegamiento anormal de las proteínas y señalaron como principales componentes que inciden en estos cambios a la celulosa y pectinas, dependiendo además del origen de la fibra. Bock & Damodaran (2013) realizaron ensayos similares pero con agregado de salvado de trigo como fuente de fibra. Estos autores informaron una reducción de la conformación de giros- β y el incremento de agregados intermoleculares de conformación hoja plegada- β . Sciammaro (2015) ha informado que del 25,1% de fibra dietaria total de muestras de harina de algarrobo por él analizada, el 20,9% era insoluble por lo que el 16% de la fibra total constituye fibra soluble. Entonces, si se asume que al menos parte de la fibra de algarroba se puede solubilizar, los cambios conformacionales que podrían ser inducidos por ella explicarían la agregación del gluten observada en las micrografías en presencia de altos contenidos de algarroba, en particular cuando el agua es deficitaria como es el caso de las muestras M3 y M6.

Los azúcares de bajo peso molecular como la sacarosa pueden interferir en la formación de la red de gluten cuando se encuentran en alta proporción (como en las galletitas tipo cookies). Pareyt, Brus, & Delcour (2009) informaron que la elasticidad de la masa era inversamente proporcional al contenido de sacarosa en el rango estudiado (21,9-31,2%). Teniendo en cuenta que los contenidos de sacarosa para harinas de *Prosopis alba* informados en literatura son cercanos al 40% (Cardozo et al., 2010; Sciammaro et al., 2015), puede estimarse que las masas trigo-algarroba correspondientes al diseño central compuesto (de las que se obtuvieron las micrografías) presentarían contenidos de sacarosa, aportados por la algarroba, del orden de 2-11%. Esto indica que estamos ante una presencia relativamente baja de azúcares, que no han impedido el desarrollo de la red pero, sumado a otros componentes solubles y que captan agua pueden afectar al gluten.

Tolstoguzov (1997) ha sugerido que en la masa de harina de trigo coexisten dos fases que contienen proteínas, por un lado la fase viscoelástica, de proteína concentrada que

contiene las gliadinas y gluteninas (gluten) y el almidón. Por otro, una fase viscosa que es una solución de albúminas, globulinas y polisacáridos neutros y cargados (almidón soluble, pentosanos). Este autor ha sugerido que el gluten no es un complejo proteico sino más bien una estructura tipo gel de proteína altamente concentrada que además incluye al almidón. La segunda fase con proteínas solubles y polisacáridos puede ser tratada como una fase “líquida”. La disolución de componentes en la fase “líquida” produce un medio en donde el gluten tiene reducida su hidratación y por lo tanto se promueven las interacciones hidrofóbicas conduciendo a agregados dentro de la fase “gel”.

En el caso de las masas compuestas trigo-algarroba estudiadas en este trabajo se puede postular que las partículas de harina de algarroba, ricas en fibra insoluble y proteína, podrían estar dispersas en la fase tipo “gel” (como los gránulos de almidón), mientras que la fase líquida contendría los componentes que se han podido solubilizar, como por ejemplo azúcares y fibra soluble. Estos componentes solubilizados podrían explicar de acuerdo a la teoría de Tolstoguzov (1997), la agregación observada.

3.3.3. Comportamiento térmico de las masas por DSC

La gelatinización afecta la estructura nativa de los gránulos de almidón, produciendo la pérdida de cristalinidad y aumentando varias veces su volumen. La masa panaria es un sistema de humedad intermedia, y por lo tanto, la gelatinización se encuentra relativamente restringida. Esta restricción se traduce en un desdoblamiento del pico de gelatinización en los termogramas como fuera informado por otros autores (Correa & Ferrero, 2015).

En la Figura 3.15 se muestran los termogramas típicos obtenidos para las masas control y con 15, 25 y 35% de harina de algarroba. En la misma se pueden observar los picos correspondientes a: la fusión de la margarina (M), pico ancho y de un área pequeña alrededor de los 50°C; el pico desdoblado correspondiente a la gelatinización del almidón (I y II) entre los 60 y los 100°C; y el pico correspondiente al complejo amilosa-lípido (III) cercano a los 120°C. No se evidenciaron picos con áreas cuantificables correspondientes a la harina de algarroba. Ensayos testigo hechos con harina de

algarroba y agua en iguales proporciones mostraron solo una leve curvatura de la línea de base entre 40 y 60°C.

Los valores promedio de las temperaturas y entalpías de gelatinización (ΔH_G) calculados para las masas control y compuestas (trigo-algarroba) preparadas con los valores de agua farinográfica se muestran en la Tabla 3.6. Se puede observar en la figura y en la tabla, que la incorporación de algarroba a la masa condujo a valores significativamente mayores de la temperatura inicial (T_0) y de la temperatura del primer pico (T_1), pero las temperaturas finales (T_F) no se vieron afectadas, indicando que la harina de algarroba ejerce un efecto de retardo de la gelatinización del almidón.

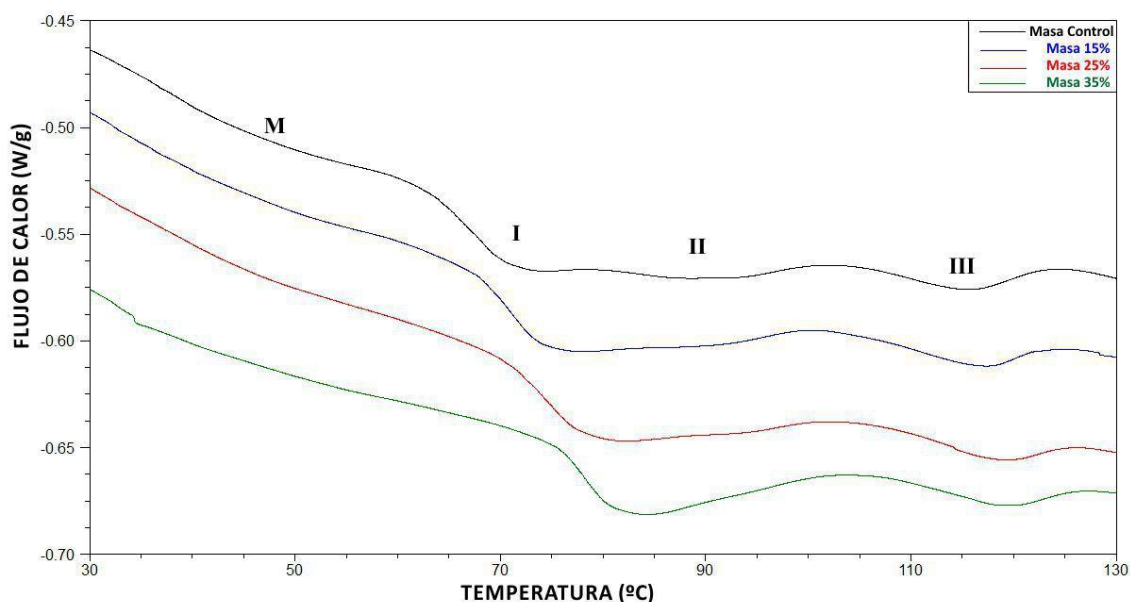


Figura 3.15. Termogramas típicos obtenidos para las masas Control y con 15, 25 y 35% de reemplazo con harina de algarroba.

Sin embargo, esta harina no provocó cambios sustanciales en la temperatura de fusión del complejo amilosa-lípido. Las entalpías calculadas por gramo de almidón se vieron incrementadas significativamente por la adición de algarroba a la formulación, en tanto que las diferencias entre las tres formulaciones con algarroba no fueron significativas. Probablemente estos efectos se deban a una combinación de factores, la presencia de azúcares de bajo peso molecular y de fibra (polisacáridos de alto peso molecular) propios de la harina (Sciammaro et al., 2015). En menor proporción que los mencionados componentes, la presencia de las proteínas propias del algarrobo y de

trigo, que forman parte del entorno del gránulo podrían estar afectando sus propiedades térmicas ya que por ejemplo, son capaces de ligar agua.

Tabla 3.6. Parámetros calculados por DSC de las masas compuestas.

Formulación	T ₀	T _I	T _{II}	T _F	ΔH _G (J/g almidón)
0%	63,57±0,06 ^a	70,87±0,04 ^a	90,59±0,30 ^a	102,18±0,56 ^a	9,24±0,70 ^a
15%	67,12±0,20 ^b	74,25±0,12 ^b	91,69±0,28 ^a	101,19±0,70 ^a	11,01±0,56 ^b
25%	70,18±0,11 ^c	78,54±0,23 ^c	94,09±0,67 ^b	102,40±1,06 ^a	10,99±0,29 ^b
35%	74,71±0,31 ^d	81,63±0,29 ^d	ND	102,51±0,97 ^a	10,33±0,41 ^b

Promedios ± DS; * g de almidón; ND = no determinado. Las letras indican diferencias significativas entre las formulaciones (p<0,05).

En concordancia con los resultados del presente trabajo, otros autores también han informado incrementos en la temperatura de gelatinización en presencia de otros componentes. Hosney & Rogers (1990) indicaron que la presencia de azúcares incrementa la temperatura de gelatinización del almidón, pero a la vez reduce el rango de temperaturas a las que ésta se produce. Ferrero & Zaritzky (2000) informaron corrimientos a valores más altos de la temperatura de gelatinización en sistemas con sacarosa e hidrocoloides (polisacáridos de alto peso molecular). Por otro lado, Santos, Rosell, & Collar (2008) estudiaron el efecto del reemplazo de harina de trigo por fibra dietaria (entre 6-34%) de diferentes fuentes sobre la gelatinización de almidón en mezclas de harina y agua, encontrando en general incrementos en las temperaturas de gelatinización con la incorporación de fibra, que atribuyeron principalmente a la falta de disponibilidad del agua para el proceso de gelatinización.

Las causas de este efecto han sido motivo de diversos estudios ya que la gelatinización es en sí un proceso complejo. En particular hay numerosos estudios sobre el efecto de los azúcares de bajo peso molecular. Según Perry & Donald (2002) la combinación de solvente y plastificación térmica inducen, en una primera etapa a un aumento del orden, la asociación lamelar y cristalización dentro del gránulo. Un mayor aporte de energía aumenta la movilidad de modo que se produce un desarreglo en la estructura lamelar del gránulo y pérdida de cristalinidad conduciendo a una pasta amorfa que se

transforma en un gel al enfriarse. Es un hecho informado en la literatura que la adición de azúcares eleva la temperatura de gelatinización. De acuerdo a Slade & Levine (1989) los azúcares y otros polioles actúan como plastificantes del gránulo pero con menor eficiencia que el agua por lo que se requiere de mayor energía (corrimiento a temperaturas más altas) para que la gelatinización ocurra. Perry & Donald (2002) observaron que a medida que se aumentaba la concentración de azúcares de bajo peso molecular se incrementaba la temperatura de gelatinización (de pico), sin embargo no encontraron diferencias en la temperatura de gelatinización ni la entalpía relacionadas con la relación almidón-soluto (glucosa, sacarosa, glicerol). Sólo la concentración global del soluto determinaba la temperatura de gelatinización. Estos solutos, como el agua, facilitaban el proceso de gelatinización, es decir, son plastificantes pero en el proceso de gelatinización se verificaba un corrimiento a mayores temperaturas. Un hecho importante es que no se observaron alteraciones en el mecanismo del proceso a nivel de microestructura, que fue analizado por estos autores utilizando difracción de rayos X. Esto indicaría que el efecto de los azúcares no es por la sola disminución en la disponibilidad de agua o por acción directa sobre las cadenas de amilosa o amilopectina estabilizando el gránulo. La elevación de la temperatura estaría causada no por interacciones específicas sino por variaciones en las propiedades cinéticas y termodinámicas no específicas, que afectarían la capacidad del gránulo para hidratarse. Respecto a la entalpía de gelatinización Chantaro & Pongsawatmanit (2010) observaron un aumento de la misma en sistemas de almidón de mandioca con sacarosa, cuando se llevaba la concentración del azúcar a un 30%. Sopade, Halley, & Junming (2004) observaron también un incremento de la entalpía con el agregado de fructosa o glucosa a sistemas de almidón de trigo con concentraciones de azúcar oscilando entre 0,26–0,86 g/g almidón seco. En cuanto a las modificaciones sobre las entalpías de gelatinización (incrementos y descensos) observadas con la presencia de fibra en el sistema, Santos et al. (2008) indicaron una dependencia con el tipo de fibra utilizada. Los resultados en literatura respecto a la entalpía son controversiales. Algunos estudios han informado su aumento, decrecimiento o que la misma no es afectada. Según Sopade et al. (2004) la entalpía de gelatinización es la resultante de la ruptura y formación de uniones puente de hidrógeno durante el proceso, por lo que es esperable que el entorno del gránulo (agua, solutos) la influencie.

Las modificaciones observadas en los termogramas con el reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba estarían siendo el resultado de una modificación en la distribución del agua con la incorporación de los componentes de la algarroba (principalmente fibra dietaria y glúcidos de bajo peso molecular) aunque no se puede excluir la interacción que pueda ocurrir entre estos nuevos componentes y el almidón en el sistema.

CONCLUSIONES PARCIALES

La harina de algarroba, hasta cierto nivel, no fue un impedimento para la formación de la red de gluten en una masa panaria, sin embargo, el alto contenido de fibra en la harina de algarroba estaría conduciendo a cambios en los atributos texturales de la masa, probablemente como consecuencia de un desarrollo deficiente de la red de gluten.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) demostró ser una herramienta útil para analizar el efecto sobre el comportamiento reológico de masas formuladas con diferentes cantidades de harina de algarroba y de agua. Se pudo constatar que los niveles más altos de adición de harina de algarroba llevaron a masas con una mayor consistencia y valores más altos en los módulos dinámicos, además de disminuciones en la cohesividad, que sugirió una disrupción en la estructura de la red de gluten.

La cantidad de agua resulta un parámetro crítico en la obtención de masas compuestas trigo-algarroba con características adecuadas para panificación y en este sentido el ensayo con farinógrafo sigue siendo una metodología útil para la determinación de los niveles de agua óptima.

Desde un punto de vista microestructural, la dilución de la red de gluten, la presencia de otros componentes de la algarroba, en particular el alto contenido de fibra dietaria de dicha harina, pueden conducir al desarrollo de una red deficiente.

La formación de una estructura agregada y con menor movilidad molecular, indicativo de una matriz menos flexible, se relaciona con el comportamiento reológico de las masas, sobre todo cuando el nivel de agua de las mismas no está adecuadamente ajustado y el contenido de harina de algarroba es alto.

La presencia de algarroba en la masa condujo a incrementos en las temperaturas de inicio de la gelatinización e incrementó la entalpía de gelatinización para las masas.

Los cambios en las propiedades reológicas y térmicas de las masas por la presencia de los componentes de la algarroba, es esperable que conduzcan a productos con características propias y diferenciales respecto al pan de trigo; cuyo estudio se desarrolla en el siguiente capítulo.

CAPITULO IV

**ELABORACION Y CARACTERIZACION DE
PANES A BASE DE HARINAS DE TRIGO Y
ALGARROBA**

4.1. Comportamiento de las masas durante el leudado

Se realizaron las curvas de fermentación de las masas correspondientes al diseño de reemplazo de harina descrito en 2.2.2.1.1 para determinar el tiempo óptimo de fermentación.

En la Figura 4.1 se grafican las curvas medidas experimentalmente (incremento de volumen en función del tiempo), junto a sus modelados por la ecuación de Boltzmann (Ec. 2.32, líneas rojas) para las masas control y con 15, 25 y 35% de reemplazo. El R^2 ajustado resultó mayor a 0,99 para todos los casos.

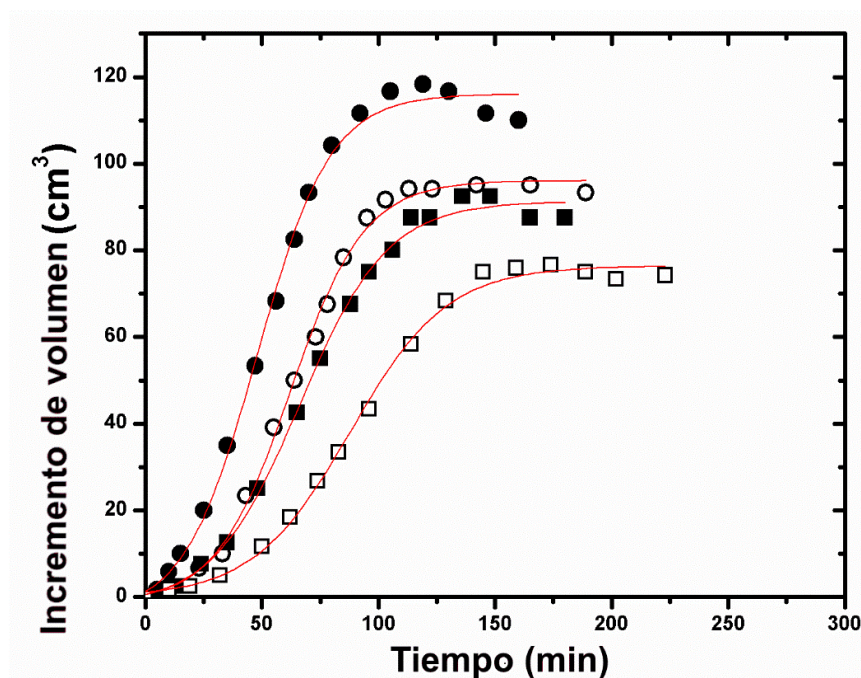


Figura 4.1. Curvas de fermentación para las masas control (●) y con 15% (○), 25% (■) y 35% (□) de reemplazo de harina. Las líneas rojas corresponden a los modelados obtenidos por la ecuación de Boltzmann (Ec. 2.32) para cada masa.

El máximo incremento de volumen (A_2) en la masa control fue de $109,7 \pm 6,5 \text{ cm}^3$, mientras que el tiempo óptimo de fermentación calculado (tiempo para alcanzar un 75% del máximo volumen) fue de $62 \pm 3 \text{ min}$.

En la Figura 4.1 se puede apreciar como la incorporación de harina de algarroba en la formulación generó una disminución en el valor A_2 y aumentó el tiempo óptimo de fermentación. Los valores obtenidos para las diferentes formulaciones se detallan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Máximo incremento de volumen (A_2) y tiempo óptimo de fermentación para las masas control y compuestas trigo-algarroba.

	A_2 (cm ³)	Tiempo óptimo (min)
Control	109,7 ± 6,5 ^b	62,0 ± 3,0 ^a
15%	95,1 ± 0,2 ^b	76,0 ± 3,0 ^b
25%	93,8 ± 5,7 ^b	87,5 ± 2,5 ^c
35%	72,2 ± 4,3 ^a	109,0 ± 1,0 ^d

Promedios ± DS. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0,05$).

Puede observarse el incremento en los tiempos óptimos de fermentación y la disminución en la expansión (aunque no significativa para las formulaciones con 15 y 25% de reemplazo) de la masa durante el leudado con el incremento en el contenido de harina de algarroba en la formulación. Estos resultados pueden estar relacionados con los cambios reológicos en la matriz de la masa: incremento de la consistencia y disminución de la cohesividad, descritos en el capítulo anterior. La harina de algarroba enriquece la formulación con fibra pero al mismo tiempo genera un efecto de “dilución” en el contenido de gluten y modifica las características de la red, como se vio a través de los ensayos microscópicos. Estos cambios son los que inhibirían la libre expansión de la masa durante esta etapa. En este sentido Wang et al. (2002) informaron aumentos en la resistencia a la expansión de la masa con la incorporación de diferentes tipos de fibra (inulina, fibra de algarrobo europeo y fibra de guisantes) a la formulación. Salinas et al. (2012) comunicaron que la adición de inulina a la harina de trigo dio lugar a masas con una mayor consistencia y cohesividad reducida. También se han informado efectos adversos para otras masas compuestas con harinas o aislados de leguminosas en reemplazo parcial de harina de trigo; la harina de soja y los aislados de proteína de soja fueron desfavorables para la formación de la red de gluten, afectando negativamente la extensibilidad de la masa y la capacidad de retención de gas en masas compuestas (Ribotta et al., 2005).

En conclusión, las reducciones en la expansión de la masa con altas concentraciones de algarroba y el incremento en el tiempo de fermentación durante el leudado pueden asociarse a la formación de una matriz de gluten de menor calidad como consecuencia

de la incorporación de los componentes de dicha harina (principalmente azúcares de bajo peso molecular, fibra y proteínas diferentes a las del gluten) que estarían interfiriendo con un adecuado desarrollo de la matriz.

4.2. Evaluación de la calidad panadera

4.2.1. Volumen específico de los panes

Los resultados obtenidos en volumen específico para los panes obtenidos con las diferentes formulaciones se muestran en la Figura 4.2.

El reemplazo parcial de harina de trigo con harina de algarroba generó un descenso significativo en el volumen específico (VE) de los panes. El valor promedio (\pm DS) obtenido para el pan control fue $3,85 \pm 0,13$ cm³/g. El reemplazo de harina de trigo con 15, 25 y 35% de harina de algarroba condujo a menores valores de VE: $3,37 \pm 0,13$; $3,00 \pm 0,20$ y $2,46 \pm 0,14$ cm³/g, respectivamente. Es decir que la reducción del volumen específico con el reemplazo de harina fue de 12,47; 22,08 y 36,10% respecto al pan control.

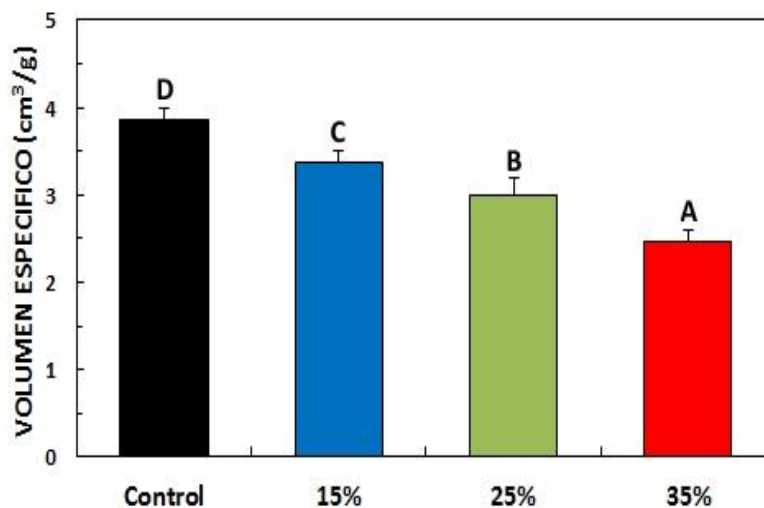


Figura 4.2. Volumen específico de los panes control y con 15, 25 y 35% de reemplazo de harina de trigo. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La reducción significativa en VE con el aumento en la proporción de algarroba se puede relacionar directamente con la menor expansión de la masa durante el leudado (Figura 4.1). Debe tenerse en cuenta que aunque las diferencias no llegaron a ser significativas

durante la etapa de leudado en la fermentadora para las masas con 15 y 25% de reemplazo respecto al control, el leudado continúa en los primeros minutos del horneado (hasta la inactivación de las levaduras), y por ello las diferencias de volumen se acentúan en el producto terminado.

Numerosos autores han mencionado el efecto negativo que provoca la adición de harinas diferentes a la de trigo, aislados proteicos o fibra en el VE de pan. Entre ellos pueden citarse los estudios de Fenn et al. (2010) y Ribotta et al. (2005) al incorporar productos de soja, Mohammed et al. (2012) en panificados con harina de garbanzo y Katina (2003) en panificados enriquecidos con diferentes fuentes de fibra. Por otra parte, en panificados con incorporación de harinas de algarrobo europeo Salinas et al. (2015) hallaron una mayor reducción en el volumen de los panes cuando se incorporó harina de pulpa (con un contenido de fibra dietaria superior al 45%) respecto a los panes con incorporación de harina de germen (rica en proteínas) de dicha leguminosa, hecho que permite inferir que el detrimento en la calidad del producto es mayor con la incorporación de ciertos componentes (fibra) por sobre a otros.

Los autores antes mencionados coincidieron en atribuir las pérdidas de volumen principalmente a la dilución de las proteínas de gluten y/o a la disrupción de la red de gluten ocasionada por los nuevos componentes.

4.2.2. Color de miga y corteza

El color es uno de los atributos más importantes del pan. La harina de algarroba influyó significativamente en el color final de la miga y de la corteza, generando panes con un aspecto totalmente diferente al del pan de trigo. El desarrollo del color se puede atribuir al color intrínseco de la harina de algarroba (más oscuro que el de la harina de trigo), y a la ocurrencia de la reacción de Maillard durante el horneado, que se ve favorecida por la composición de la harina de algarroba (presencia de azúcares libres y proteínas).

Los valores medidos de los parámetros L^* , a^* y b^* se resumen en la Tabla 4.2. Se encontraron diferencias significativas tanto en el color de la corteza como en el color de la miga entre las formulaciones de pan.

Tabla 4.2. Parámetros de color obtenidos para corteza y miga de los panes control y compuestos trigo-algarroba.

		Control	15%	25%	35%	
Corteza	Color	L*	77,37 ±1,28 ^d	56,27 ±0,83 ^c	49,30 ±0,41 ^b	45,46 ±0,41 ^a
	de	a*	1,50 ±0,51 ^a	8,66 ±0,28 ^c	8,24 ±0,57 ^c	6,75 ±0,11 ^b
		b*	21,64 ±1,28 ^d	17,26 ±1,06 ^c	11,95 ±1,54 ^b	6,44 ±0,27 ^a
Miga	Color	L*	72,93 ±2,00 ^c	59,04 ±1,76 ^b	56,94 ±1,14 ^a	55,34 ±0,64 ^a
	de	a*	-1,10 ±0,11 ^a	2,57 ±0,16 ^b	4,01 ±0,07 ^c	5,26 ±0,10 ^d
		b*	14,41 ±0,21 ^c	12,16 ±0,49 ^a	13,22 ±0,33 ^b	14,01 ±0,41 ^c

Valores promedio ±DS. Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0,05$).

En la corteza, la luminosidad y el parámetro b* disminuyeron progresivamente al aumentar la proporción de algarroba, mientras que el parámetro a* aumentó en los panes con algarroba respecto al control, pero las diferencias no fueron significativas entre los panes con 15 y 25% de reemplazo de harina.

En la miga se observaron tendencias similares, con disminución en los parámetros L* y b* y el incremento de a* con la incorporación de la harina de algarroba. Sin embargo las diferencias de color entre las migas provenientes de los panes con diferente grado de reemplazo no fueron tan marcadas como las observadas en el color de corteza.

Por lo expuesto se resume que el incremento en la proporción de harina de algarroba dio lugar a migas y cortezas más oscuras y con coloraciones más rojizas y/o amarronadas.

4.2.3. Calidad estructural de la miga

En la Figura 4.3 se puede observar la estructura de la miga de los panes obtenidos a partir de las diferentes formulaciones trigo-algarroba. También se puede apreciar el oscurecimiento de la miga descrito anteriormente (Ítem 4.2.2).

Al incrementar la proporción de harina de algarroba se obtuvieron migas más compactas y menos esponjosas, hecho relacionado con la disminución del volumen específico de los panes al incrementarse el contenido de algarroba.

Mediante el análisis del alveolado descrito en el ítem 2.2.3.2.2.4 se obtuvieron las distribuciones de tamaño de los alvéolos para cada formulación de pan (histogramas en la Figura 4.3). Como era de esperarse, la frecuencia relativa de alvéolos más pequeños (<4 mm²) fue mayor (89,7 a 90,9%) en los panes con 25 y 35% de harina de algarrobo que en el pan de control (85,8%). Al mismo tiempo, la frecuencia de alvéolos de mayor tamaño (>4 mm²) disminuyó con la incorporación de la harina de algarroba, variando desde 14,2% para el pan control hasta 10,3% para el pan con 35% de harina de algarroba. Otras propiedades del alveolado como la densidad alveolar, tamaño promedio, área ocupada por alveolos y la circularidad de los alveolos, se resumen en la Tabla 4.3.

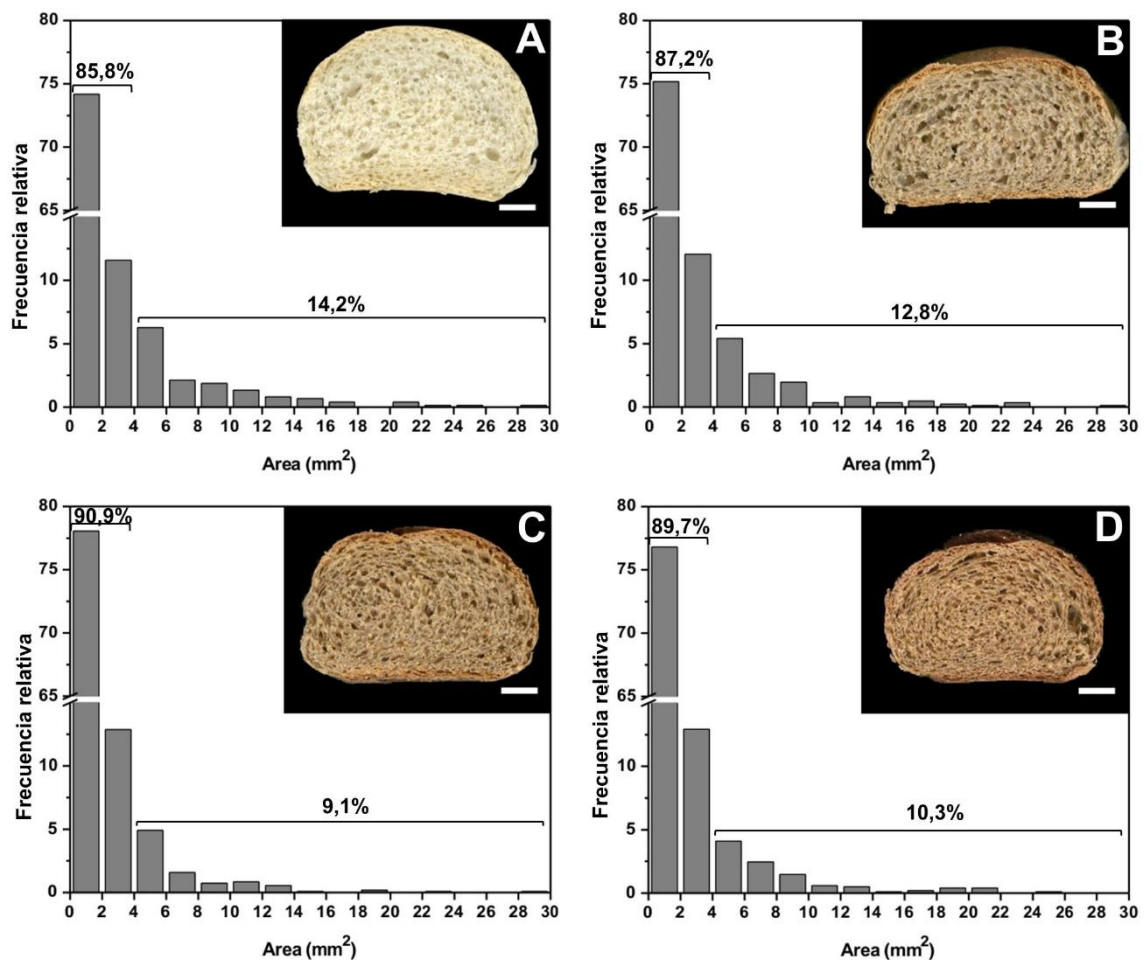


Figura 4.3. Histogramas obtenidos para la distribución de tamaño de alveolos en la miga de pan: control (A), y panes con 15 (B), 25 (C) y 35% (D) de harina de algarroba.

La apariencia de la miga se puede observar en las fotos (barra = 10 mm).

Tabla 4.3. Parámetros alveolares obtenidos para la miga de los panes compuestos trigo-algarroba.

	Densidad alveolar (Nº/mm ²)	Tamaño medio (mm ²)	Área ocupada por alveolos (%)	Circularidad
Control	0,17 ±0,02 ^a	2,14 ±0,27 ^c	36,2 ±0,5 ^b	0,45 ±0,01 ^b
15%	0,18 ±0,01 ^a	1,96 ±0,17 ^{bc}	34,6 ±2,7 ^{ab}	0,39 ±0,02 ^a
25%	0,22 ±0,02 ^b	1,61 ±0,22 ^a	34,4 ±1,5 ^a	0,39 ±0,02 ^a
35%	0,20 ± 0,02 ^b	1,77 ± 0,20 ^{ab}	35,6 ± 1,0 ^{ab}	0,40 ± 0,01 ^a

Valores promedio ±DS. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0,05$).

Se registraron diferencias significativas entre el pan control y los panes con mayor contenido de algarroba (25 y 35%). Estos últimos presentaron mayor densidad alveolar y menor tamaño medio y circularidad que el control.

Cuando la sustitución de harina fue del 15% no se detectaron diferencias significativas en los parámetros alveolares respecto al control, con la excepción de la circularidad que disminuyó. La circularidad está vinculada a la capacidad de expansión de las celdas de gas, que se relaciona a su vez con la extensibilidad de la matriz. En este sentido, y teniendo en cuenta el alto contenido de fibra de la harina de algarroba utilizada para la preparación de los panes compuestos, Gan, Galliard, Ellis, Angold, & Vaughan (1992) reportaron que el salvado de trigo, incorporado en formulaciones de pan, genera interrupciones en la matriz de gluten, obligando a las celdas de gas a expandirse en una dimensión particular y distorsionando así la estructura circular de las celdas en la miga del pan.

4.2.4. Textura de miga

Los parámetros de textura de la miga de pan fresco se muestran en la Figura 4.4. Los valores de humedad de la miga variaron entre el 32,27 y el 33,98% p/p para las diferentes formulaciones, por lo tanto, las diferencias en los parámetros de textura no pueden atribuirse principalmente a diferencias en la humedad.

La dureza y masticabilidad aumentaron gradual y significativamente con el aumento en la proporción de harina de algarroba de los panes. Como se describió anteriormente, los panes con alto contenido de algarroba tuvieron menor volumen específico y una miga más compacta, lo que podría explicar los valores más altos de dureza. El coeficiente de correlación entre la dureza y el volumen específico fue 0,986 (correlación negativa). En cuanto a la masticabilidad, la misma depende directamente de la dureza y por lo ello siguió la misma tendencia.

Según Attemburrow, Goodband, Taylor, & Lillfordt (1989) el módulo de compresión de un material esponjoso (como la miga de un pan) está directamente relacionado con el módulo de la pared de las celdas y la densidad aparente de la espuma y es inversamente proporcional a la densidad de la pared de las celdas. Además del efecto sobre el número y el tamaño de los alvéolos, los componentes de la harina de algarroba podrían tener un efecto de endurecimiento en las paredes de los alvéolos, relacionado esto con la alta cantidad de fibra contenida en esta harina.

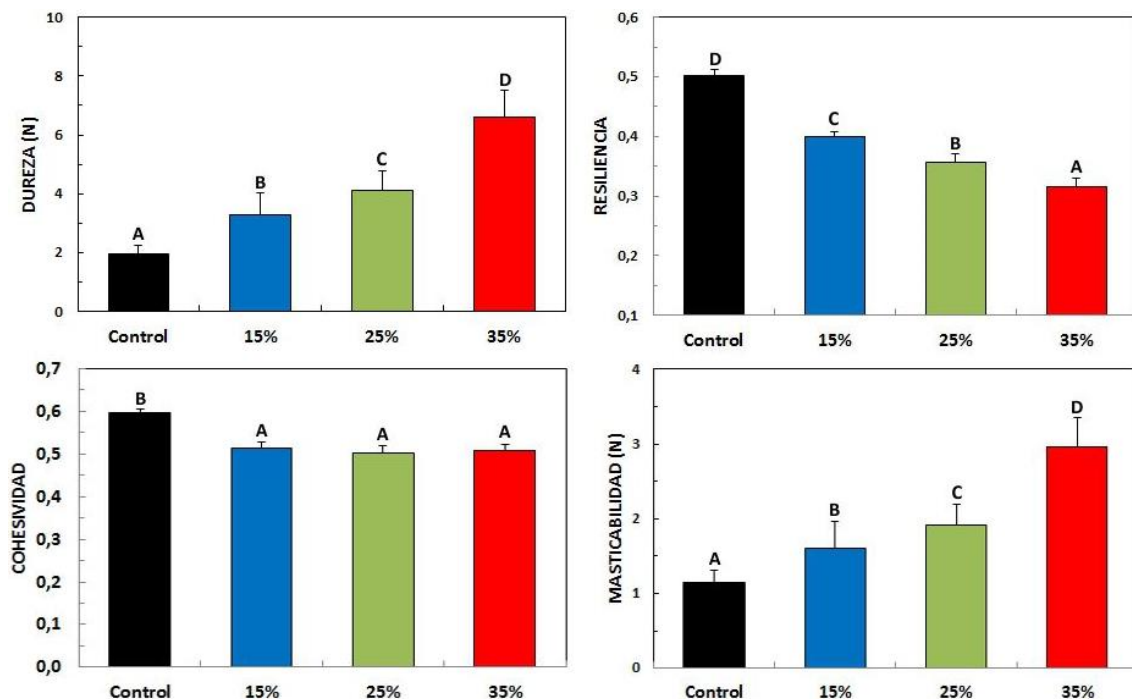


Figura 4.4. Parámetros de textura de miga para los panes control y con diferente contenido de harina de algarroba. Las letras indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0,05$).

La cohesividad y resiliencia mostraron el comportamiento opuesto, altos niveles de algarroba dieron lugar a migas menos cohesivas y más disgregables.

Se encontraron diferencias significativas en la cohesividad entre la miga de pan control y la miga de los panes con algarroba, sin embargo no se registraron diferencias significativas entre los valores de cohesividad para las migas con mayor o menor grado de reemplazo de harina de trigo por algarroba. La resiliencia, relacionada con la capacidad de recuperación instantánea después de la deformación, también resultó disminuida por la adición de algarroba y en este caso la disminución de resiliencia resultó progresiva conforme se incrementó el contenido de algarroba. Esta última correlacionó positivamente con el volumen específico de los panes ($r = 0,968$).

4.3. Caracterización de la miga por CSLM

En la Figura 4.5 se muestran las micrografías obtenidas para las migas de pan control y con 35% de algarroba por CSLM. En las mismas se pueden apreciar en tonos de verde los componentes teñidos por FITC, en rojo la tinción correspondiente a la Rod B y en azules los componentes teñidos por el Calcoflúor White (CF). Así mismo cuando hay colocalización de los fluoróforos, los colores observados son el resultado de la combinación de los colores individuales.

Las micrografías A (aumento de 4X) y C (aumento de 20X) corresponden a la miga de pan control, mientras que las micrografías B (4X) y D (20X) corresponden a la miga con 35% de algarroba. En ellas puede apreciarse la matriz de la miga y los alveolos generados durante la fermentación, estos últimos como huecos negros.

La red proteica de gluten se observa en coloraciones anaranjadas a rojizas por la combinación de los colores del FITC y la Rod B y los gránulos de almidón (teñidos de color verde) se encuentran rodeando las fibras de gluten y rellenando espacios entre las mismas.

Para ambas formulaciones se observan estructuras de diversa morfología insertas en la matriz que se encuentran teñidas de azul por el CF. Por lo observado en los controles realizados con cada fluoróforo y con las mezclas de fluoróforos se comprobó que dichas estructuras no corresponden a los gránulos de almidón y que tampoco se encuentran colocalizadas con los componentes de la matriz de gluten teñidos por la Rod B. Katina, Salmenkallio-Marttila, Partanen, Forssell, & Autio (2006) han informado sobre la

afinidad del CF con las paredes celulares del endospermo del grano de trigo, ricas en β -glucanos. Esta sería la causa de las estructuras teñidas de azul que se observan en las micrografías del pan control. El agregado de harina de algarroba, rica en fibra, incorpora a la matriz estructuras también afines con el CF. En las muestras con algarroba también se observan cuerpos teñidos con Rod B que no son asignables a la harina de trigo.

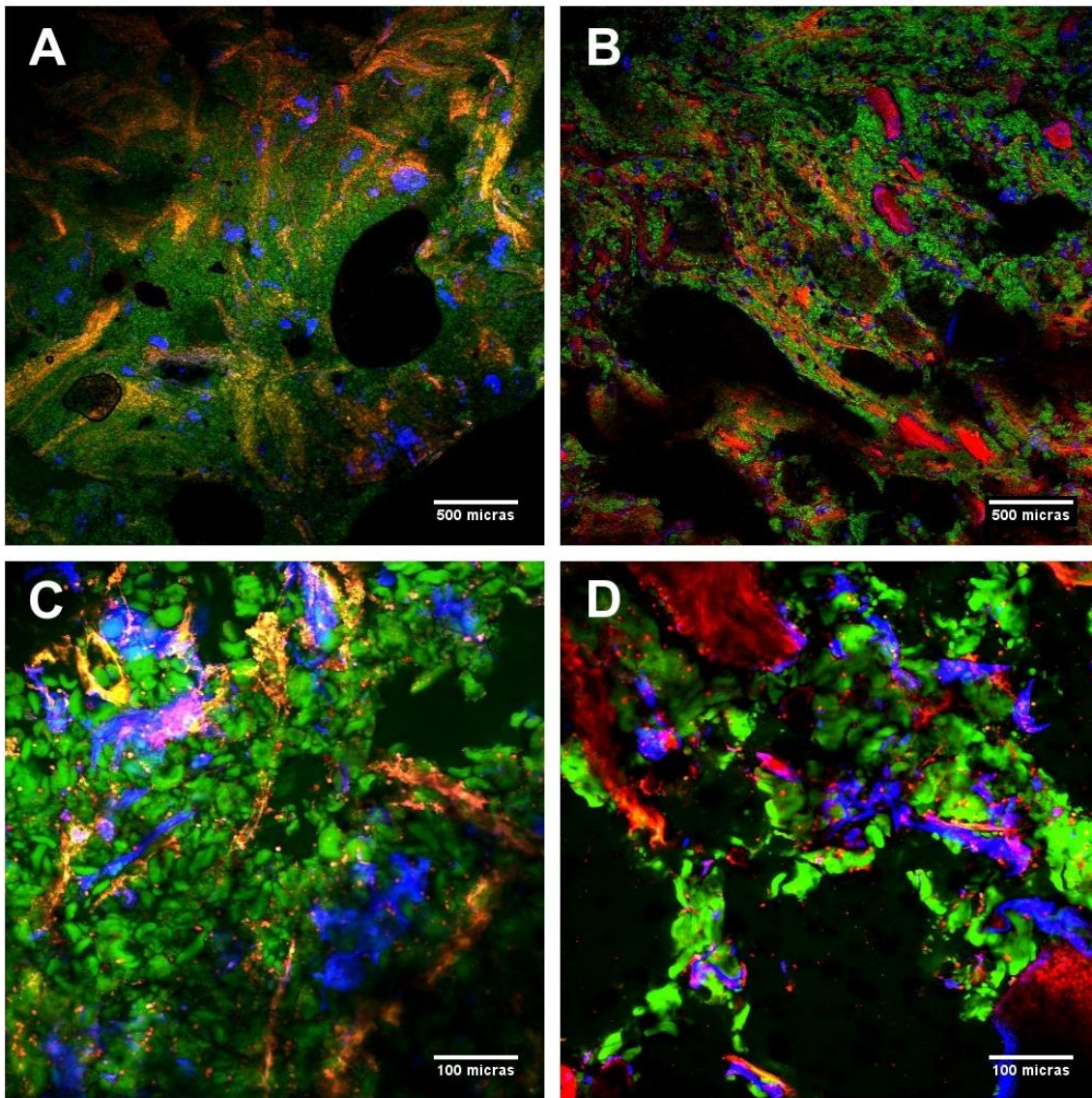


Figura 4.5. Micrografías obtenidas por CSLM de miga de panes control (A y C) y con 35% de algarroba (B y D) con aumentos de 4X y 20X.

La tinción colocalizada de Rod B y CF da una coloración magenta como puede observarse en ciertas zonas de las micrografías B y D que, como se dijo anteriormente, corresponderían a estructuras ricas en fibra y proteína provenientes de la algarroba.

Puede además comprobarse que dichas estructuras se encuentran intercaladas en la red formada por proteína y almidón, hecho que estaría corroborando las disminuciones registradas en cohesividad de masa y de miga para las formulaciones con incorporación de algarroba respecto a la muestra sin algarroba ya que esta interferencia en la red sería contraproducente sobre la capacidad de los componentes para mantenerse unidos.

También se puede apreciar claramente la mayor cantidad de gránulos de almidón en las zonas adyacentes a la red proteica y rellenando los espacios entre los alveolos para la miga de pan control. Este hecho puede relacionarse con los resultados de dureza de miga mostrados en la sección anterior, donde se discutió que la dureza de la miga (interpretada como un material esponjoso) dependía no solo de la densidad de burbujas de gas, sino también de la densidad de las paredes de dicha estructura. En la miga del pan con algarroba se reduce el contenido de almidón respecto al pan control, mientras que se incrementa el contenido de los componentes provenientes de la harina de algarroba (mayormente fibra, azúcares y proteínas) que, como lo evidencian las micrográficas, cambian la microestructura de las paredes de la miga, o sea el espacio entre alveolos. Esta diferente composición podría proporcionar una mayor densidad a la pared y aportar así a la mayor dureza observada en los mismos.

4.4. Cambios durante el almacenamiento

4.4.1. Cambios texturales durante el almacenamiento

El envejecimiento de la miga está íntimamente relacionado con la pérdida de humedad y la retrogradación del almidón (Gray et al., 2003).

Durante el almacenamiento, se observó un deterioro progresivo de la textura de la miga. La dureza y masticabilidad aumentaron, mientras que la resiliencia y la cohesividad disminuyeron. La evolución de estos parámetros durante el almacenamiento se puede observar en los gráficos de líneas de la Figura 4.6.

Se realizó un análisis de covarianza con el tiempo como variable independiente y el nivel de sustitución como tratamiento; se determinó que el tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) en todos los parámetros de textura de los panes compuestos trigo-algarroba.

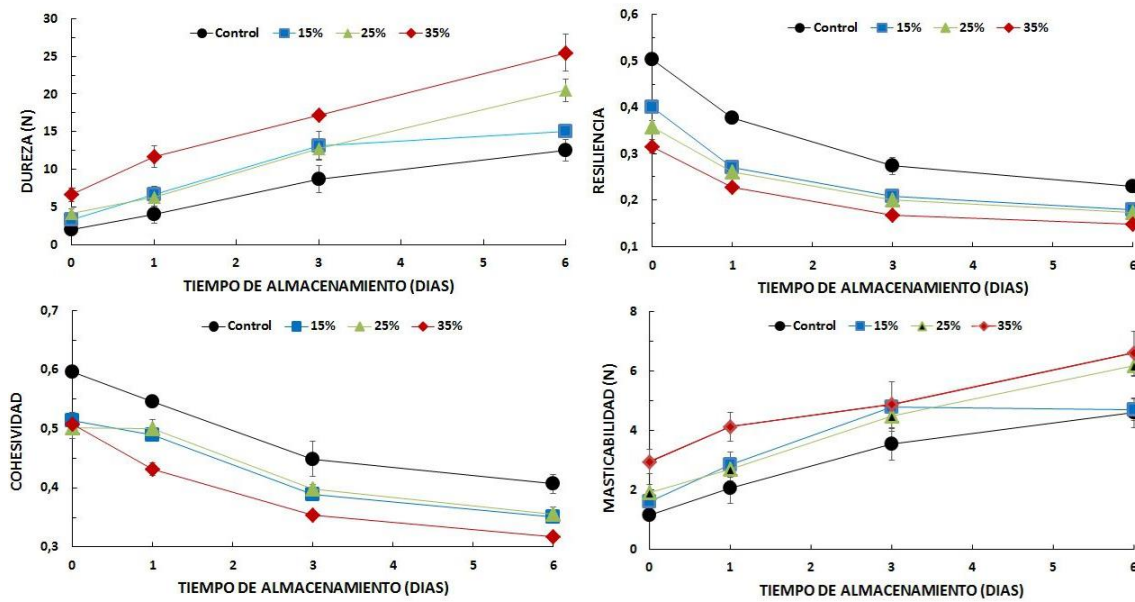


Figura 4.6. Atributos texturales medidos en la miga de los panes control y compuestos trigo-algarroba durante el almacenamiento.

Varios autores han estudiado los cambios en la dureza o firmeza durante el almacenamiento de sistemas panarios y han informado un comportamiento no lineal con el tiempo que puede ser modelado con la ecuación exponencial de Avrami (Besbes, Jury, Monteau, & Le-Bail, 2014; Le-Bail, Boumali, Jury, Ben-Aissa, & Zuniga, 2009; Le-Bail, Leray, Perronnet, & Roelens, 2011; Ronda & Roos, 2011).

En el presente trabajo, como no se alcanzó la meseta en los valores de dureza en el período de almacenamiento evaluado, el ajuste de dureza en función del tiempo de almacenamiento no fue posible con la ecuación de Avrami y por eso las tasas de endurecimiento se analizaron sólo en la etapa inicial (hasta el tercer día) aplicando una regresión lineal de los datos de dureza. Los valores de R^2 ajustado fueron superiores a 0,84 en todos los casos y las pendientes obtenidas para esos modelos fueron: 2,24; 3,28; 2,83 y 3,43 N/día (error estándar <0,21 en todos los casos) para el pan control y los panes con 15, 25 y 35% de reemplazo respectivamente.

La adición de algarroba llevó a un aumento significativo en las pendientes (con respecto al control), lo que sugiere un mayor endurecimiento en las etapas iniciales. Sin embargo, al final del almacenamiento (6 días) el valor de dureza aumentó más de cinco veces (540%) para el pan control, mientras que en los panes de trigo-algarroba este efecto se

atenuó, sobre todo con el contenido de algarroba más alto (35% de sustitución), con un incremento en dureza de 286%.

La masticabilidad siguió la misma tendencia que la dureza de miga y después de 6 días de almacenamiento, se incrementó un 304% y 124% para el control y el pan con el reemplazo de 35%, respectivamente.

Otros atributos texturales resultaron menos afectados, la resiliencia disminuyó entre un 51,3 y un 55,1% y la cohesividad lo hizo entre un 29,1 y un 37,7% entre las diferentes formulaciones, luego de 6 días de almacenamiento.

Un efecto similar sobre el endurecimiento de la miga de pan enriquecido con salvado fue reportado previamente por Katina et al. (2006), donde la miga del pan enriquecido con fibra mostró valores más altos de firmeza a día 0 (respecto al control sin agregado de fibra), pero los cambios durante el almacenamiento resultaron atenuados.

4.4.2. Cambios en la cristalinidad, microscopía óptica de luz polarizada y difracción de rayos X

Se utilizó microscopía de luz polarizada para analizar la presencia de estructuras cristalinas en los componentes de la mezcla y en la miga de los panes.

En las micrografías de la Figura 4.7 se puede observar que las harinas de trigo y de algarroba y su mezcla, exhiben una marcada birrefringencia (Figuras 4.7.A, B y C, respectivamente). En la harina de trigo, la cristalinidad es debida a los gránulos de almidón nativo. En la harina de algarroba, la birrefringencia podría ser asignada a celulosas y otros materiales fibrosos presentes en paredes celulares y a otros componentes como azúcares (principalmente sacarosa), según han informado Bravo, Grados, & Saura-calixto (1998).

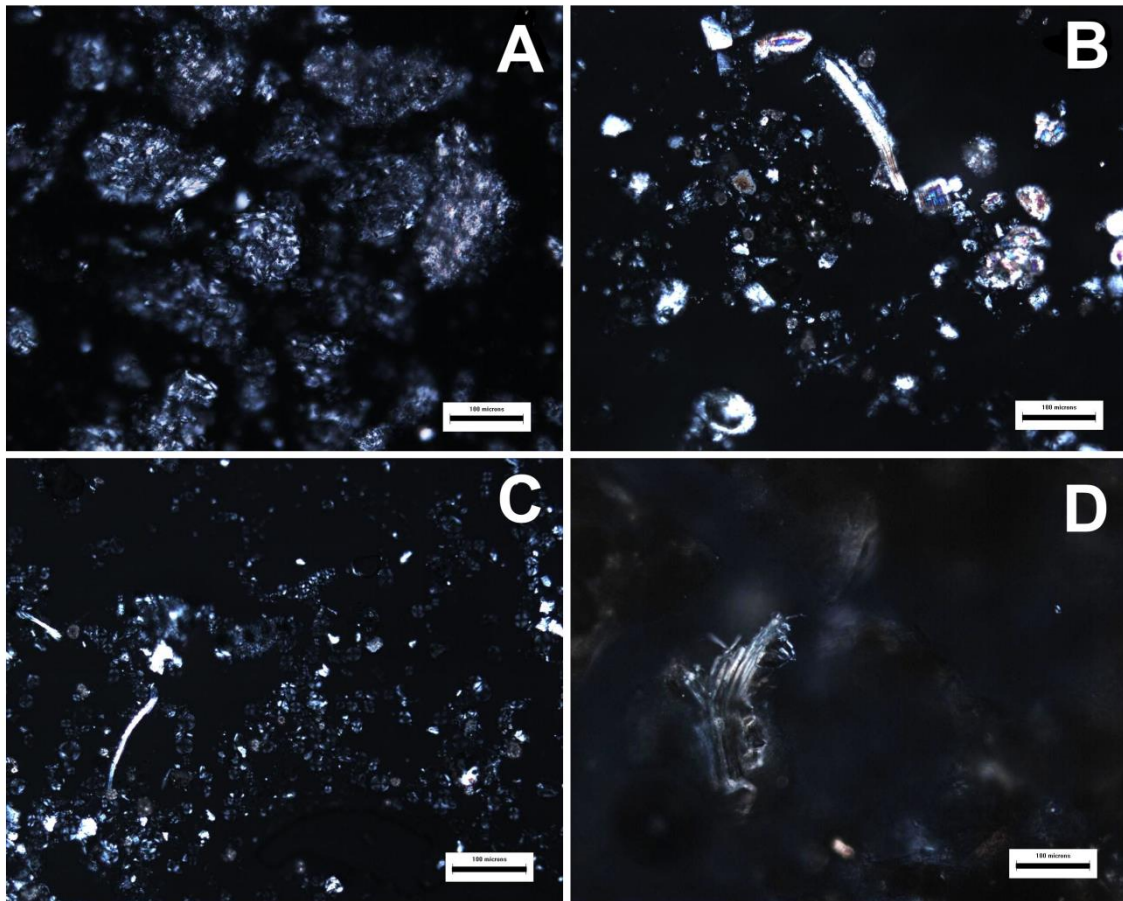


Figura 4.7. Micrografías de luz polarizada de: **A**, harina de trigo (20X); **B**, harina de algarroba (20X); **C**, mezcla de harinas (35% de algarroba) (20X); **D**, miga liofilizada de pan con 35% de reemplazo (20X). Barra = 100 μm .

Estas observaciones están de acuerdo con los difractogramas obtenidos para la harina de algarroba, donde pueden observarse varios picos en el intervalo de 10 a 30 °, indicando presencia de estructuras cristalinas (Figura 4.8.A).

Liu & Hu (2008) analizaron fibras celulósicas de bambú mediante difracción de rayos X y observaron picos de cristalinidad en ángulos 2θ de 15, 16,3 y 22,7 °. Por otro lado, Tserki, Zafeiropoulos, Simon, & Panayiotou (2005) estudiaron fibras de lino y cáñamo, ricas en celulosa, hemicelulosa y lignina, y encontraron picos característicos a ángulos 2θ cercanos a 16 y 22 °. Es decir, existe evidencia de picos de cristalinidad asociados a materiales celulósicos y de paredes celulares que pueden caer en el rango evaluado en los difractogramas. Además, los picos dobles característicos observados para la muestra de harina de algarroba cercanos a 19 y 25 ° podrían atribuirse a los informados para la sacarosa en 18,9, 19,7, 24,8 y 25,2 ° (Chinachoti & Steinberg, 1986).

El almidón de trigo nativo presenta un patrón de difracción de rayos X con picos de cristalinidad cercanos a los 15, 17, 18 y 23 ° (Jovanovich, 1997), pero dicha cristalinidad se pierde durante los tratamientos térmicos debido al proceso de gelatinización de los gránulos de almidón (proceso que ocurre durante el horneado de las masas). En la Figura 4.7.D se puede observar la micrografía obtenida para miga de pan de trigo-algarroba (35%) a 0 días de almacenamiento. Como era de esperar, los gránulos de almidón perdieron su birrefringencia característica y la estructura cristalina residual correspondería a los componentes de la algarroba.

Los difractogramas de miga de pan liofilizada (control y pan trigo-algarroba 35%) luego de 0 y 6 días de almacenamiento se muestran en la Figura 4.8.B. Se detectaron picos de cristalinidad cercanos a ángulos 2θ de: 13, 15, 17, 20, 22 y 24 °.

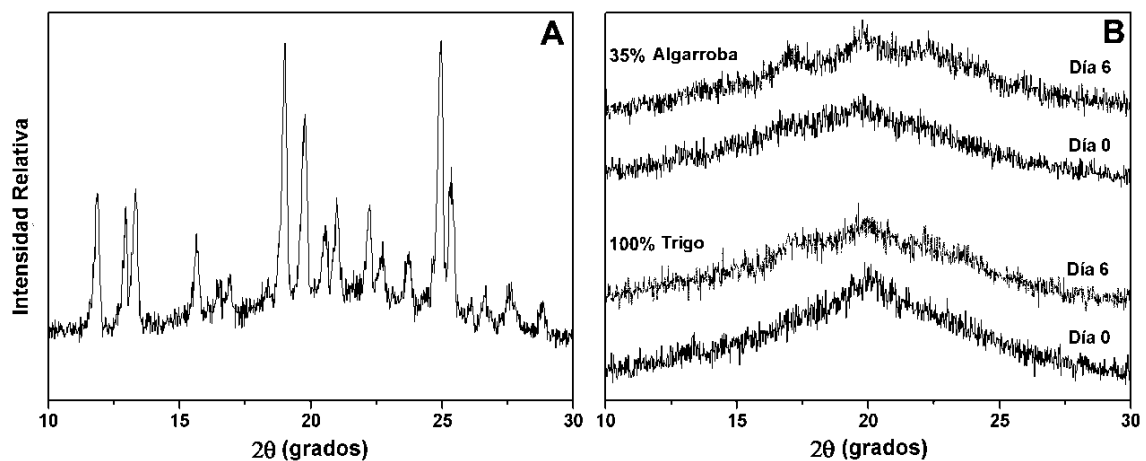


Figura 4.8. Difractogramas típicos de **A)** harina de algarroba y **B)** miga liofilizada de pan control y compuesto (35% de algarroba) sin almacenar y luego de 6 días de almacenamiento.

El valor más bajo de cristalinidad total se obtuvo en el pan control fresco ($11,40 \pm 0,91\%$). La cristalinidad total resultó significativamente mayor después de seis días de almacenamiento ($20,57 \pm 1,73$), debido principalmente a los aumentos de área de los picos de 17, 22 y 24 °. El aumento en el área de estos picos se asocia directamente con la recristalización del almidón gelatinizado (Ribotta, Cuffini, León, & Añón, 2004).

La cristalinidad (%) de la miga de pan de trigo-algarroba fue significativamente mayor ($23,58 \pm 2,79$) que para el pan control en el día 0 de almacenamiento, este resultado está

de acuerdo con la mayor presencia de estructuras cristalinas, como se ha comentado anteriormente y se pudo visualizar en las micrografías de luz polarizada.

Después de 6 días de almacenamiento, el aumento de la cristalinidad en estos panes ($26,65 \pm 2,51$) fue significativa, aunque menor de lo esperado, lo que sugiere una cierta inhibición en la retrogradación.

4.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

A través de ensayos de DSC (Tabla 4.4) se evaluó la retrogradación de amilopectina para las diferentes muestras. Como se explicó en la sección 2.2.3.3.3 se realizó una simulación de horneado de las masas y las cápsulas se almacenaron durante 6 días a 20 °C. No se registraron picos de retrogradación para las muestras evaluadas al día 0 y 1 de almacenamiento.

Para los días 3 y 6 de almacenamiento se registraron picos asociables a retrogradación. Para los mismos se calcularon las temperaturas de inicio, de pico y final y la entalpía asociada a dichos picos. Esta última se corrigió y se presenta en la tabla como energía (en Julios) por gramo de almidón en la muestra para poder evaluar así el efecto de los componentes de la algarroba sobre la retrogradación de amilopectina.

Luego de 3 días de almacenamiento se registraron picos de retrogradación con temperaturas de inicio cercanas a los 50 °C. Las temperaturas de pico estuvieron entre los $60,11 \pm 0,26$ y los $64,00 \pm 1,68$ °C, cabe remarcar que la determinación de la temperatura de pico fue dificultosa por la forma extendida del pico y su área relativamente chica. La temperatura final de pico estuvo entre $74,50 \pm 1,45$ °C para el control y $77,30 \pm 1,05$ °C para la formulación con 35% de reemplazo; la formulación con 35% de algarroba exhibió valores significativamente más altos en las temperaturas de pico y final respecto a las otras formulaciones, mientras que no hubo diferencias entre las formulaciones control y con 15 y 25% de reemplazo. Respecto a la entalpía por gramo de almidón se observó un claro descenso de la misma al incrementar el contenido de algarroba en la formulación.

Tendencias similares a las descriptas para el día 3 de almacenamiento se registraron en las temperaturas luego de 6 días de almacenamiento, con las T_0 cercanas a los 50 °C, T_R cercanas a los 60 °C y T_F entre $71,75 \pm 0,57$ °C y $76,35 \pm 0,06$ °C. El ΔH_R asociado al pico de retrogradación luego de 6 días de almacenamiento fue de $1,72 \pm 0,23$ J/g almidón en

la muestra control de trigo y el mismo resultó significativamente mayor que los valores medidos para las muestras con algarroba, siendo los valores más bajos los registrados para las formulaciones con 25 y 35% de reemplazo (sin diferencias significativas entre ellos). Esta disminución del ΔH_R indica que el proceso de retrogradación de amilopectina resultó limitado en presencia de harina de algarroba. Ronda, Quilez, Pando, & Roos (2014) han señalado el efecto de la adición de fibra insoluble a la masa de pan sobre la retrogradación de almidón, resultando comparables sus observaciones a lo aquí descrito con la incorporación de harina de algarroba.

Tabla 4.4. Retrogradación de amilopectina en las muestras control y con diferente reemplazo con harina de algarroba.

		Retrogradación de amilopectina				
		$T_o(^{\circ}C)$	$T_R(^{\circ}C)$	$T_f(^{\circ}C)$	$\Delta H_R(J/g^*)$	IR (%)
Día 3	Con.	50,76±1,11 ^{bc}	60,45±0,43 ^b	74,50±1,45 ^{bc}	1,23±0,09 ^e	13,31
	15%	49,00±0,83 ^{ab}	61,03±0,70 ^b	75,45±0,52 ^{bcd}	0,77±0,04 ^{cd}	6,99
	25%	50,70±1,12 ^{bc}	60,11±0,26 ^{ab}	75,18±0,84 ^{bc}	0,46±0,04 ^{ab}	4,19
	35%	51,35±1,39 ^c	64,00±1,68 ^c	77,30±1,05 ^d	0,41±0,16 ^a	3,97
Día 6	Con.	50,87±0,99 ^{bc}	59,74±0,39 ^{ab}	74,03±1,22 ^b	1,72±0,23 ^f	18,61
	15%	47,03±0,18 ^a	57,68±0,19 ^a	71,75±0,57 ^a	1,02±0,03 ^{de}	9,26
	25%	50,05±1,05 ^{bc}	60,91±2,29 ^b	74,72±1,02 ^{bc}	0,71±0,09 ^c	6,46
	35%	50,26±0,37 ^{bc}	61,94±1,58 ^{bc}	76,35±0,06 ^{cd}	0,72±0,004 ^{bc}	6,97

Promedios \pm DS; * g de almidón. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0,05$).

El índice de retrogradación calculado confirmó lo observado en la entalpía de retrogradación, dando como resultado que la incorporación de harina de algarroba en la formulación estaría disminuyendo la retrogradación de amilopectina. Este comportamiento también puede relacionarse con la atenuación de los cambios observados en dureza durante el almacenamiento para la miga de los panes con algarroba y la atenuación en el incremento relativo de la cristalinidad de la miga determinada por rayos-X.

Los resultados mencionados confirmarían el efecto de la harina de algarroba en el retraso del envejecimiento del pan, que podría atribuirse a una modificación en la redistribución del agua en la matriz durante el almacenamiento, generada por los componentes de la algarroba y estableciéndose así cambios en la interacción del agua con los componentes sólidos de la miga, como han señalado Chiavaro, Vittadini, Musci, Bianchi, & Curti (2008). Por otro lado, Osella, Sánchez, Carrara, De La Torre, & Buera (2005) informaron que la redistribución del agua durante el almacenamiento afecta el tipo de cristales de almidón formados, influyendo esto sobre la firmeza de la miga.

4.5. Efecto de los aditivos sobre la calidad de los panes

Se evaluó la aplicación del estearoil lactilato de sodio (SSL) y ácido ascórbico (AA) sobre la calidad de los panes con 15 y 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba. Se aplicó el diseño central compuesto descrito en 2.2.3.1 para cada nivel de reemplazo de harina. Al intentar modelar las respuestas con la ecuación de segundo orden (Ec. 2.31) se obtuvieron pobres ajustes y/o falta de ajuste para los diferentes parámetros. Debido a esto se analizaron los datos mediante ANOVA comparando los valores medios obtenidos entre las formulaciones sin aditivar (controles con 15 y 35% de algarroba) y las formulaciones del diseño central compuesto correspondiente a cada nivel de reemplazo de harina. La incorporación de los aditivos en las concentraciones y combinaciones aplicadas no modificó positivamente la calidad panadera de los productos. Para algunos puntos del diseño se registraron inclusive reducciones del volumen específico (VE) e incrementos en la dureza de la miga, respecto a los panes sin aditivar.

Con la intención de comprender mejor el efecto de estos aditivos sobre la calidad de los panes se analizó el VE y la dureza de para:

- un nivel constante de SSL (0,25 g/100g de mezcla de harinas) y cantidades crecientes de AA (0, 0,02 y 0,4 g/100g de mezcla de harinas), correspondiendo a los puntos 5, 9 y 6 del diseño
- un nivel constante de AA (0,02 g/100g de mezcla de harinas) y concentraciones crecientes de SSL (0, 0,25 y 0,5 g/100g de mezcla de harinas), correspondiendo a los puntos 7, 9 y 8 del diseño

En la Figura 4.9 se muestran los resultados de volumen específico (VE) para las formulaciones de pan correspondientes a los puntos del diseño que se describieron previamente, con 15 y 35% de harina de algarroba (líneas azules y naranja respectivamente).

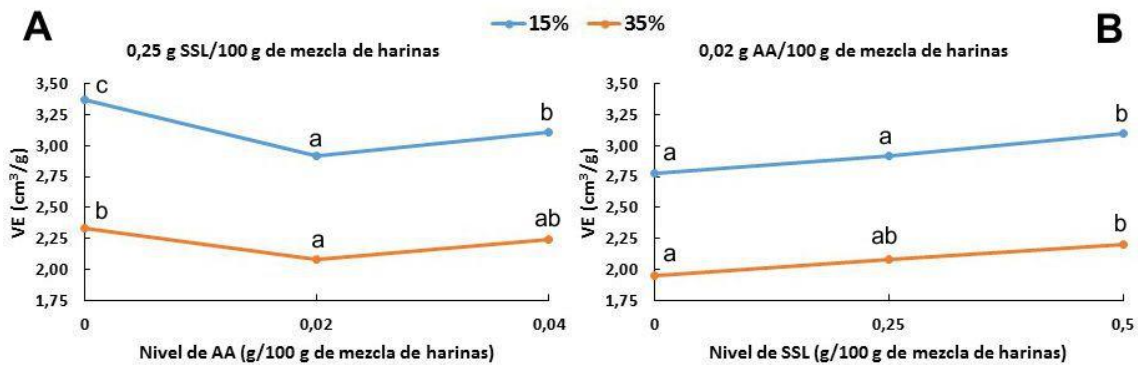


Figura 4.9. Volumen específico de los panes con: **A)** contenidos crecientes de AA y nivel constante de SSL; **B)** contenidos crecientes de SSL y nivel constante de AA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de VE dentro de cada serie (nivel de reemplazo).

La incorporación de AA en ambas concentraciones condujo a una reducción del VE en los panes con 15% de harina de algarroba y un nivel de 0,25% (base harina total) de SSL. El efecto fue similar para los panes con 35% de harina de algarroba, aunque la reducción del VE no fue significativa para el pan con 0,04% (base harina total) de AA. El agregado del emulsionante condujo a incrementos en el VE de los panes con 15 y 35% de harina de algarroba y nivel de 0,02% (base harina total) de AA, aunque las diferencias sólo fueron significativas cuando se aplicó el mayor nivel de SSL (0,5%).

Los resultados de dureza de miga fueron congruentes con las tendencias observadas para el VE. Las formulaciones que condujeron a panes con mayor VE fueron las que mostraron menor dureza de miga. Los valores bajos de dureza son deseados en la miga de pan ya que los mismos son indicativos de una miga esponjosa y aireada. En la Figura 4.10 se grafican los valores de dureza de miga para los panes con 15 y 35% de harina de algarroba, correspondientes a los puntos del diseño mencionados anteriormente.

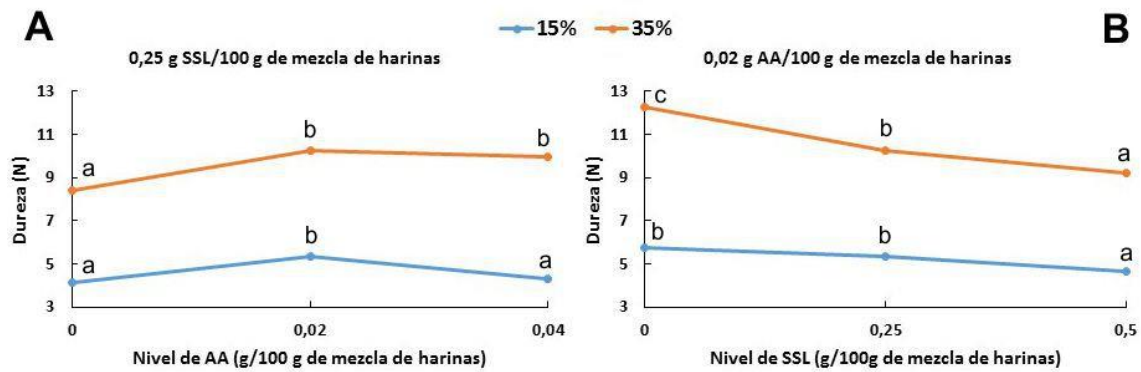


Figura 4.10. Dureza de los panes con: **A)** contenidos crecientes de AA y nivel constante de SSL; **B)** contenidos crecientes de SSL y nivel constante de AA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de dureza dentro de cada serie (nivel de reemplazo).

En los panes con 15% de harina de algarroba (líneas azules) la incorporación de AA en ambas concentraciones aumentó los valores de dureza de miga, sin embargo el aumento no fue significativo en el pan con máximo nivel de AA. Para un nivel medio de AA (0,02% base harina total) el incremento en la concentración de SSL disminuyó la dureza de miga de los panes con 15% de harina de algarroba, aunque la diferencia solo fue significativa con el máximo nivel de emulsionante.

Las tendencias registradas en dureza de miga para los panes con 35% de harina de algarroba (líneas naranja) fueron similares a las descritas para los panes con 15% de reemplazo de harina. El agregado de AA (en ambas concentraciones) incrementó significativamente la dureza de la miga, mientras que la misma disminuyó progresivamente con el incremento en la concentración de SSL para un nivel constante de AA. Cabe destacar que las diferencias de dureza entre las formulaciones fueron mayores en los panes con 35% de harina de algarroba que en los panes con 15% de reemplazo de harina. El rango de dureza de miga para los panes con 15% de algarroba estuvo entre 4,14 y 5,76 N, mientras que para los panes con el mayor reemplazo el rango de dureza estuvo entre 8,41 y 12,29 N.

De acuerdo a estos resultados el AA estaría teniendo un efecto contraproducente sobre el VE y la dureza de miga de los panes. Un efecto negativo del AA puede deberse a una excesiva promoción en la formación de puentes disulfuro y que produzca matrices viscoelásticas demasiado tenaces, con baja extensibilidad. Algunos autores (Enko &

Gliszczyńska-Świgło, 2015) han señalado la existencia de interacciones (antagonismos, aditivismos, sinergismos) entre polifenoles (extraídos de té en el caso del trabajo mencionado) y el AA, por lo que quedaría por indagar la posible existencia de interacción entre los polifenoles presentes en la algarroba y este aditivo, que pueda estar afectando la estructura de la red de gluten en la masa. Por otro lado, el SSL aplicado en las concentraciones ensayadas no sería suficiente para mejorar dichos parámetros en los panes compuestos trigo-algarroba. Sin embargo, teniendo en cuenta las tendencias observadas en la Figura 4.9.B y en la Figura 4.10.B, se podrían evaluar mayores contenidos de emulsionante, aunque los límites seleccionados para el diseño corresponden a los máximos permitidos por el CAA para aditivación de harina de trigo.

4.6. Información nutricional de panes compuestos trigo-algarroba

La composición de los panes se muestra en la Tabla 4.5. Se encontraron leves diferencias en la humedad y en el contenido de lípidos entre las formulaciones.

El contenido de minerales aumentó significativamente con la incorporación de algarroba, mientras que el contenido proteico se redujo en menos del 1% en el pan con el nivel máximo de algarroba (respecto al pan control).

Tabla 4.5. Composición de los panes con diferentes contenidos de algarroba.

	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)	FDT (%)
Control	33,98±0,93 ^b	1,82±0,01 ^a	9,83±0,12 ^c	2,34±0,52 ^{ab}	2,53±0,54 ^a
15%	33,12±0,30 ^{ab}	2,23±0,05 ^b	9,61±0,01 ^{bc}	2,63±0,53 ^{ab}	6,94±0,80 ^b
25%	32,88±0,74 ^{ab}	2,45±0,04 ^c	9,38±0,16 ^b	2,71±0,03 ^b	8,43±0,52 ^c
35%	32,37±1,00 ^a	2,53±0,01 ^c	8,87±0,04 ^a	2,24±0,25 ^a	9,26±0,56 ^c

Promedios ±DS. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0,05$).

El aspecto nutricional más relevante está relacionado con el contenido de fibra de los panes. Con sólo el 15% de sustitución de harina de trigo por harina de algarroba, el contenido total de fibra dietética aumentó más del doble, alcanzando un valor de 6,94%. Esto significa que los panes de trigo-algarroba podrían rotularse como panes con "alto

contenido de fibra dietética", de acuerdo con las disposiciones de la FAO/OMS y del CAA (ALINORM 09/32/26, 2009; CAA, 2014).

4.7. Análisis sensorial de los panes

Sobre las formulaciones con 15, 25 y 35 % de reemplazo se realizaron mediciones de aspecto, color, aroma, textura, sabor y aceptabilidad global con un panel de 50 personas no entrenadas, con las características descritas en la sección 2.2.3.5. Los valores medios para cada atributo y sus desviaciones estándar se muestran en la Tabla 4.6. En cuanto al consumo/conocimiento de los productos con algarroba, el 50% de los panelistas indicaron consumir o haber consumido ocasionalmente productos con algarroba, el 44% indicó que nunca había consumido productos con algarroba y el 6% restante indicó consumir frecuentemente productos con algarroba. Indicando que el consumo de los productos con algarroba es poco frecuente en esta región (La Plata).

No se registraron diferencias significativas entre los puntajes promedio asignados por los evaluadores para la aceptabilidad global de las muestras. Tampoco hubieron diferencias significativas entre las muestras para los puntajes asignados a los atributos de aspecto, aroma, textura y sabor de los panes; mientras que en el color se registró un mayor puntaje promedio para el pan con la concentración intermedia de algarroba (25%) por sobre el pan con la menor concentración.

Tabla 4.6. Puntajes asignados para cada atributo sensorial de los panes.

	Aspecto	Color	Aroma	Textura	Sabor	Aceptab. Global
15%	6,39 ±1,82 ^a	6,12 ±2,03 ^a	6,51 ±1,63 ^a	6,47 ±1,60 ^a	6,46 ±1,58 ^a	6,47 ±1,44 ^a
25%	6,92 ±1,48 ^a	6,86 ±1,57 ^b	6,50 ±1,81 ^a	6,79 ±1,54 ^a	6,22 ±1,94 ^a	6,55 ±1,65 ^a
35%	6,57 ±1,51 ^a	6,51 ±1,73 ^{ab}	6,43 ±1,89 ^a	6,49 ±1,46 ^a	6,31 ±1,82 ^a	6,35 ±1,55 ^a

Promedios ±DS. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0,05$).

Cabe destacar que los panes evaluados con las tres concentraciones de algarroba recibieron puntajes promedio superiores a seis en la escala de nueve puntos utilizada para todos los atributos, lo que puede interpretarse como una buena aceptación de las

características sensoriales de los productos y que se podría reemplazar hasta un 35% de harina sin ocasionar rechazo en los consumidores.

Las desviaciones estándar elevadas indican la disparidad de los puntajes asignados por los panelistas. Para poder obtener mayor información se muestran los resultados en un gráfico radial (para los seis parámetros) y en un gráfico de frecuencia (para aceptabilidad global), Figura 4.11 y Figura 4.12 respectivamente.

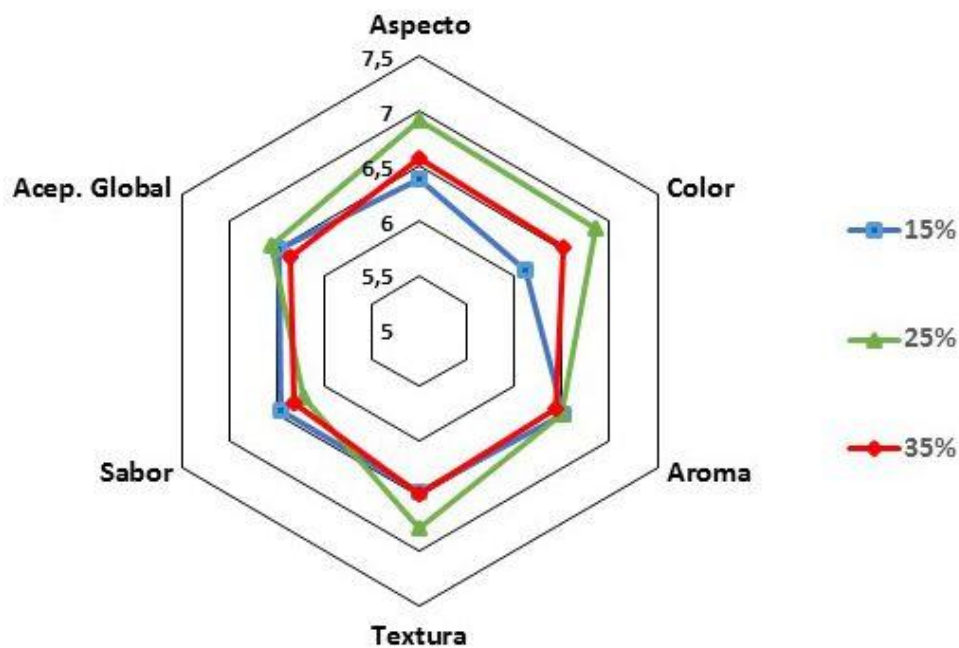


Figura 4.11. Gráfico radial indicando los puntajes para los atributos sensoriales evaluados en los panes compuestos trigo-algarroba.

El gráfico radial o de “tela de araña” permite observar una tendencia que muestra como el pan con 25% de harina de algarroba obtuvo calificaciones más altas sobre todo en los parámetros de aspecto, color y textura, mientras que la formulación con 15% de algarroba obtuvo valoraciones menores en el color, indicando que en este tipo de productos los consumidores preferirían coloraciones más oscuras.

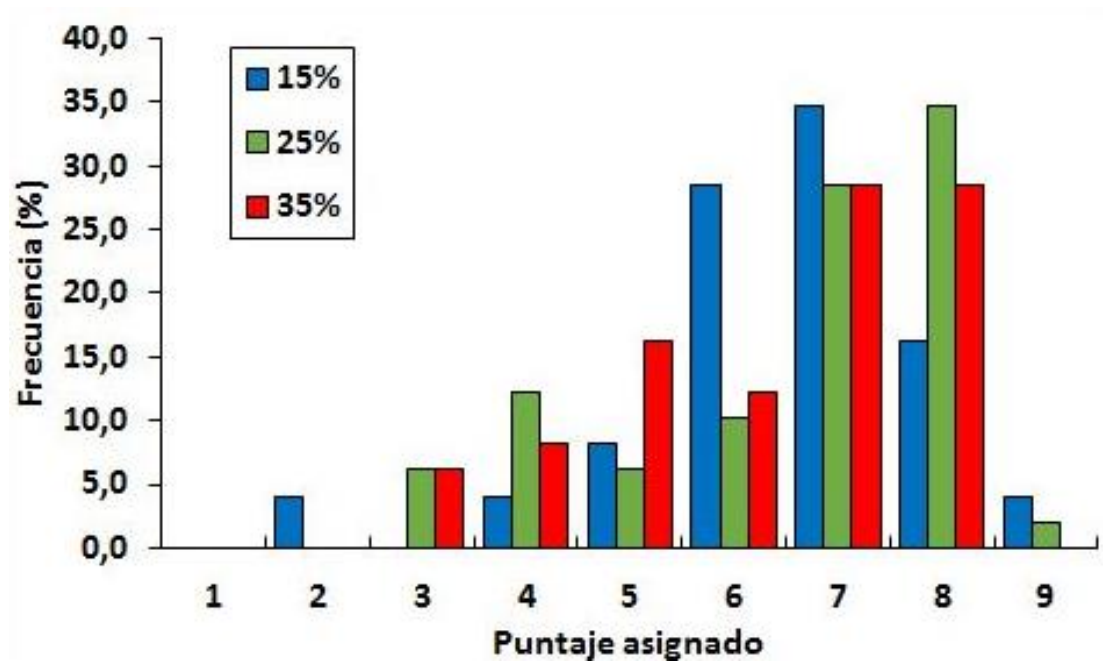


Figura 4.12. Gráfico de frecuencias para la aceptabilidad global de los panes.

Del gráfico de frecuencias para aceptabilidad global se desprende que el 65% de los panelistas calificaron al pan con 25% de harina de algarroba con una puntuación igual o mayor a 7 (siete), mientras que dicho porcentaje se redujo a 57% y 55% para los panes con 35 y 15% de algarroba respectivamente. Por otra parte, el mayor porcentaje de calificaciones negativas (menores a 5 puntos) se registró para las formulaciones con 25 y 35% de algarroba, con un 18,4 y 14,3% respectivamente, mientras que el pan con el menor contenido de algarroba registró un 8,2% de las calificaciones menores a 5 puntos. Finalmente se destaca que el 63% de los panelistas calificaron al pan con 15% entre 6 y 7 puntos, porcentajes que disminuyen a un 39 y 41% para los panes formulados con 25 y 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba respectivamente.

Puede decirse que la distribución de puntajes mostró dos máximos para los panes con los mayores contenidos de algarroba, el más importante entre los puntajes 7 y 8 y el restante entre 4 y 5, indicando una población importante que calificó positivamente la calidad de estos panes y una población considerablemente menor que la calificó negativamente. Por otro lado, para el pan con 15% la distribución se asemejó a un tipo normal con un máximo entre 6 y 7.

Cabe destacar que actualmente los consumidores se encuentran familiarizados con la presencia en el mercado de panificados diferentes al pan tradicional de trigo, y que se

asocian a “productos saludables”. Estos panes “saludables” son por lo general más oscuros que el pan tradicional por la presencia de salvado y semillas o partes de semillas de diferentes fuentes y presentan una textura de miga más “rústica” que la del pan tradicional. Posiblemente los evaluadores asocien los panes de algarroba con los mencionados y esto ayuda a comprender por qué en general la aceptabilidad sensorial de los panes con algarroba fue buena para las tres formulaciones, si bien la mayoría de los panelistas expresaron no consumir productos con algarroba frecuentemente.

Por otro lado, aunque no se registraron diferencias significativas para la mayoría de los parámetros, con la ayuda del gráfico de frecuencia se puede observar que hay una mayor disparidad en el nivel de aceptabilidad global para los panes con mayor contenido de algarroba respecto al pan con la menor concentración de dicha harina.

CONCLUSIONES PARCIALES

La utilización de harina de algarroba como reemplazo de harina de trigo permite obtener panes con importantes contenidos de fibra dietaria, 6 a 9% al reemplazar entre un 15 y 35% de harina, pero las propiedades panaderas del producto final se ven notablemente afectadas.

Además la incorporación de harina de algarroba condujo a mayores tiempos de fermentación y disminuyó la expansión de la masa durante la fermentación (volúmenes finales inferiores). Como consecuencia, los volúmenes específicos finales de los panes compuestos resultaron más bajos que en el pan control de trigo. La disminución de volumen también se relaciona con un cambio en las características de los alvéolos; se evidenció la presencia de más alvéolos con tamaños inferiores y la pérdida de circularidad, que llevaron a panes con migas más compactas.

Se observaron cambios en la textura de miga. La dureza y masticabilidad aumentaron y la cohesividad y resiliencia disminuyeron cuando se añadieron los mayores contenidos de harina de algarroba (25-35%). La reducción de la calidad tecnológica de los panes compuestos, en comparación con el pan de harina de trigo, puede estar asociada a la dilución de las proteínas del gluten con la sustitución de harina y a la presencia de nuevos componentes (como la fibra y azúcares de bajo peso molecular) en el sistema, lo que puede afectar a las propiedades viscoelásticas de la masa y en consecuencia la posterior estructura de la miga.

El almacenamiento de los panes condujo al aumento progresivo de dureza y masticabilidad y a la pérdida de cohesividad y resiliencia de la miga en todas las formulaciones. Sin embargo, estos cambios se atenuaron en los panes compuestos en comparación con el pan control de trigo. Los resultados de textura se pueden relacionar directamente con lo observado en los ensayos de DSC y rayos X, donde se constató un menor grado de retrogradación del almidón al reemplazar la harina de trigo por la harina de algarroba. Estos cambios pueden deberse a una diferente redistribución del agua durante el almacenamiento para los panes compuestos trigo-algarroba que retarde el envejecimiento.

La utilización de ácido ascórbico y SSL en los niveles aplicados no condujo a mejoras en el VE ni en la textura para los panes con 15 y 35% de harina de algarroba. En base los resultados obtenidos, el ácido ascórbico mostró un efecto negativo sobre la calidad

panadera en estos productos, que podría deberse a algún tipo de interacción con los polifenoles naturalmente presentes en la harina de algarroba y el gluten.

A pesar de las características panaderas inferiores de los panes compuestos respecto al pan de harina de trigo, las tres concentraciones de harina de algarroba dieron lugar a panes con buena aceptabilidad por parte de los consumidores. Esto puede deberse a que los mismos no asociaron a los panes evaluados con un pan “común de trigo”, sino con un pan “alternativo” o “no tradicional”. A su vez, mayor parte de los encuestados expresó no consumir frecuentemente productos con algarroba, indicando la baja presencia en el mercado de estos productos.

CAPITULO V

EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE ENZIMA TRANSGLUTAMINASA SOBRE MASAS Y PANES A BASE DE HARINAS DE TRIGO Y ALGARROBA

5.1. Caracterización reológica de las masas

5.1.1. Ensayos de perfil de textura

En la Figura 5.1 se grafican los resultados de TPA para las masas formuladas con distintos niveles de algarroba con y sin enzima transglutaminasa y nivel de agua farinográfica.

En primer lugar, se observa que la dureza, la elasticidad y la gomosidad de las masas sin TG se incrementaron con el aumento en el contenido de harina de algarroba. La cohesividad aumentó ligeramente aunque no hubo diferencias entre los distintos niveles de reemplazo. Estos resultados, en este caso de masas formuladas con agua farinográfica (contenido de agua óptimo), siguen en líneas generales la tendencia de los obtenidos para las masas formuladas según el Diseño Central Compuesto (Capítulo III).

En la masa control (sin algarroba) la enzima generó aumentos de dureza, elasticidad y gomosidad al ser utilizada en la menor concentración (TG1: 0,01%), pero no al utilizarse la mayor concentración (TG2: 0,1%). Por otro lado la cohesividad no se modificó significativamente con ninguno de los dos niveles de enzima. En diferentes estudios, Caballero et al. (2007) y Steffolani et al. (2010) informaron aumentos de la tenacidad y disminución de la extensibilidad de masas de harina de trigo con incorporación de TG, hecho que atribuyeron al incremento del entrecruzamiento en la matriz proteica y por tanto su fortalecimiento. Por otro lado Collar & Bollain (2004) también observaron un aumento en la elasticidad de masas obtenidas con harina de trigo aditivada con TG. Respecto al efecto causado por la enzima cuando la misma se aplicó en la mayor concentración (TG2), Basman et al. (2002) han indicado que los efectos sobre la reología de las masas son dependientes del nivel de enzima aplicado y que un excesivo nivel de la misma es contraproducente, conduciendo a menores niveles de absorción de agua y de estabilidad farinográfica y una disminución en la extensibilidad de la masa. Además, los mismos autores indicaron que los efectos de la enzima varían entre las masas preparadas con harinas provenientes de diferentes cultivares de trigo, siendo sus efectos más notorios cuando se trata de trigos blandos.

Al realizarse un ANOVA de dos vías se encontraron efectos significativos ($p < 0,05$) tanto del nivel de harina de algarroba como de la concentración de enzima utilizados, aunque la interacción entre ambos efectos sólo fue significativa para la variable cohesividad.

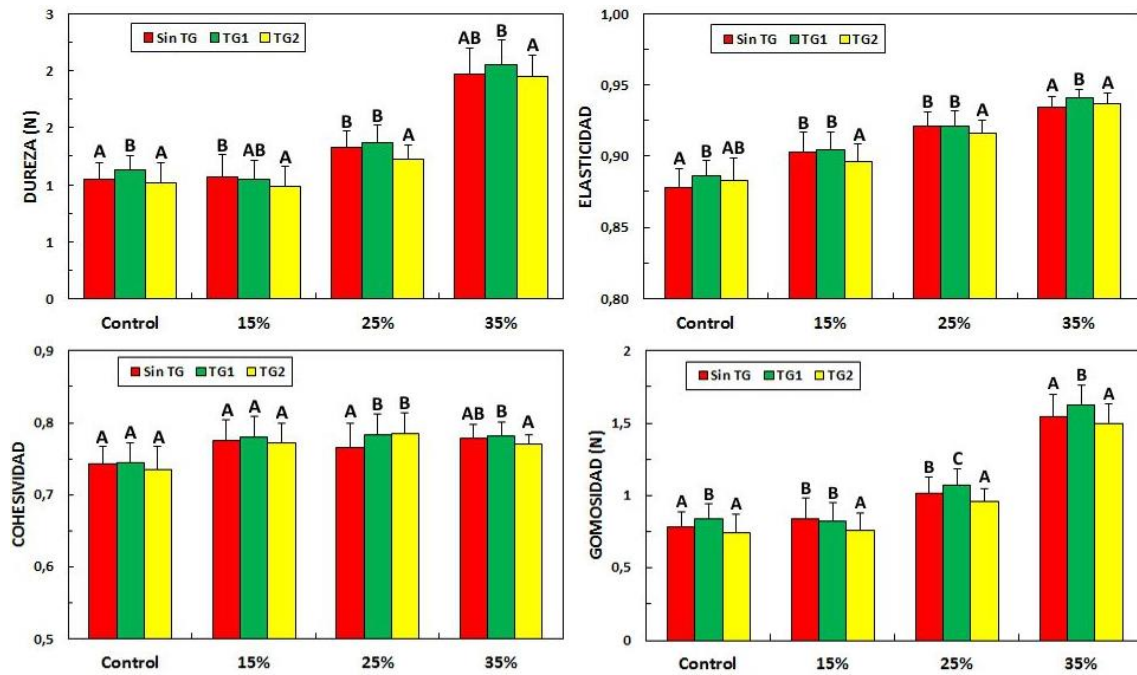


Figura 5.1. Parámetros texturales para las masas con y sin agregado de enzima transglutaminasa. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) dentro de cada grupo (mismo nivel de reemplazo con harina de algarroba).

Al agregar enzima a las masas con algarroba no se observaron grandes variaciones en los parámetros texturales. Se apreciaron tendencias a menores valores de dureza, elasticidad y gomosidad cuando se utilizó el mayor nivel de enzima (TG2), particularmente en el caso de los reemplazos con 15 y 25 % de algarroba, aunque no en todos los casos las diferencias llegaron a ser significativas.

Por lo expuesto se puede resumir que el efecto de la enzima TG sobre los parámetros texturales de las masas compuestas trigo-algarroba fue dependiente tanto de la concentración de enzima utilizada como del nivel de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba en la masa.

5.1.2. Ensayos de Análisis Mecánico Diferencial

5.1.2.1. Cálculo de los tiempos óptimos de mezclado

Los análisis por DMA se llevaron a cabo sobre las masas correspondientes al diseño de reemplazo parcial de harina descrito en la sección 2.2.2.1.1. Las mismas se prepararon en el Mezclador PolyLab QC como se indicó en 2.2.2.1.4.2 y se obtuvieron los tiempos óptimos de mezclado, que se define como el tiempo para alcanzar la máxima

consistencia de la masa. En la Figura 5.2 se muestran las curvas de mezclado (torque y temperatura en función del tiempo) obtenidas para las formulaciones control (A) y con 15% (B), 25% (C) y 35% (D) de reemplazo de harina de trigo por algarroba.

No se registraron diferencias significativas en los tiempos óptimos de mezclado entre las masas control y con 15 y 25% de harina de algarroba, siendo los valores promedio (\pm DS) para cada una $19,3 \pm 0,2$ min; $20,1 \pm 1,2$ min y $20,9 \pm 1,5$ min respectivamente, mientras que se registró un aumento significativo del mismo para la masa con 35% de algarroba ($28,5 \pm 1,0$ min).

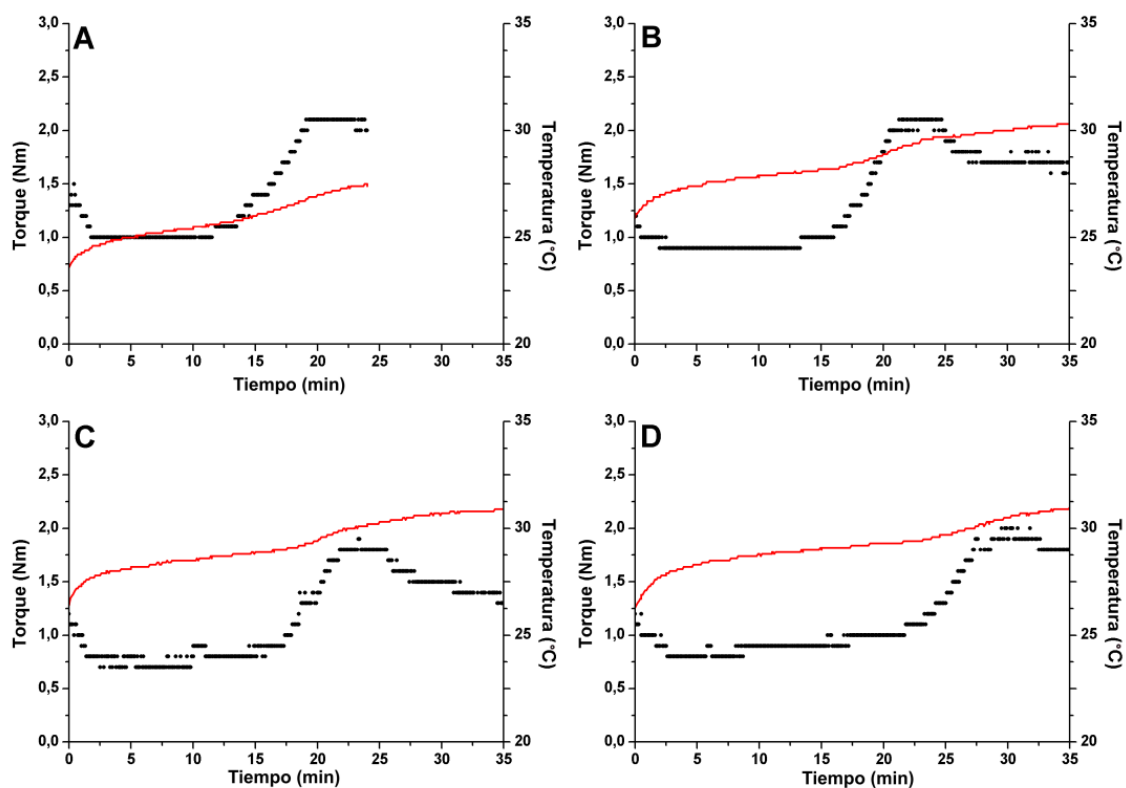


Figura 5.2. Curvas típicas de torque en función del tiempo (curvas de mezclado). Masa control (A) y de masas compuestas: 15% (B), 25% (C) y 35% (D). (—) Torque; (—) temperatura.

Aunque las masas se prepararon en un equipo diferente al farinógrafo, los valores promedio obtenidos para los tiempos óptimos de amasado de las masas control y con 25 y 35% de algarroba no resultaron significativamente diferentes por ambos métodos, sin embargo el tiempo óptimo calculado por el método farinográfico para la masa con 15% de algarroba resultó menor que el calculado con el mezclador. Dichos tiempos se

utilizaron para la preparación de las masas con y sin adición de enzima transglutaminasa (0,01 y 0,1% base harina).

5.1.2.2. Medida de los espectros mecánicos por DMA

Las masas preparadas según los tiempos óptimos determinados en 5.1.2.1 mostraron un comportamiento viscoelástico, con valores del módulo elástico (E') superiores a los del módulo viscoso (E'') en todo el rango de frecuencias ensayado. Esto indica una prevalencia de las características elásticas por sobre las viscosas y corrobora los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el reómetro oscilatorio con deformación radial (ítem 3.2.3).

En la Figura 5.3 se grafican los espectros mecánicos para las masas: control (A) y con 15% (B), 25% (C) y 35% (D) de harina de algarroba; en cada gráfica se pueden observar los espectros para cada formulación sin enzima transglutaminasa (Sin TG) y con la enzima adicionada en sus dos niveles (TG1 y TG2).

La incorporación de algarroba aumentó los valores de los módulos E' y E'' para todo el rango de frecuencias analizado en las masas sin TG, aunque los incrementos solo llegaron a ser significativos para la masa con 35% de harina de algarroba.

El efecto de la enzima no fue tan notorio en las masas con reemplazo con harina de algarroba como en la masa sin algarroba, donde la incorporación de enzima transglutaminasa en la menor concentración TG1 (0,01%) generó un incremento significativo en los valores de E' y E'' en todo el rango de frecuencias analizado. Al aplicar el nivel más alto de enzima, TG2 (0,1%), el efecto se revirtió parcialmente y no se registraron diferencias significativas en los módulos dinámicos respecto al control sin TG (Figura 5.3A).

En el caso de la formulación con un 35% de reemplazo con harina de algarroba se observó superposición de las curvas para las masas sin TG y con TG1 y TG2, que estaría indicando un escaso o nulo efecto de la enzima sobre los módulos elástico y viscoso en el rango de frecuencias evaluado.

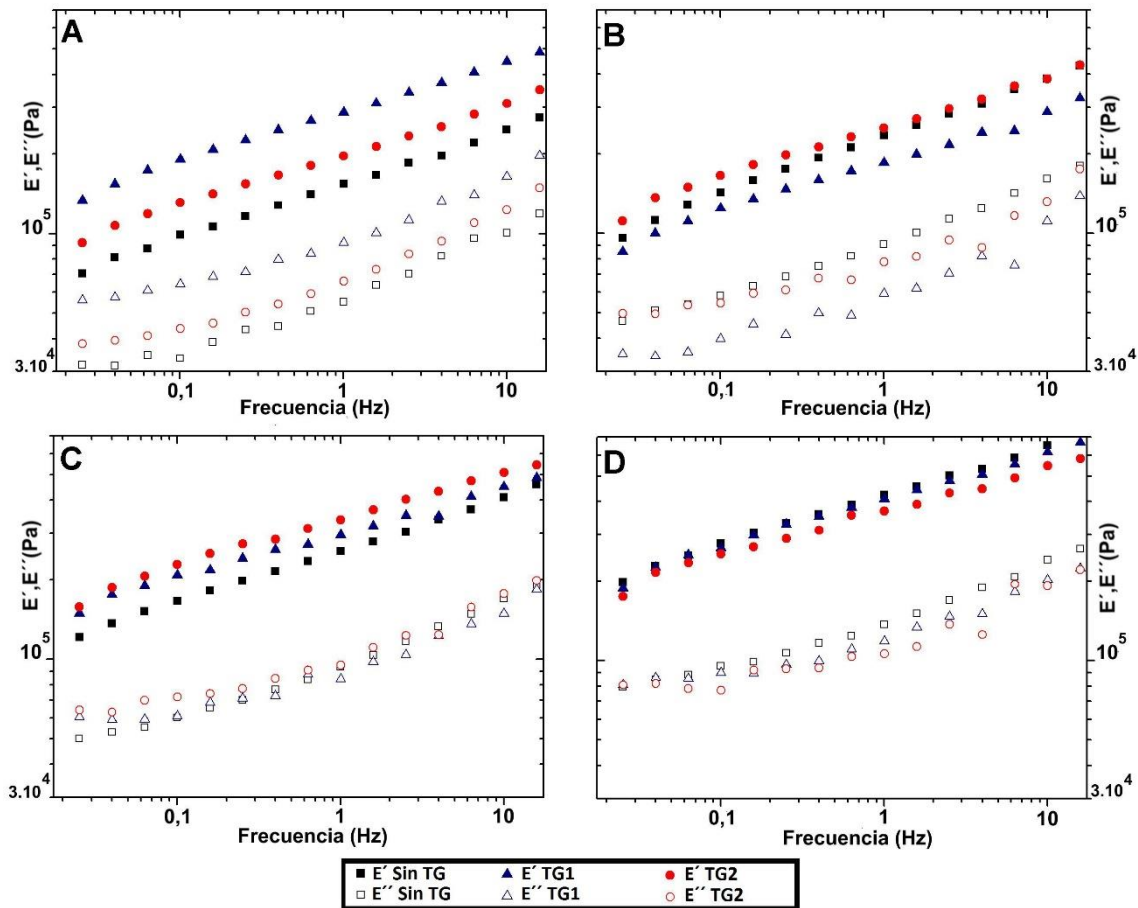


Figura 5.3. Espectros mecánicos obtenidos para las masas control (A) y con 15% (B), 25% (C) y 35% (D) y con diferentes niveles de enzima transglutaminasa.

Los resultados obtenidos de $\tan \delta$ para las masas con diferente cantidad de harina de algarroba y diferente nivel de enzima variaron entre 0,28 y 0,39 y se pueden observar graficados en la Figura 5.4. Los valores de $\tan \delta$ típicos para una solución concentrada de polímeros oscilan entre 0,2 y 0,3, mientras que los correspondientes a un gel son valores bajos, cercanos a 0,01. Una solución diluida presenta los valores más altos de tangente. Los valores medidos para las masas de pan a base de harina de trigo por lo general son inferiores a 0,5 indicando una predominancia del carácter elástico por sobre el viscoso en dichas muestras (Gómez, 2011; Correa, 2012; Salinas, 2013). Los resultados aquí mostrados concuerdan con los esperados para masa panaria.

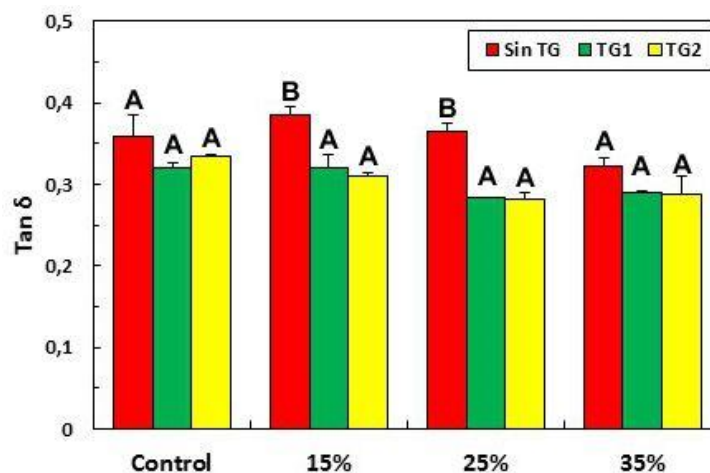


Figura 5.4. Tan δ (medido a 1Hz) para las masas con y sin agregado de enzima. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) dentro de cada grupo (mismo nivel de reemplazo con harina de algarroba).

Mediante un ANOVA de dos vías se corroboró que tanto el contenido de harina de algarroba como el nivel de enzima utilizados en las masas tuvieron un efecto significativo sobre los valores de la tan δ .

Por otra parte, al comparar las formulaciones sin TG entre sí no se registraron diferencias significativas en la tan δ entre las masas control y las masas con 15, 25 y 35% de reemplazo con harina de algarroba. El hecho de que la tan δ no se vea modificada significativamente con la incorporación de algarroba en las masas obtenidas en condiciones óptimas de cantidad de agua y tiempo de mezclado, indica que el balance entre las componentes viscosa y elástica se mantiene aproximadamente constante.

Para el caso de las masas sin algarroba (control), los valores medidos de tan δ disminuyeron al aplicar la enzima TG en ambas concentraciones, aunque estos cambios no llegaron a ser significativos. La aplicación de la enzima en ambas concentraciones produjo el mismo efecto en las masas con agregado de algarroba. La reducción en los valores de la tan δ al aplicar la enzima fue significativa para las masas con 15 y 25% de harina de algarroba pero no para las masas con el mayor reemplazo de harina.

Estos resultados indican que la enzima generó cambios en la estructura de las masas compuestas, dando lugar a matrices con mayor carácter elástico, lo que disminuye el valor de la tangente del ángulo de desfasaje. El efecto puede asociarse al incremento en

el entrecruzamiento proteico que puede producir la enzima y con ello aumentar el carácter elástico de la masa.

5.2. Caracterización microscópica de las masas por CSLM y SEM

Las micrografías obtenidas por CSLM que se muestran en la Figura 5.5 corresponden a las masas preparadas con cantidad de agua farinográfica y diferentes niveles de enzima TG, diferenciándose de las masas preparadas con cantidades de agua establecidas por el diseño central compuesto del Capítulo III (Figura 3.14),

La incorporación de algarroba generó una alteración de la matriz del gluten (que puede observarse en coloraciones verde-amarillentas debido a la tinción con FITC y Rod B), llevando a una pérdida progresiva de la estructura filamentosa y altamente entrecruzada al incrementar el reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba en la formulación (Figuras 5.5.A, 5.5.D, 5.5.G y 5.5.J); además puede apreciarse la ausencia de películas de gluten (que solo se observan en la masa control) con la incorporación de algarroba en la formulación.

En la masa con 35% de harina de algarroba la pérdida de la estructura filamentosa pareció total, y se observó un alto grado de agregación de las proteínas.

También se percibe en las imágenes correspondientes a las masas compuestas la presencia de partículas que serían de carácter proteico teñidas de color rojo por la Rod B; algunas de ellas se observan rodeadas por las hebras de gluten o adyacentes a estas. En la masa control la enzima TG modificó considerablemente la estructura. Cuando se incorporó en la menor concentración (0,01%), se observó una disminución de las zonas con presencia de films de gluten y un incremento de zonas con filamentos más gruesos (Figura 5.5.B). Al aplicar la mayor concentración de enzima (0,1%) se evidenció una importante agregación de las proteínas y una pérdida de la matriz filamentosa (Figura 5.5.C). Estas observaciones pueden asociarse a la acción de la enzima sobre las subunidades de alto peso molecular de gluteninas, sobre las que tiene mayor efecto debido a su alto contenido en lisina (Autio et al., 2005) y podría estar dando lugar a dichos agregados.

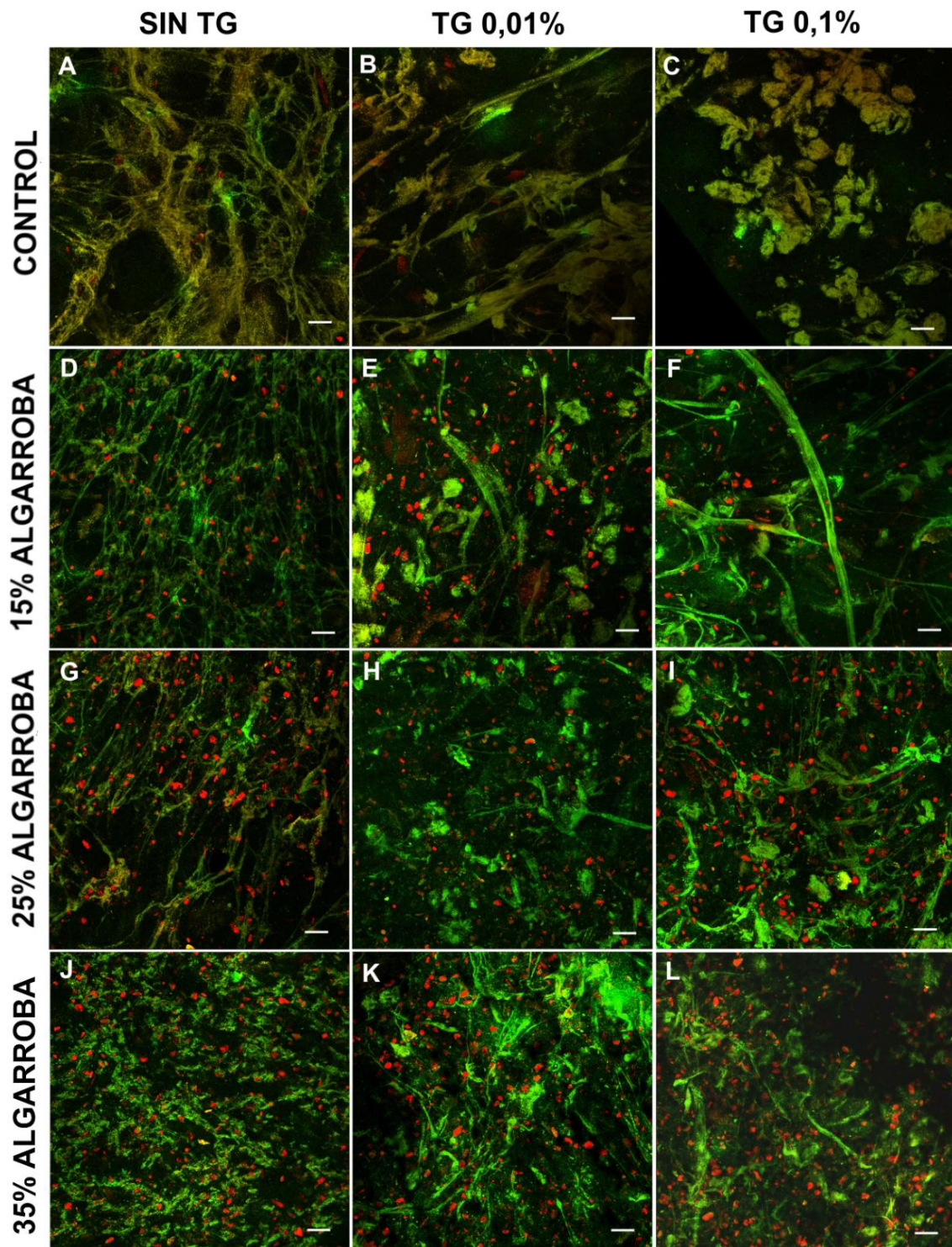


Figura 5.5. Micrografías obtenidas por CSLM para las masas trigo-algarroba con diferentes concentraciones de enzima TG. Barra = 200 μ m.

Como se mencionó anteriormente, para las masas con incorporación de algarroba no se observó el desarrollo de películas de gluten, aunque las masas con 15 y 25% de harina de algarroba mantuvieron una red fibrilar proteica. Estas masas mostraron (al igual que la masa control) la formación de filamentos más gruesos con la incorporación de la enzima en la formulación. Al aplicar la mayor concentración de enzima (Figuras 5.5.F y 5.5.I), a diferencia de lo observado en la masa sin algarroba, no se manifestó tan marcadamente la formación de los agregados proteicos antes mencionados. Se pudo observar el mantenimiento de una estructura parcialmente filamentosa, similar a la obtenida con el menor nivel de enzima.

En las masas con 35% de reemplazo (Figuras 5.5.J, 5.5.K y 5.5.L) la enzima pareció incrementar, al menos parcialmente, la presencia de filamentos proteicos, aunque con grosores aparentemente mayores a los observados para las masas con menor contenido de algarroba. La matriz proteica generada al incorporar la enzima resultó más parecida a la observada en las masas con menor cantidad de algarroba. Este incremento en la estructura fibrilar se condice con el incremento de la elasticidad en los ensayos de TPA observado en la masa con menor nivel de enzima.

Con el objeto de analizar más en detalle las estructuras mostradas en la Figura 5.5, se obtuvieron micrografías por SEM, que se comparan con las obtenidas por CSLM en las Figuras 5.6 y 5.7.

En la Figura 5.6 se muestran las imágenes obtenidas por SEM y por CSLM para las masas Control sin TG y con 0,01 (TG1) y 0,1% (TG2) de adición de enzima. Las observaciones realizadas por SEM y por CSLM son congruentes y permiten apreciar la formación de estructuras de films de gluten para la formulación control. Esto es indicativo de una red de gluten bien desarrollada.

Al incorporar la enzima en la menor concentración (0,01%) se mantuvo la capacidad de formar películas de gluten, aunque dichas estructuras parecieran ser menos cerradas en comparación con la masa sin TG. El cambio más importante en la estructura se observó con la mayor concentración de enzima (TG2), por ambas técnicas microscópicas se percibió la ausencia de films de gluten y un incremento de agregación de las proteínas, probablemente inducido por la enzima.

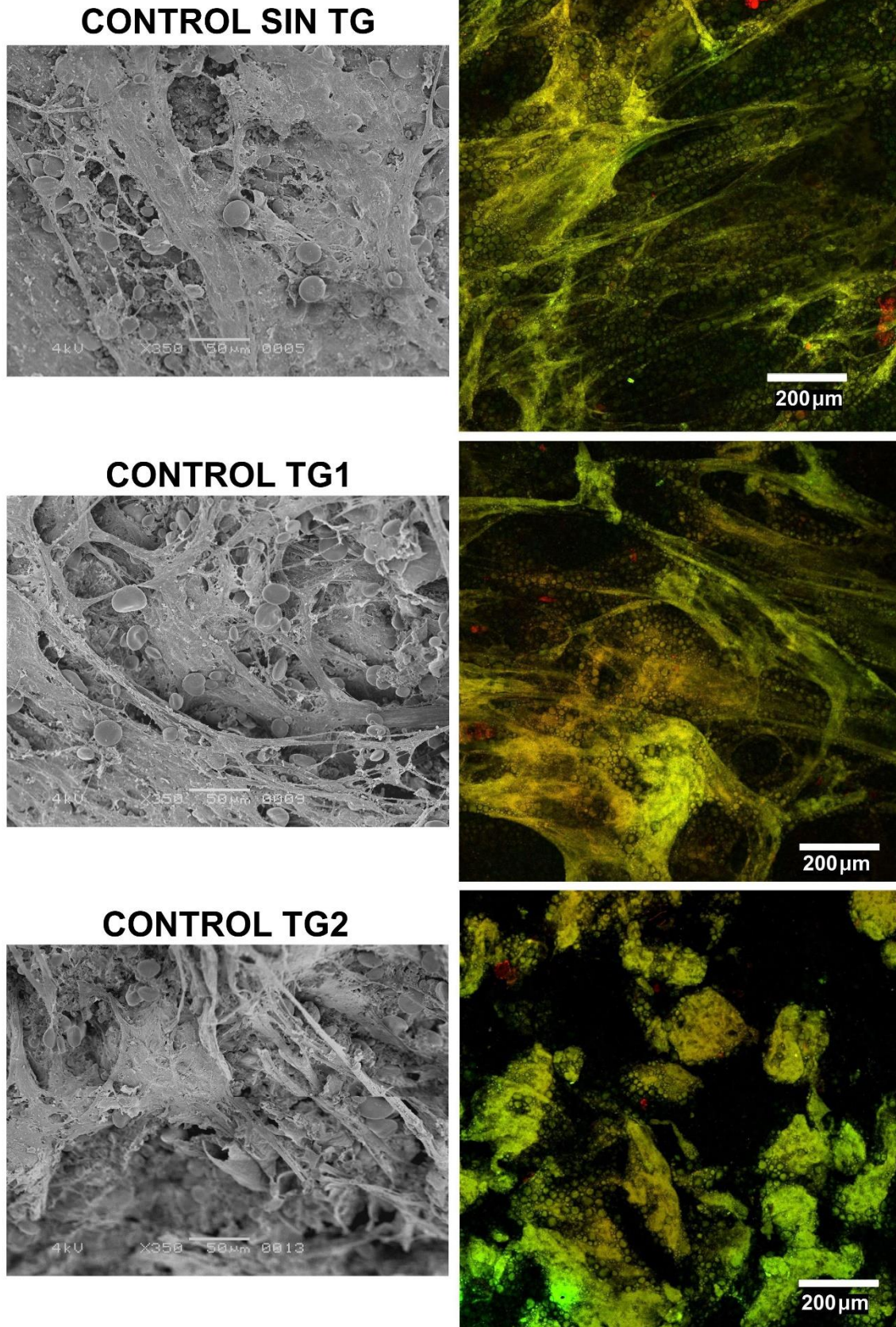


Figura 5.6. Microscopia SEM (izquierda) y CSLM (derecha) para masas control sin TG y con 0,01 y 0,1% de adición de TG. La barra corresponde a 50 μm en SEM y 200 μm en CSLM.

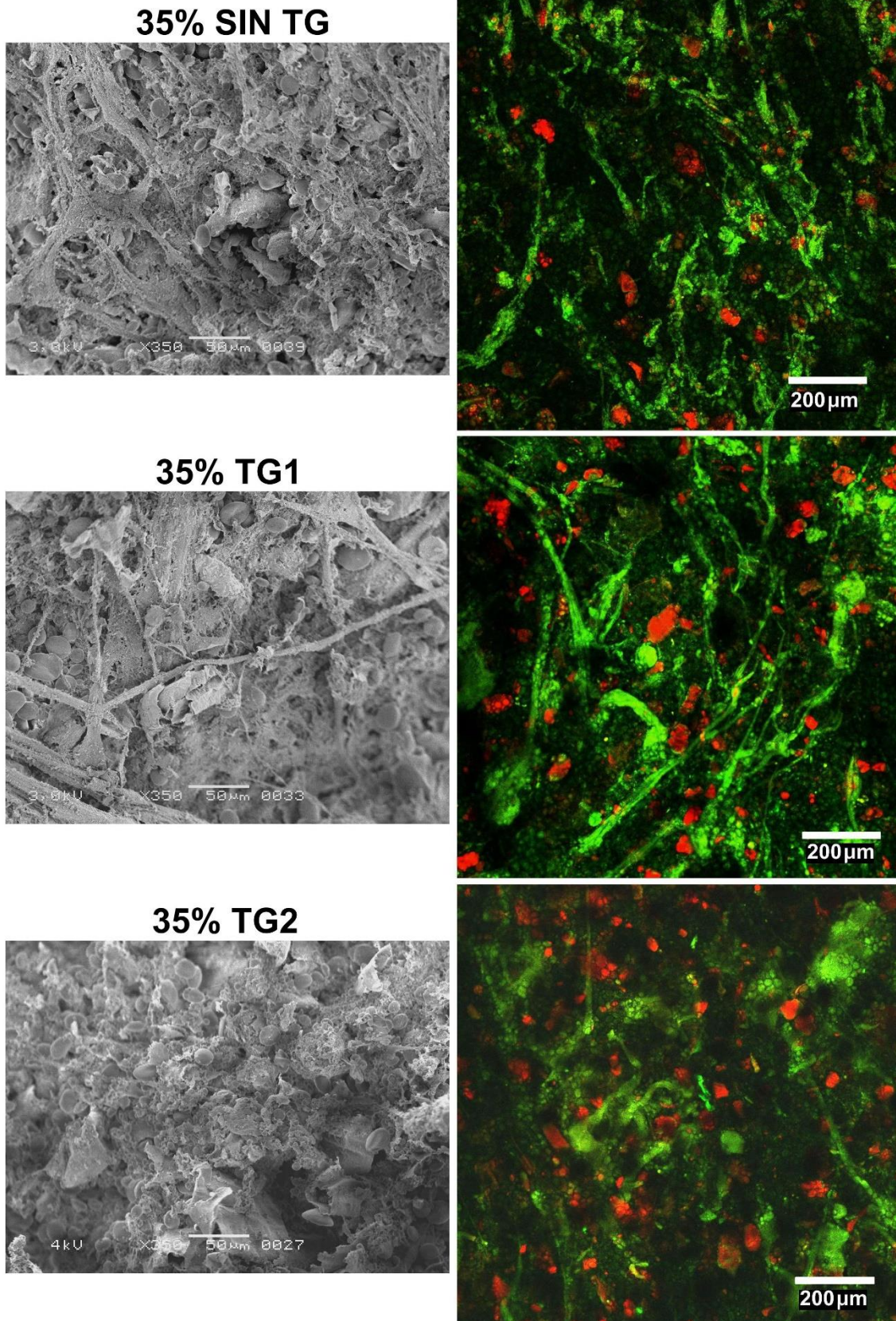


Figura 5.7. Microscopia SEM (izquierda) y CSLM (derecha) para masas con 35% de algarroba sin TG y con 0,01 y 0,1% de adición de TG. La barra corresponde a 50 μm en SEM y 200 μm en CSLM.

Las micrografías por SEM obtenidas para las masas con 35% de harina de algarroba (Figura 5.7) permiten apreciar, al igual que las obtenidas por CSLM, las diferencias microestructurales con las masas sin algarroba. Se destaca la presencia de los componentes provenientes de la algarroba en la masa. En las micrografías de SEM estos componentes corresponderían a estructuras de diversa morfología que no fueron observadas en las masas de la Figura 5.6. Algunas de esas estructuras presentaron bordes redondeados y tamaños levemente mayores a los de los gránulos de almidón y podrían corresponder a proteínas de la algarroba, mientras que otras mostraron variados tamaños y morfologías irregulares que corresponderían a fragmentos de fibra, provenientes de las vainas de algarroba.

La formación de films de gluten observada para la masa de trigo solo tuvo lugar en algunas zonas puntuales para la masa con 35% de algarroba y sin adición de transglutaminasa; esto solo se pudo percibir por SEM, ya que por CSLM no se observó formación de films en ninguna de las masas con 35% de algarroba. Con el agregado de la enzima en la menor concentración se pudo percibir una mayor presencia de estructuras fibrilares gruesas. Por otro lado, el mayor nivel de enzima pareció aumentar la agregación proteica pero sin la formación de las estructuras fibrilares antes mencionadas.

En general pudo percibirse para todas las formulaciones que el mayor nivel de enzima (TG2) produjo una marcada agregación de las proteínas del gluten.

5.3. Efecto de la temperatura en el comportamiento reológico de las masas

El objetivo de este ensayo fue estudiar el comportamiento reológico de las masas durante el calentamiento hasta una temperatura de 85 °C (temperatura cercana a la que se alcanza en el interior del pan durante el horneado) y su posterior enfriamiento.

Las masas con diferente contenido de algarroba mostraron ciertas diferencias en el comportamiento al ser sometidas a los ensayos dinámicos-oscilatorios de calentamiento y enfriamiento. En la Figura 5.8 se pueden observar los registros de E' y de la $\tan \delta$ obtenidos para las masas control (Figura 5.8.A), con 15% (Figura 5.8.B), con 25% (Figura 5.8.C) y con 35% de reemplazo de harina de trigo por harina de algarroba (Figura 5.8.D) durante las rampas de ascenso y descenso de temperatura. Además en cada figura se

pueden observar las curvas correspondientes a las masas sin TG y con 0,01% (TG1) y 0,1% (TG2) de adición de transglutaminasa.

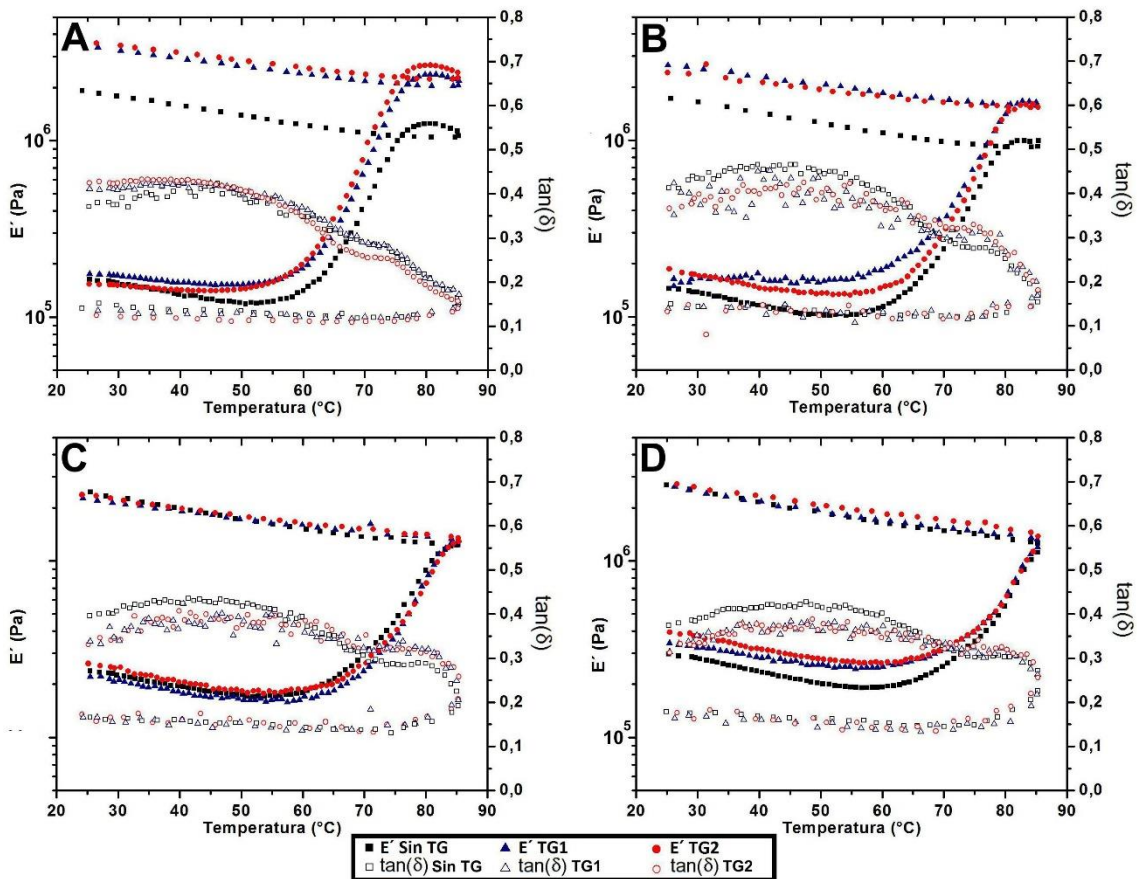


Figura 5.8. Rampas de calentamiento (5 °C/min) y enfriamiento (10 °C/min) típicas para las masas control (A) y con 15% (B), 25% (C) y 35% (D) de algarroba y diferentes niveles de enzima TG.

Al inicio del calentamiento se observó una disminución del módulo elástico y un incremento de la $\tan \delta$, que se asocia a una mayor movilidad de la matriz por el aumento en la energía cinética del sistema y a la ruptura de interacciones con la temperatura (Doğan, 2002).

Promediando la rampa de calentamiento, entre 50 y 70 °C dependiendo de la masa, el módulo E' comenzó a incrementarse y la $\tan \delta$ disminuyó indicando una prevalencia del carácter elástico por sobre el viscoso. Este comportamiento se puede asociar con la gelatinización parcial del almidón, que conduce a un incremento en la absorción de agua por parte de los gránulos y a la lixiviación de amilosa, sumado a la desnaturalización de

las proteínas (Campos et al., 1997). Puede observarse cualitativamente en las figuras que el incremento en E' y la disminución de la $\tan \delta$ comenzó a temperaturas levemente superiores a medida que se incrementó el contenido de harina de algarroba en las masas. Por otro lado, la masa control mostró un máximo de E' cercano a los 80 °C, pero el mismo se desplazó a temperaturas mayores a medida que se fue incrementando el contenido de harina de algarroba en la formulación.

El efecto de corrimiento de las temperaturas es comparable con lo informado por Salvador, Sanz, & Fizman (2006) en un estudio sobre masas de trigo adicionadas con sacarosa en niveles de 10-20 g/100 g de harina, es decir contenidos de azúcar similares a los aportados por la harina de algarroba en las formulaciones del presente trabajo (entre 7,5-23 g/100 g de harina de trigo o 6,4-14,9 g/100 g de harina total). A su vez, estos autores indicaron que el efecto no se debería únicamente a una reducción del agua disponible para la gelatinización al incrementar la concentración de azúcares, sino también a interacciones específicas entre los azúcares y la amilosa lixiviada y los gránulos parcialmente intactos. Estos resultados acompañan lo observado en los ensayos de DSC de las masas (Capítulo III), donde se registró el incremento de las temperaturas iniciales y de pico para la gelatinización del almidón conforme se incrementó el contenido de algarroba en las formulaciones.

Durante el enfriamiento, para todas las masas se registró un aumento del módulo elástico, al tiempo que la $\tan \delta$ se mantuvo prácticamente constante.

Puede apreciarse en las figuras que la aplicación de la enzima TG no pareció modificar considerablemente las temperaturas antes analizadas (temperatura a la que inicia el rápido aumento de E' , ni la temperatura de máximo E'). Por otro lado, durante el enfriamiento se observaron valores mayores en el módulo elástico con la adición de la enzima para las formulaciones sin harina de algarroba y las reemplazadas con 15% de harina de algarroba. Dicho incremento en E' no fue tan marcado en las masas con mayor contenido de algarroba (masas con 25 y 35% de reemplazo con harina de algarroba).

Luego del enfriamiento hasta 25 °C se realizaron barridos de frecuencia en el rango de viscoelasticidad lineal para evaluar las características viscoelásticas de las masas cocidas. Los espectros mecánicos se muestran en la Figura 5.9, donde se puede observar que todas las masas mostraron un comportamiento viscoelástico, con valores de E' mayores que E'' y una dependencia de los mismos con la frecuencia. Los módulos dinámicos

mostraron valores un orden superior a los registrados de los ensayos realizados para las masas antes del tratamiento térmico (Figura 5.3).

Al igual que lo observado para las masas antes del tratamiento térmico, la enzima pareció tener mayor efecto sobre las masas sin algarroba, incrementando los módulos E' y E'' en el rango de frecuencias evaluado, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas ($p > 0,05$). En el resto de las formulaciones los espectros mecánicos estuvieron prácticamente superpuestos para las masas con los diferentes niveles de TG aplicados.

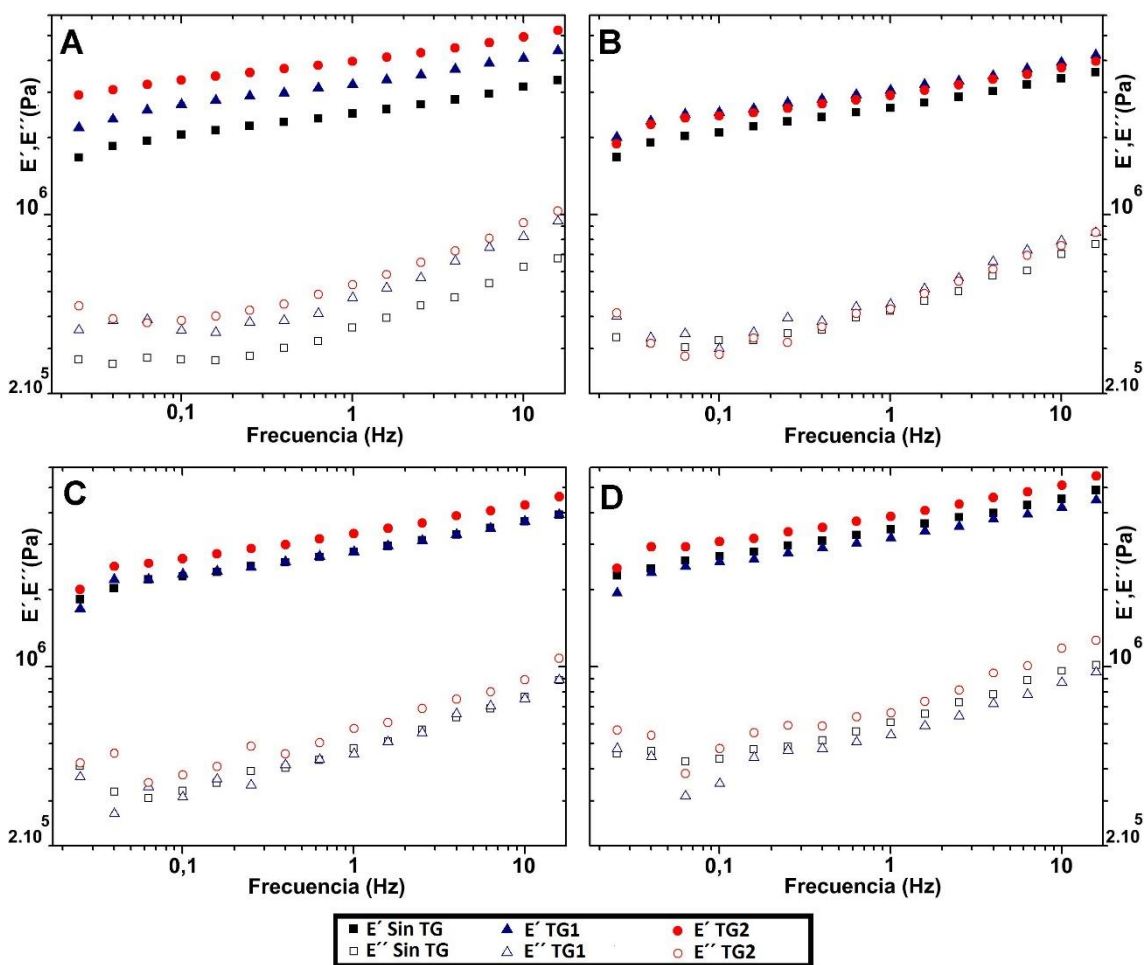


Figura 5.9. Espectros mecánicos obtenidos para las masas cocidas control (A) y con 15% (B), 25 (C) y 35% (D) de algarroba luego del proceso térmico.

En la Figura 5.10 se muestran los valores obtenidos de $\tan \delta$ (medida a 1 Hz) para las masas con diferente contenido de harina de algarroba y diferentes niveles de transglutaminasa luego del calentamiento/enfriamiento. Si se comparan las Figuras 5.10

y 5.4 se puede observar que los valores de la tangente del ángulo de desfasaje obtenidos para todas las muestras fueron considerablemente menores al someter la masa a la “cocción”, lo que indica una disminución de la viscosidad y un aumento del carácter elástico en los sistemas. Los valores de $\tan \delta$ estuvieron entre 0,13 y 0,18. La gelatinización parcial del almidón y la desnaturalización de las proteínas, generadas durante el calentamiento, explican este efecto.

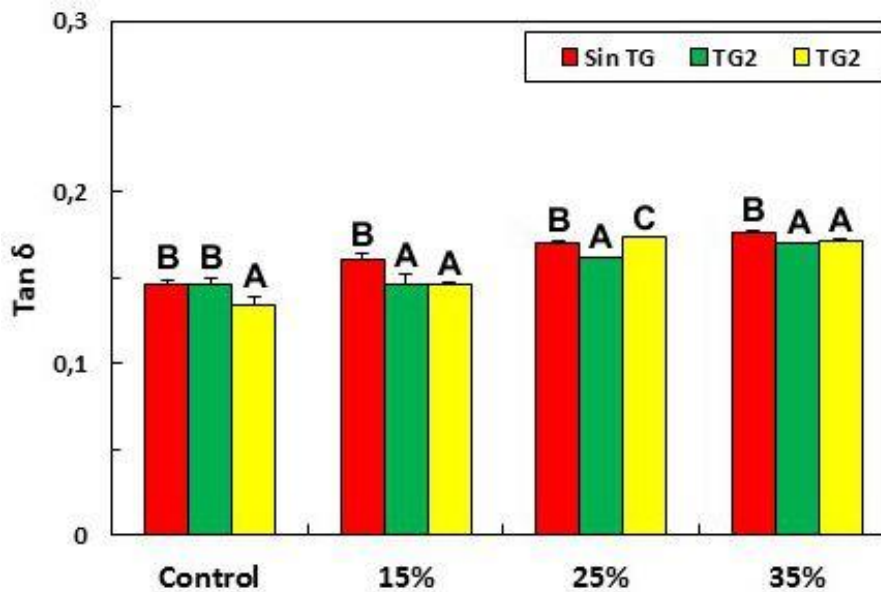


Figura 5.10. $\tan \delta$ para las masas “cocidas”, con y sin agregado de enzima. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) dentro de cada grupo (mismo nivel de reemplazo con harina de algarroba).

El análisis de varianza de dos vías indicó que hubo un efecto significativo tanto del reemplazo con harina de algarroba como del nivel de enzima utilizado en las masas sobre los valores de $\tan \delta$, y que la interacción entre ambos factores fue significativa.

Las masas con harina de algarroba presentaron matrices con valores significativamente más elevados de $\tan \delta$ ($p < 0,05$), indicando un incremento en el carácter viscoso y una pérdida de elasticidad en las mismas.

Se verificó una tendencia general a disminuir la $\tan \delta$ en las masas al adicionar la enzima.

Para la masa control el menor nivel de enzima (TG1) no modificó la $\tan \delta$, pero la misma disminuyó significativamente cuando se utilizó la mayor concentración (TG2). En las masas compuestas la enzima también disminuyó los valores de $\tan \delta$, excepto para la masa con 25% de harina de algarroba y el mayor nivel de enzima (TG2), donde se registró un aumento en dicho parámetro.

Puede por lo tanto apreciarse una tendencia similar de la enzima (incremento del carácter elástico) sobre las masas “crudas” y “cocidas”. Además cabe destacar que el rango de valores de la $\tan \delta$ para las masas cocidas fue más acotado que para las masas crudas. Este hecho se relaciona con la predominancia del almidón gelatinizado sobre la reología del sistema, como han indicado Campos et al. (1997) al evaluar el comportamiento reológico de masas de harina de trigo mediante ensayos oscilatorios con rampas de temperatura.

5.4. Evaluación de la calidad panadera

5.4.1. Volumen específico de los panes

En la Figura 5.11 se muestran los resultados obtenidos para el volumen específico de los panes control y con los tres niveles de reemplazo de harina de trigo por algarroba y los diferentes niveles de enzima transglutaminasa. Se observó, como ya se había verificado en el capítulo previo, un descenso en el VE ($p < 0,05$) al incrementar el grado de reemplazo con harina de algarroba.

Al analizar el efecto de la enzima para cada grado de reemplazo de harina se verificó que en el pan sin harina de algarroba la enzima no tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$). Tampoco se registraron cambios significativos en el VE para las formulaciones con 15% de algarroba al incorporar la enzima TG. Sobre la formulación con 25% de reemplazo la enzima en ambas concentraciones condujo a un ligero (aunque significativo) efecto positivo sobre el VE. En los panes con 35% de algarroba el uso de transglutaminasa no modificó significativamente el volumen específico respecto al del pan sin enzima.

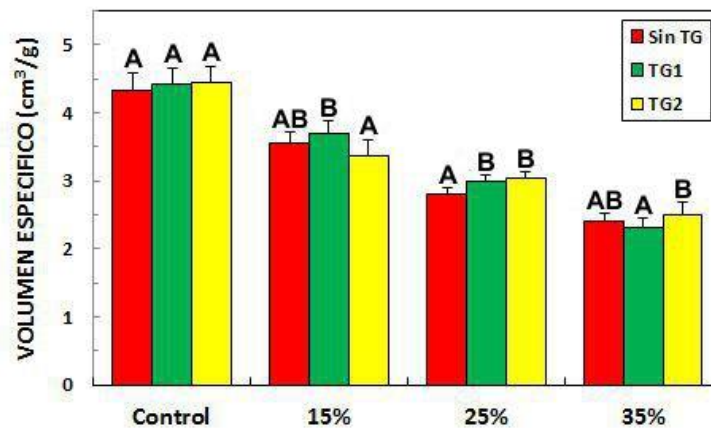


Figura 5.11. Volumen específico de los panes con diferente reemplazo de harina y nivel de enzima. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con el nivel de enzima aplicado dentro de cada grupo.

Estos resultados muestran que la acción de la enzima no es suficiente para contrarrestar el efecto que el incremento en el contenido de algarroba tiene sobre el volumen específico de los panes. Sin embargo en el caso de la formulación con 25% de reemplazo la utilización de la enzima transglutaminasa generó un aumento significativo del mismo. Cabe remarcar que si bien el efecto de la enzima sobre el volumen no fue positivo para todas las formulaciones, la misma no generó disminuciones significativas en los valores de dicho parámetro, como ha sido reportado por diversos autores para ciertos niveles de aplicación de la enzima en panes de trigo o panes compuestos a base de trigo y soja (Caballero et al., 2007; Rocca et al., 2012; Steffolani et al., 2010).

5.4.2. Textura de miga

En la Figura 5.12 se pueden observar los resultados obtenidos para dureza y cohesividad de miga de los panes control (sin algarroba), con 15, 25 y 35% de reemplazo y los correspondientes con niveles de enzima de 0,01 y 0,1% (base harina total).

El ANOVA de dos factores indicó que, tanto el contenido de algarroba como el nivel de enzima tuvieron un efecto significativo sobre la dureza y la cohesividad y que la interacción entre los factores fue significativa para ambos parámetros.

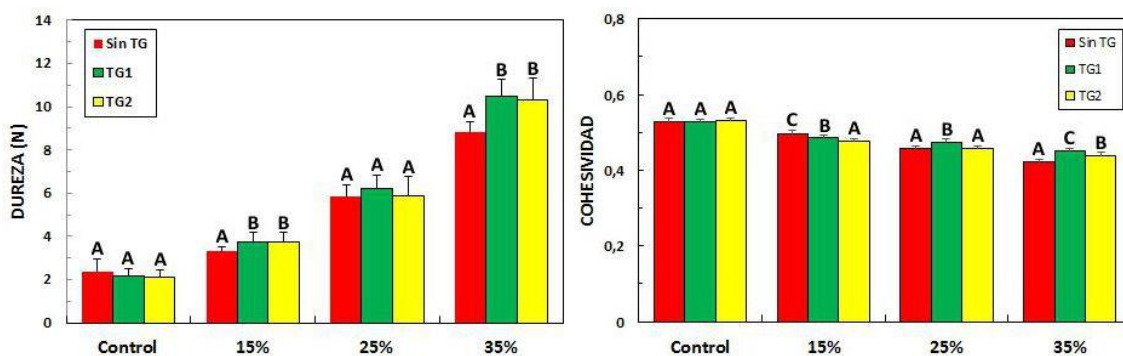


Figura 5.12. Parámetros texturales medidos en la miga de los panes con y sin agregado de enzima. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) dentro de cada grupo (mismo nivel de reemplazo con harina de algarroba).

Según el ANOVA de dos factores no se produjo un efecto significativo del nivel de enzima sobre la elasticidad. La dureza de la miga tendió a aumentar con el empleo de la enzima, aunque las diferencias no resultaron significativas en todos los casos.

Como ya se mencionó, el agregado de algarroba disminuyó la cohesividad de la miga de pan. La incorporación de enzima TG no logró compensar este efecto pero se observaron ligeros aumentos en los panes con 25 y 35% de reemplazo con harina de algarroba.

El efecto de la transglutaminasa sobre la calidad panadera de los productos obtenidos fue dependiente de la concentración con que se utilizó (0,01% - 0,1%), pero sobre todo del grado de reemplazo de harina de trigo con harina de algarroba en la formulación. Sin embargo los efectos logrados no fueron de la magnitud esperada ni de lo informado en sistemas análogos, por ejemplo en panes con incorporación de harina de soja, donde se obtuvieron incrementos considerables en el VE de las piezas de pan con el agregado de la enzima (Schoenlechner et al., 2013).

Las micrografías de masa mostraron un grado de agregación importante en presencia de TG aun cuando se conserve cierta estructura filamentosa. Además dicha agregación resultó más marcada en presencia de algarroba.

La disrupción de la red de gluten por los componentes de la algarroba (particularmente fragmentos de tejido de vaina y semilla, ricos en fibra, azúcares y proteínas) puede conducir a una menor eficiencia en la acción de la enzima que explique los resultados obtenidos. Por otro lado, si bien se ha informado que las proteínas de la algarroba son ricas en lisina y no son deficientes en glutamina (Felker & Bandurski, 1977), por lo que

podrían ser sustrato de la enzima, puede que dichos aminoácidos no se encuentren disponibles para la reacción de entrecruzamiento. Así lo han destacado otros autores (Djoullah, Djemaoune, Husson, & Saurel, 2015; Kang et al., 1994; Ribotta, Colombo, & Rosell, 2012), quienes indicaron que la eficiencia de la reacción de entrecruzamiento por la transglutaminasa en proteínas de leguminosas (soja y poroto), no solo dependen del contenido de lisina y glutamina de las mismas, sino también de la exposición de los residuos para actuar como sustrato. En sus ensayos consiguieron un mayor grado de entrecruzamiento al desnaturalizar las proteínas, logrando así una mayor exposición de los residuos para la acción de la enzima.

Por lo tanto, en el caso de las masas compuestas trigo-algarroba aditivadas con transglutaminasa, estarían teniendo lugar diferentes sucesos: por un lado el efecto de los componentes de la algarroba (especialmente la fibra y los azúcares) impidiendo un desarrollo normal de la red de gluten y por otro lado el efecto de la transglutaminasa (sobre todo cuando se aplica en la mayor concentración), que genera un excesivo entrecruzamiento sobre las proteínas del gluten y probablemente un escaso entrecruzamiento con las proteínas de la algarroba. En conjunto estos sucesos condujeron a la obtención de productos de menor calidad panadera por la incorporación de la harina de algarroba y que al ser aditivados con transglutaminasa no se pudo revertir dicha pérdida de calidad.

CONCLUSIONES PARCIALES

La adición de enzima transglutaminasa generó cambios significativos en las propiedades reológicas de las masas y esto puede estar directamente relacionado con los cambios generados por la misma en la matriz proteica. Los bajos niveles de enzima tendieron a incrementar el carácter elástico de las masas, mientras que el mayor nivel evaluado (0,1%) tendió a disminuir la dureza de las mismas.

La enzima pareció modificar los módulos elástico y viscoso de forma más importante en la masa de trigo que en las masas compuesta, según se verificó por los ensayos de DMA, aunque la tendencia en la $\tan \delta$ fue similar para las diferentes formulaciones con el agregado de la enzima (aumento del carácter elástico).

Por microscopía SEM y CSLM se verificó una mayor agregación proteica en las masas con el mayor contenido de enzima TG. Además se comprobó que las masas con incorporación de harina de algarroba prácticamente no presentan formación de films de gluten (característico de las masas de harina de trigo).

En el producto cocido, la acción de la enzima no fue tan notoria, hecho que puede asociarse a una mayor preponderancia en la reología de la matriz por parte del almidón gelatinizado. Los volúmenes específicos no mostraron grandes variaciones con la aplicación de la enzima, aunque en la formulación con 25% de harina de algarroba el incremento en el mismo fue significativo.

En resumen puede decirse que la incorporación de algarroba generó una matriz totalmente diferente a la de la masa control de trigo; la enzima aplicada en la mayor concentración fue contraproducente generando agregación proteica para ambas formulaciones (control y con 35% de algarroba); y que la utilización de 0,01% de enzima disminuyó levemente la presencia de films de gluten e incrementó el entrecruzamiento proteico de la masa de trigo, mientras que condujo a un mayor entrecruzamiento y a un engrosamiento de las fibras de gluten para la masa con 35% de algarroba.

La acción de la enzima no condujo a los efectos esperados en la recuperación de la red proteica, desmejorada por la presencia de los componentes de algarroba, por lo que no se recomienda su uso para mejorar la calidad de la masa y el pan en este tipo de sistemas mixtos.

CONCLUSIONES GENERALES

La harina de algarroba, proveniente de la molienda del fruto completo del algarrobo, resultó tener una composición con altos niveles de fibra (26,8%) y minerales (3,6%) y un contenido proteico (11,1%) levemente inferior a la harina de trigo.

El reemplazo parcial de harina de trigo por harina de algarroba generó cambios en las propiedades de absorción de agua en las mezclas, debido a las diferencias en la composición de las harinas.

El ajuste correcto del contenido de agua en las formulaciones de masa resultó ser un factor crucial para poder obtener masas “maquinables” (manejables desde el punto de vista tecnológico) y capaces de dar lugar a los panes. En este sentido los ensayos farinográficos, normalmente utilizados para obtener los valores de absorción de agua y tiempos de desarrollo para las harinas de trigo, permitieron determinar satisfactoriamente dichos parámetros para las mezclas de harina de trigo-harina de algarroba.

La harina de algarroba modificó las propiedades reológicas de las masas. La cohesividad se redujo al incrementar el contenido de algarroba, al igual que la elasticidad (especialmente con bajos contenidos de agua). La resiliencia aumentó en las masas con alto contenido de algarroba y niveles medios o bajos de agua. Las muestras con menor contenido de algarroba y mayor contenido de agua tuvieron mayores tiempos de relajación, indicando la formación de matrices viscoelásticas con comportamientos más cercanos a los de un sólido para dichas muestras. Los módulos dinámicos G' y G'' mostraron una tendencia similar a la observada para resiliencia.

La incorporación de harina de algarroba produjo cambios microestructurales significativos sobre las masas. Por CSLM pudo comprobarse que la presencia de los componentes de la algarroba condujo a la formación de matrices de gluten menos filamentosas y entrecruzadas y con mayor agregación. Este efecto se magnificó en las masas que presentaron niveles de agua inferiores a los de la absorción farinográfica y/o mayores contenidos de harina de algarroba. Por ensayos de relajación ^1H spin-spin se

verificó que el incremento del contenido de algarroba y la reducción de la cantidad de agua en las formulaciones condujo a matrices menos flexibles.

Por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se registró un aumento en las temperaturas de inicio y en las entalpías de gelatinización del almidón con la presencia de algarroba en las masas, al tiempo que se redujo el rango de temperaturas del pico de gelatinización. Este hecho es asignable a la presencia de fibra y glúcidos de menor peso molecular provenientes de la harina de algarroba.

Durante la fermentación las masas con mayor contenido de algarroba alcanzaron un menor volumen y necesitaron mayores tiempos para llegar a su límite de expansión.

La menor expansión durante el leudado de la masa condujo a que los panes con algarroba presentaran volúmenes específicos menores al del pan de trigo. También se vio afectada la estructura/alveolado de la miga; la presencia de algarroba produjo migas más compactas, con mayor cantidad de alveolos pequeños, indicando restricciones en la expansión de la masa durante el leudado, acompañando lo observado en las curvas de fermentación.

La miga de los panes con algarroba presentó mayor dureza y masticabilidad que la del pan control y a su vez, menores valores de elasticidad y cohesividad cuando el reemplazo de harina superó el 25%. El aumento de dureza se condice con la reducción del volumen de los panes y con las observaciones realizadas por CSLM de la miga, donde se pudo percibir la diferente composición de las paredes de los alveolos, con presencia de componentes fibrosos de la vaina de algarroba. Estos componentes se encuentran modificando la densidad de estas paredes y afectando por tanto la firmeza de las mismas. A su vez la presencia de estos componentes intercalados en la matriz de gluten y almidón concuerdan con la disminución de la cohesividad de la miga en estos panes.

Durante el almacenamiento la miga de los panes con algarroba mostraron menor grado de endurecimiento y por lo observado mediante medidas de rayos X y DSC se evidenció una menor retrogradación del almidón. Este hecho podría vincularse a una modificación

en la redistribución del agua durante el paso del tiempo con la presencia de los componentes de la algarroba y que estaría inhibiendo parcialmente los procesos de envejecimiento en los panes.

El ácido ascórbico (AA) tuvo un efecto negativo sobre la calidad de los panes compuestos trigo-algarroba, mientras que el SSL en los niveles aplicados (máximo establecido por el Código Alimentario Argentino para aditivar harinas) no condujo a mejoras significativas. Aunque el efecto casi nulo del ácido ascórbico en la mejora de la calidad panadera en el sistema mixto harina de trigo-harina de algarroba podría estar relacionado a la presencia de componentes minoritarios de la algarroba como los polifenoles, se debería realizar un estudio más profundo de la acción de este aditivo.

La utilización de enzima transglutaminasa modificó las propiedades reológicas y la microestructura de las masas. Se apreciaron tendencias a menores valores de dureza, elasticidad y gomosidad cuando se utilizó el mayor nivel de enzima. Los ensayos de DMA mostraron disminución de la $\tan \delta$ para las masas compuestas con la aplicación de la enzima. Por SEM y CSLM pudo registrarse que en general la enzima incrementó la agregación de las proteínas, sobre todo al aplicarse en altas concentraciones.

Si bien los productos obtenidos presentan características sensoriales muy diferentes al pan tradicional de trigo, las calificaciones obtenidas del panel sensorial indican un grado de aceptación considerable que se inscribe en las tendencias al consumo de productos más saludables.

A partir de mezclas de harina de trigo y algarroba se pudieron obtener productos saludables, con alto nivel de fibra y minerales, de aceptable calidad tecnológica aun a niveles de reemplazo de un 35% de harina de trigo por harina de algarroba. La menor calidad tecnológica se pudo relacionar con una distinta microestructura de la masa, en particular de la red de gluten, que influyó en las distintas etapas del proceso de panificación. Sin embargo, a pesar de que los aditivos de panadería convencionales no mejoraron los atributos de calidad, las formulaciones utilizadas, sin mejoradores, tuvieron una buena aceptación por parte del panel sensorial no entrenado.

BIBLIOGRAFIA

- AACC International. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th ed. American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, 2000.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Sosulski, F. W., Youssef, M. M., & Adel Y. Shehata, A. (1993). Selected nutritional, physical and sensory characteristics of pan and fiat breads prepared from composite flours containing fababean. *Plant Foods for Human Nutrition*, 44, 227-239.
- Aedo Bendek, R. A. (2007). Factibilidad técnico-económica de generar productos alimenticios a partir del fruto de Algarrobo Chileno (*Prosopis chilensis* Mol. Stuntz) para la alimentación humana. Universidad Austral de Chile.
- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B. E., & Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 3(3), 1-6.
- Armero, E (1999). Optimization of hydrocolloid addition to improve wheat bread dough functionality: a response surface methodology study. *Food Hydrocolloids*, 13, 467-475.
- Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 317S-325S.
- Attemburrow, G. E., Goodband, R. M., Taylor, L. J., & Lillfordt, P. J. (1989). Structure, Mechanics and Texture of a Food Sponge. *Journal of Cereal Science*, 9, 61-70.
- Atwell W. A., Hood L. F., Lineback D. R., Varriano-Marston E., Zobel H. F. (1988). The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Food World*, 33, 306-311.
- Autio, K., Kruus, K., Knaapila, A., Gerber, N., Flander, L., & Buchert, J. (2005). Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 1039-1045.
- Ayo, J. A. (2001). The Effect of Amaranth Grain Flour on the Quality of Bread. *International Journal of Food Properties*, 4(2), 341-351.
- Baik M. Y., Chinachoti P. (2000). Moisture redistribution and phase transition during bread staling. *Cereal Chemistry*, 77, 484-488.
- Barba de la Rosa, A. P., Frias-Hernández, J. T., Olalde-Portugal, V., & González Castañeda, J. (2006). Processing, Nutritional Evaluation, and Utilization of Whole Mesquite Flour (*Prosopis laevigata*). *Journal of Food Science*, 71(4), S315-S320.

- Barberis, N. A. (2014). Evolución y perspectiva mundial y nacional de la producción y el comercio de trigo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). ISSN online 1851-7994.
- Basman, A., Köksel, H., & Ng, P. K. (2002). Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. *European Food Research and Technology*, 215(5), 419-424.
- Basman, A., Kösel, H., & Ng, P. K. W. (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.
- Becker, R., Sayre, R. N., & Saunders, R. M. (1984). Semiarid legume crops as protein resources. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 931-938.
- Belton P.S. (1999). On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 29, 103-107.
- Belton P.S. (2003). The molecular basis of dough rheology. Capítulo 13 en *Bread making Improving Quality*. Editado por Stanley P. Cauvain. Publicado por Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra.
- Besbes, E., Jury, V., Monteau, J. Y., & Le Bail, A. (2014). Effect of baking conditions and storage with crust on the moisture profile, local textural properties and staling kinetics of pan bread. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 658-666.
- Bock, J. E., & Damodaran, S. (2013). Bran-induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten dough studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 146-155.
- Boyer J, Liu RH. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(5), 1-15.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1994). Composition and potential uses of mesquite pods (*Prosopis pallida* L): comparison with carob pods (*Ceratonia siliqua* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(3), 303-306.
- Bravo, L., Grados, N., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of syrups and dietary fiber obtained from mesquite pods (*Prosopis pallida* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1727-1733.

- Caballero, P. A., Gómez, M., & Rosell, C. M. (2007). Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *European Food Research and Technology*, 224(5), 525-534.
- Cadden, A. M., Sosulski, F. W., & Olson, J. P. (1983). Physiological responses of rats to high fiber bread diets containing several sources of hulls or bran. *Journal of Food Science*, 48(4), 1151-1156.
- Campbell G.M. (2003). Bread aeration. Capítulo 17 en *Breadmaking Improving Quality*. Editado por Stanley P. Cauvain. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra.
- Campos, D. T., Steffe, J. F., & Ng, P. K. W. (1997). Rheological behavior of undeveloped and developed wheat dough. *Cereal Chemistry*, 74(4), 489-494.
- Cardozo, M. L., Ordoñez, R. M., Zampini, I. C., Cuello, A. S., Dibenedetto, G., & Isla, M. I. (2010). Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non conventional foods: Prosopis flour. *Food Research International*, 43(5), 1505-1510.
- Carson, L., Setser, C., & Sun, X. S. (2000). Sensory characteristics of sorghum composite bread. *International journal of food science & technology*, 35(5), 465-471.
- Cauvain S.P. (2002). Pan: el producto (Capítulo1); Procesos de panificación (Capítulo 2). En: *Fabricación de pan* editado por Cauvain, S.P. y Young, L.S. Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España.
- Cauvain, S., & Young, L. (2001). Improvers. En: *Baking problems solved* (1st ed., pp. 52-62). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra.
- Chantaro, P., Pongsawatmanit R. (2010). Influence of sucrose on thermal and pasting properties of tapioca starch and xanthan gum mixtures, 98(1), 44-50.
- Cheftel, J. C., & Cheftel, H. (1976). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos* (volumen 1). Technique et Documentation. Paris, Francia.
- Chiavaro, E., Vittadini, E., Musci, M., Bianchi, F., & Curti, E. (2008). Shelf-life stability of artisanally and industrially produced durum wheat sourdough bread ("Altamura bread"). *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 58-70.
- Chinachoti, P., & Steinberg, M. P. (1986). Crystallinity of Sucrose by X-ray Diffraction as Influenced by Absorption versus Desorption, Waxy Maize Starch Content, and Water Activity. *Journal of Food Science*, 51(2), 456-459.

- Cho, M. K., & Lee, W. J. (1996). Preparation of high-fiber bread with barley flour. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 28(4), 702-706.
- Chung-Hee, R., & Sun-Young, K. (2005). Study on Bread-making Quality with Barley Sourdough in Composite Bread. *Korean Journal of Food and Cookery Science*, 21(5), 733-741.
- Coda, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2010). Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 236-245.
- Código Alimentario Argentino (2014).
- Collar, C., & Bollaín, C. (2004). Impact of microbial transglutaminase on the viscoelastic profile of formulated bread doughs. *European Food Research and Technology*, 218(2), 139-146.
- Cornish, G. B., Bekes, F., Allen, H. M., & Martin, D. J. (2001). Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. *Crop and Pasture Science*, 52(12), 1339-1348.
- Correa, M. J. (2012). Efecto de celulosas modificadas y pectinas sobre la microestructura y atributos de calidad de la masa panaria (Tesis Doctoral). Facultad de Cs. Exactas (UNLP), La Plata, Argentina.
- Correa, M. J., & Ferrero, C. (2015). Thermal behaviour of wheat starch and flour at different water levels: effect of pectins, modified celluloses and NaCl. *Starch - Stärke*, 67, 338-347.
- Correa, M. J., Añón, M. C., Pérez, G. T., & Ferrero, C. (2010). Effect of modified celluloses on dough rheology and microstructure. *Food Research International*, 43, 780–787.
- Correa, M. J., Ferrer, E., Añón, M. C., & Ferrero, C. (2014). Interaction of modified celluloses and pectins with gluten proteins. *Food Hydrocolloids*, 35, 91-99.
- Czuchajowska Z., Pomeranz Y. (1989). Differential scanning calorimetry, water activity, and moisture content in crumb center and near-crust zones of bread during storage. *Cereal Chemistry*, 66, 305-309.

- Del Valle, F. R., Escobedo, M., Muñoz, M. J., Ortega, R., & Bourges, H. (1983). Chemical and Nutritional Studies on Mesquite Beans (*Prosopis juliflora*). *Journal of Food Science*, 48, 914-919.
- Dengate H.N. (1984). Swelling, pasting and gelling of wheat starch. *Advances in Cereal Science and Technology*, 6, 49-82.
- Dervas, G., Doxastakis, G., Hadjisavva-zinoviadi, S., & Trianta, N. (1999). Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. *Food Chemistry*, 66, 67-73.
- Di Luzio, N. R., Williams, D. L., McNamee, R. B., & Malshet, V. G. (1980). Comparative evaluation of the tumor inhibitory and antibacterial activity of solubilized and particulate glucan. En: *Cancer Chemo-and Immunopharmacology* (pp. 165-172). Springer Berlin Heidelberg.
- Diplock, A. T., Agget, P. J., Ashwell, M., Borner, F., Fern, E. B., & Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *The British journal of nutrition*, 81, S1-S27.
- Djoullah, A., Djemaoune, Y., Husson, F., & Saurel, R. (2015). Native-state pea albumin and globulin behavior upon transglutaminase treatment. *Process Biochemistry*, 50(8), 1284-1292.
- Dobraszczyk, B.J, & Morgenstern, M.P. (2003). Rheology and the breadmaking process. *Journal of Cereal Science*, 38(3), 229-245.
- Doğan, İ. S. (2002). Dynamic rheological properties of dough as affected by amylases from various sources. *Food/Nahrung*, 46(6), 399-403.
- Dougherty M, Sombke R, Irvine J, & Rao CS. (1988). Oat fibers in low calorie breads, soft-type cookies, and pasta. *Cereal foods world (USA)*, 33, 424-427.
- Doxastakis, G., Zafiriadis, I., Irakli, M., Marlani, H., & Tananaki, C. (2002). Lupin, soya and triticale addition to wheat flour doughs and their effect on rheological properties. *Food Chemistry*, 77, 219-227.
- Dreher, M. L. (2001). Dietary Fiber Overview. En S. S. Cho (Ed.), *Handbook of dietary fiber* (1er ed., pp. 1–16). Marcel Dekker, Inc.
- Eddy, N. O., Udofia, P. G., & Eyo, D. (2007). Sensory evaluation of wheat / cassava composite bread and effect of label information on acceptance and preference. *African Journal of Biotechnology*, 6(October), 2415-2418.

- Eliasson A.C. (2003). Starch structure and bread quality. Capítulo 7. En: *Breadmaking Improving Quality*. Editado por Stanley P. Cauvain. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra.
- Enko, J., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2015). Influence of the interactions between tea (*Camellia sinensis*) extracts and ascorbic acid on their antioxidant activity: analysis with interaction indexes and isobolograms. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(8), 1234-1242.
- Escudero Álvarez, E., & González Sánchez, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 61-72.
- Ewart J.A.D. (1989). Hypothesis for how linear glutenin holds gas in dough. *Food Chemistry*, 32, 135-150.
- FAO (2015). Nota informativa de la FAO sobre la oferta y la demanda de cereales. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/> (Accedido 28/11/2015).
- FDA (2013). Guidance for Industry: A Food Labeling Guide (10. Appendix B: Additional Requirements for Nutrient Content Claims). Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm064916.htm>. Accedido 14/12/2015.
- Felker, P., & Bandurski, R. (1977). Protein and amino acid composition of tree legume seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 791-797.
- Felker, P., Takeoka, G., & Dao, L. (2013). Pod Mesocarp Flour of North and South American Species of Leguminous Tree *Prosopis* (Mesquite): Composition and Food Applications. *Food Reviews International*, 29(1), 49-66.
- Fenn, D., Lukow, O. M., Humphreys, G., Fields, P. G., & Boye, J. I. (2010). Wheat-Legume Composite Flour Quality. *International Journal of Food Properties*, 13(April 2013), 381-393.
- Ferrero, C., Zaritzky, N. E. (2000). Effect of freezing rate and frozen storage on starch-sucrose- hydrocolloid systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(14), 2149-2158.
- Funami, T., Nakauma, M., Noda, S., Ishihara, S., Asai, I., Inouchi, N., & Nishinari, K. (2008). Effects of some anionic polysaccharides on the gelatinization and retrogradation behaviors of wheat starch: Soybean-soluble polysaccharide and gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1528-1540.

- Galera, F. M. (2000). Las especies del género *Prosopis* (Algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico (1.a ed.). Córdoba, Argentina.
- Gan Z., Ellis P.R., & Schofield J.D. (1995). Mini review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, 21, 215-230.
- Gan, Z., Galliard, T., Ellis, P. R., Angold, R. E., & Vaughan, J. G. (1992). Effect of the outer bran layers on the loaf volume of wheat bread. *Journal of Cereal Science*, 15, 151-163.
- Garcia, M. O. (2005). Perfil descriptivo de la cadena de trigo. Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos – Dirección Nacional de Mercados – Dirección de Mercados Agroalimentarios. 1-20.
- Gelroth, J., & Ranhotra, G. S. (2001). Food uses of fiber. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 435-452.
- Ghiasi K., Hosney R. C., & Varriano-Marston E. (1982). Effects of Flour Components and Dough Ingredients on Starch Gelatinization. *Cereal Chemistry*, 60 (1), 58-61.
- Giménez, M. A., Drago, S. R., De Greef, D. M., González, R., Lobo, M. O., & Samman, N. C. (2012). Rheological, functional and nutritional properties of wheat/broad bean (*Vicia faba*) flour blends for pasta formulation. *Food Chemistry*, 134(1), 200-206.
- Glei, M., Kirmse, A., Habermann, N., Persin, C., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutrition and cancer*, 56(2), 182-192.
- Gomes, P. (1961). "A Algarobeira", Río de Janeiro, Servicio de Informacao Agrícola, pp 49.
- Gómez, A. (2011). Efecto de distintos emulsificantes sobre la microestructura de la masa y su relación con la calidad de productos de panificación. Tesis Doctoral. Facultad de Cs. Exactas (UNLP), La Plata, Argentina.
- González Galán, A., Duarte Corrêa, A., Patto de Abreu, C. M., & Piccolo Barcelos, M. de F. (2008). Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis* spp. procedente de Bolivia y Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(3), 309-315.

- Gordon, D. T. (1999). Defining dietary fiber-a progress report. *Cereal Foods World*, 44(5), 336.
- Grados, N., & Cruz, G. (1996). New approaches to industrialization of algarrobo (*Prosopis pallida*) pods in Peru. *Prosopis: Semiarid fuelwood and forage tree*, 3, 25-42.
- Gray J. A., Bemiller J. N. (2003). Bread Staling: Molecular Basis and Control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 1-21.
- Hallén, E., İbanoğlu, Ş., & Ainsworth, P. (2004). Effect of fermented/germinated cowpea flour addition on the rheological and baking properties of wheat flour, 63(2), 177-184.
- Hassan, B. H., Alhamdan, A. M., Elansari, A. M. (2005). Stress relaxation of dates at khalal and rutab stages of maturity. *Journal of Food Engineering*, 66: 439-445.
- He H. & Hosney R. C. (1990). Changes in bread firmness and moisture during long term storage. *Cereal Chemistry*, 67, 603-605.
- Hefnawy, T., El-Shourbagy, G. A., & Ramadan, M. F. (2012). Impact of adding chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour to wheat flour on the rheological properties of toast bread. *International Food Research Journal*, 19(2), 521-525.
- Hosney, R. C. & Rogers, D. E. (1990). The formation and properties of wheat flour doughs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 29(2), 73-93.
- Hug-Iten, S., Handschin, S., Conde-Petit, B., & Escher, F. (1999). Changes in starch microstructure on baking and staling of wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 32(5), 255-260.
- Jane J. (2004). Starch: Structure and Properties. Capítulo 7. En: Chemical and functional properties of food saccharides. Editado por Piotr Tomasik. CRC PRESS LLC. Boca Raton -Washington, D.C, Estados Unidos.
- Jaros, D., Partschfeld, C., Henle, T., & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of texture studies*, 37(2), 113-155.
- Jeffrey G. A., & Saenger W. (1994). *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, Berlin.
- Jovanovich, G. (1997). Estudio de las interacciones entre almidón y lípidos en harina de trigo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

- Joye, I. J., Lagrain, B., & Delcour, J. a. (2009). Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking - A review. *Journal of Cereal Science*, 50(1), 11-21.
- Kajla, P., Sharma, A., & Sood, D. R. (2014). Flaxseed—a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1857-1871.
- Kamel, B., & Ponte J. (1993). Emulsifiers in backing. En: *Advances in Baking Technology*. Eds. Kamel B.S., Stauffer C.E. Blackie Academic & Professional (NY, EUA), pp. 179-222.
- Kang, I. J., Matsumura, Y., Ikura, K., Motoki, M., Sakamoto, H., & Mori, T. (1994). Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), 159-165.
- Karlsson, R., Svalov, Olered, R., & Eliasson, a. C. (1983). Changes in starch granule size distribution and starch gelatinization properties during development and maturation of wheat, barley and rye. *Starch - Stärke*, 35(10), 335-340.
- Katina, K. (2003). High-fibre baking. En *Bread making improving quality*.
- Katina, K., Salmenkallio-Marttila, M., Partanen, R., Forssell, P., & Autio, K. (2006). Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 39(5), 479-491.
- Kim S. K., D' Appolonia B. L. (1977). Bread staling studies. III. Effects of pentosans ondough, bread and bread staling rate. *Cereal Chemistry*, 54, 225-229.
- Kim, E. H. J., Petrie, J. R., Motoi, L., Morgenstern, M. P., Sutton, K. H., Mishra, S., & Simmons, L. D. (2008). Effect of Structural and Physicochemical Characteristics of the Protein Matrix in Pasta on In Vitro Starch Digestibility. *Food Biophysics*, 3(2), 229-234.
- Krystallis, A., Maglaras, G., & Mamalis, S. (2008). Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods. *Food Quality and Preference*, 19(6), 525-538.
- Lau, T. C., Chan, M. W., Tan, H. P., & Kwek, C. L. (2012). Functional food: A growing trend among the health conscious. *Asian Social Science*, 9(1), 198-208.
- Le-Bail, A., Boumali, K., Jury, V., Ben-Aissa, F., & Zuniga, R. (2009). Impact of the baking kinetics on staling rate and mechanical properties of bread crumb and degassed bread crumb. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 235-240.

- Le-Bail, A., Leray, G., Perronnet, A., & Roelens, G. (2011). Impact of the chilling conditions on the kinetics of staling of bread. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 13-19.
- Lezcano, E.P. (2011). Cadena de la Harina de Trigo. *Alimentos Argentinos – Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*. 1-12.
- Liatis, S., Tsapogas, P., Chala, E., Dimosthenopoulos, C., Kyriakopoulos, K., Kapantais, E., & Katsilambros, N. (2009). The consumption of bread enriched with betaglucan reduces LDL-cholesterol and improves insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism*, 35(2), 115-120.
- Lima I., Singh R.P. (2001). Viscoelastic behaviour of fried potato crust. *Journal of Texture Studies*, 32, 131-141.
- Lindahl, L., & Eliasson, A. C. (1986). Effects of wheat proteins on the viscoelastic properties of starch gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(11), 1125-1132.
- Lindsay, M. P., & Skerritt, J. H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure–function perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 10(8), 247-253.
- Linlaud, N., Ferrer, E., Puppo, M. C., & Ferrero, C. (2011). Hydrocolloid interaction with water, protein, and starch in wheat dough. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(2), 713-719.
- Liu, Y., & Hu, H. (2008). X-ray diffraction study of bamboo fibers treated with NaOH. *Fibers and Polymers*, 9(6), 735-739.
- Lüsse, S., & Arnold, K. (1998). Water Binding of Polysaccharides NMR and ESR Studies. *Macromolecules*, 31, 6891-6897.
- Lyons, T. P. (1982). Proteinase enzymes relevant to the baking industry. *Biochemical Society Transactions*, 10(4), 287-290.
- Magallón, S., & Sanderson, M. J. (2001). Absolute diversification rates in angiosperm clades. *Evolution; international journal of organic evolution*, 55(9), 1762-1780.
- Maloney D.H., Foy J.J. (2003). Yeast Fermentations. Capítulo 3 en *Handbook of Dough Fermentations* editado por Kulp, K. y Lorenz, K. Marcel dekker, inc. Nueva York, Estados Unidos.

- Marangoni, A., & Alli, I. (1988). Composition and properties of seeds and pods of the tree legume *Prosopis juliflora* (DC). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44(2), 99-110.
- Marlett, J. A. (2001). Dietary Fiber and Cardiovascular Disease. En S. Cho Sungsoo & M. L. Dreher (Eds.), *Handbook of dietary fiber* (pp. 1-14). Marcel Dekker, Inc. New York, Estados Unidos.
- Mepba, H. D., Eboh, L., & Nwaojigwa, S. U. (2007). CHEMICAL COMPOSITION, FUNCTIONAL AND BAKING PROPERTIES OF WHEAT-PLANTAIN COMPOSITE FLOURS. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 7(1), 1-10.
- Metakovskii E.V., Wrigley C.W., Bekes F., Gupta R.B. (1990). Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41, 289-306.
- Meyer, D., Becker, R., Gumbmann, M. R., Vohra, P., Neukom, H., & Saunders, R. M. (1986). Processing, Composition, Nutritional Evaluation, and Utilization of Mesquite (*Prosopis spp.*) Pods as a Raw Material for the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 914-919.
- Miles M. J., Morris V. J., Orford P. D., Ring S. G. (1985). The roles of amylose and amylopectin in the gelatinization and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135, 271-281.
- Moayedallaie, S., Mirzaei, M., & Paterson, J. (2010). Bread improvers: Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. *Food Chemistry*, 122(3), 495-499.
- Mohammed, I., Ahmed, A. R., & Senge, B. (2012). Dough rheology and bread quality of wheat–chickpea flour blends. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 196-202.
- Mohammed, I., Ahmed, A. R., & Senge, B. (2014). Effects of chickpea flour on wheat pasting properties and bread making quality. *Journal of food science and technology*, 51(9), 1902-1910.
- Moon, M. H., Giddings, J. C., Moon, M. H. E. E., & Giddings, C. (1993). Rapid Separation and Measurement of Particle Size Distribution of Starch Granules by Sedimentation/Steric Field-Flow Fractionation. *Journal of Food Science*, 58(5), 1166-1171.

- Morad M. M., D'Appolonia B. L. (1980). Effect of surfactants and baking procedure on total water-soluble starch in bread crumb. *Cereal Chemistry*, 57, 141-144.
- Moreno, C. (2012). Un tema complejo. *Revista Alimentos Argentinos*, 55, 60-63.
- Nagano, T., Tamaki, E., & Funami, T. (2008). Influence of guar gum on granule morphologies and rheological properties of maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 95-101.
- Nawrocka, A., Szymańska-Chargot, M., Miś, A., Kowalski, R., & Gruszecki, W. I. (2016). Raman studies of gluten proteins aggregation induced by dietary fibres. *Food Chemistry*, 194, 86-94.
- Noomhorm, A., Bandola, D. C., & Kongseree, N. (1994). Effect of rice variety, rice flour concentration and enzyme levels on composite bread quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64(4), 433-440.
- Olagnero, G., Abad, a, & Bendersky, S. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 14. Recuperado a partir de http://www.fmed.uba.ar/depto/nutrinormal/funcionales_fibra.pdf
- Olivera Carrión, M. (2007). Alimentos funcionales en Argentina. *La Alimentación*.
- Ooi, V. E., & Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry*, 7(7), 715-729.
- Oomah, B. D. (2001). Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 889-894.
- Osella, C. A., Sánchez, H. D., Carrara, C. R., De La Torre, M. A., & Buera, M. P. (2005). Water redistribution and structural changes of starch during storage of a gluten-free bread. *Starch/Stärke*, 57(5), 208-216.
- Pareyt, B., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2009). Sugar-snap cookie dough setting: the impact of sucrose on gluten functionality. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(17), 7814-7818.
- Pateras I. (1998). Bread Spoilage and Staling. En: *Technology of Breadmaking*. Eds S P Cauvain and L S Young, London, Blackie Academic & Professional, 240–261.
- Pelucchi C, Talamini R, Galeone C, Negri E, Franceschi S, Dal Maso L, Montella M, Conti E, La Vecchia C. (2004). Fibre intake and prostate cancer risk. *International Journal of Cancer*, 109, 278–80.

- Perry, P. A., Donald, A. M. (2002). The effect of sugars on the gelatinisation of starch. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 155-165.
- Piazza L., Masi P. (1995). Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chemistry*, 72, 320-325.
- Potter, N. N. (1968). *Food Science*. The Avi Publishing Company, Inc. Connecticut, Estados Unidos.
- Prokopiuk, D., Cruz, G., Grados, N., Garro, O., & Chiralt, A. (2000). Estudio comparativo entre frutos de *Prosopis alba* y *Prosopis pallida*. *Multequina*, 9, 35-45.
- Prokopiuk, D., Martínez-Navarrete, N., Andrés, A., Chiralt, A., & Cruz, G. (2010). Influence of Roasting on the Water Sorption Isotherms of Argentinean Algarroba (*Prosopis alba Griseb*) Pods. *International Journal of Food Properties*, 13(4), 692-701.
- Prosky, L. (1999). What is fibre? Current controversies. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 271-275.
- Rao P.A., Nussinovitch A., Chinachoti P. (1992). Effects of selected surfactants on amylopectin recrystallization and on recoverability of bread crumb during storage. *Cereal Chemistry*, 69(6), 613-618.
- Ribotta, P. D., Arnulphi, S. a, León, A. E., & Añón, M. C. (2005). Effect of soybean addition on the rheological properties and breadmaking quality of wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1889-1896.
- Ribotta, P. D., Colombo, A., & Rosell, C. M. (2012). Enzymatic modifications of pea protein and its application in protein–cassava and corn starch gels. *Food hydrocolloids*, 27(1), 185-190.
- Ribotta, P. D., Cuffini, S., León, A. E., & Añón, M. C. (2004). The staling of bread: an X-ray diffraction study. *European Food Research and Technology*, 218(3), 219-223.
- Ribotta, P. D., Pérez, G. T., Añón, M. C., & León, A. E. (2010). Optimization of Additive Combination for Improved Soy–Wheat Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 395-405.
- Roberfroid, M. B. (1999). What is beneficial for health? The concept of functional food. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1039-1041.

- Roccia, P., Ribotta, P. D., Ferrero, C., Pérez, G. T., & León, A. E. (2012). Enzymes action on wheat–soy dough properties and bread quality. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1255-1264.
- Roccia, P.; Ribotta, P.D.; Pérez, G.T.; León, A.E. (2009). Influence of soy protein on rheological properties and water retention capacity of wheat gluten. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 358-362.
- Rodríguez-Sandoval E., Fernández-Quintero A., Alaya-Aponte A. 2005. Reología y textura de masas: aplicaciones en trigo y maíz. *Ingeniería e Investigación*, 57, 72-78.
- Ronda, F., & Roos, Y. H. (2011). Staling of fresh and frozen gluten-free bread. *Journal of Cereal Science*, 53(3), 340-346.
- Ronda, F., Quilez, J., Pando, V., & Roos, Y. H. (2014). Fermentation time and fiber effects on recrystallization of starch components and staling of bread from frozen part-baked bread. *Journal of Food Engineering*, 131, 116-123.
- Rosales-Juárez, M.; González-Mendoza, B.; López-Guel, E.C.; Lozano-Bautista, F.; Chanona-Pérez, J.; Gutiérrez-López, G.; Farrera-Rebollo, R.; Calderón-Domínguez, G. (2008). Changes on doughs rheological characteristics and bread quality as a result of the addition of germinated and non-germinated soybean flour. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 152-160.
- Roth, K. (2013). Our Daily Bread — Part 3. *Chemistry Views*. DOI: 10.1002/chemv.201300016.
- Sabanis, D., & Tzia, C. (2009). Effect of rice, corn and soy flour addition on characteristics of bread produced from different wheat cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 68-79.
- Salinas, M. V. (2013). Estudio de la calidad panadera, sensorial y nutricional de panes elaborados con harina de trigo fortificada con sales de calcio e inulina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).
- Salinas, M. V., & Puppo, M. C. (2013). Effect of organic calcium salts–inulin systems on hydration and thermal properties of wheat flour. *Food Research International*, 50(1), 298-306.
- Salinas, M. V., & Puppo, M. C. (2014). Rheological Properties of Bread Dough Formulated with Wheat Flour–Organic Calcium Salts–FOS–Enriched Inulin Systems. *Food and Bioprocess Technology*, 7(6), 1618-1628.

- Salinas, M. V., Carbas, B., Brites, C., & Puppo, M. C. (2015). Influence of Different Carob Fruit Flours (*Ceratonia siliqua* L.) on Wheat Dough Performance and Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1561-1570.
- Salinas, M. V., Zuleta, A., Ronayne, P., & Puppo, M. C. (2012). Wheat Flour Enriched with Calcium and Inulin: A Study of Hydration and Rheological Properties of Dough. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 3129-3141.
- Salvador, A., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2006). Dynamic rheological characteristics of wheat flour–water doughs. Effect of adding NaCl, sucrose and yeast. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 780-786.
- Santos, E., Rosell, C. M., & Collar, C. (2008). Gelatinization and retrogradation kinetics of high-fiber wheat flour blends: a calorimetric approach. *Cereal Chemistry*, 85(4), 455-463.
- Schoenlechner, R., Szatmari, M., Bagdi, A., & Tömösközi, S. (2013). Optimisation of bread quality produced from wheat and proso millet (*Panicum miliaceum* L.) by adding emulsifiers, transglutaminase and xylanase. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 361-366.
- Sciammaro, L. P. (2015). Caracterización fisicoquímica de vainas y harinas de algarrobo (*Prosopis alba* y *Prosopis nigra*). Aplicaciones en productos horneados y fermentados. Tesis Doctoral. Facultad de Cs. Exactas (UNLP), La Plata, Argentina.
- Sciammaro, L. P., Ferrero, C., Puppo, M. C. (2015). Chemical and nutritional properties of different fractions of *Prosopis alba* pods and seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*. DOI: 10.1007/s11694-015-9282-z
- Scott, K. P., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2008). Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin*, 33(3), 201-211.
- Shewry, P. R., Popineau, Y., Lafiandra, D., & Belton, P. (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: Findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science and Technology*, 11(12), 433-441.
- Silveira Rodríguez, M. B., Monereo Megías, S., & Molina Baena, B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Revista española de salud pública*, 77(3), 317-331.

- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S., & Perera, C. O. (2010). Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: a review. *Journal of food science*, 75(8), 163-174.
- Slade, L & Levine, H. (1989). A food polymer science approach to selected aspects of starch gelatinization and retrogradation. En: *Frontiers in Carbohydrates Research-1: Food Applications*. Ed. R.P Millane, J.N. BeMiller & R. Chandrasekaran. Elsevier, London, pp. 215-270.
- Sopade, P. A., Halley, P. J., & Junming, L. L. (2004). Gelatinisation of starch in mixtures of sugars. II. Application of differential scanning calorimetry. *Carbohydrate polymers*, 58(3), 311-321.
- Stampfli, L., & Nersten, B. (1995). Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry*, 52(4), 353-360.
- Stauffer C. (1998). *Fundamentos de formación de la masa. Fabricación de pan editado por Cauvain, S. y Young, L. Acribia, Zaragoza.*
- Steffe, J.F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*, 2nd ed. Freeman Press: MN, USA.
- Steffolani, M. E. (2010). Efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa en productos panificados. Tesis Doctoral. Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Steffolani, M. E., Ribotta, P. D., Pérez, G. T., & León, A. E. (2010). Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of cereal science*, 51(3), 366-373.
- Tolstoguzov V. (1997). Thermodynamic aspects of dough formation and functionality. *Food Hydrocolloids*, 11(2), 193-197.
- Tromp, R. H., van de Velde, F., van Riel, J., & Paques, M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International*, 34, 931-938.

- Tserki, V., Zafeiropoulos, N. E., Simon, F., & Panayiotou, C. (2005). A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 36, 1110-1118.
- Van de Velde, F., van Riel, J., & Tromp, R. H. (2002). Visualisation of starch granule morphologies using confocal scanning laser microscopy (CSLM). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(13), 1528-1536.
- Wang, J., Rosell, C. M., & Benedito de Barber, C. (2002). Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*, 79(2), 221-226.
- Wieser H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115-119.
- Wieser, H. (2000). Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *European Food Research and Technology*, 211, 262-268.
- Yep, Y. L., Li, D., Mann, N. J., Bode, O., & Sinclair, A. J. (2002). Bread enriched with microencapsulated tuna oil increases plasma docosahexaenoic acid and total omega-3 fatty acids in humans. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 11(4), 285-291.
- Yue, P., & Waring, S. (1998). Resistant starch in food applications. *Cereal foods world (USA)*, 43, 690-695.

GLOSARIO

Abreviaturas y letras utilizadas en ecuaciones:

A = Factor pre exponencial para relajación spin-spin

a* = Parámetro de color del espacio CIELAB

A1 = Constante del modelado de Boltzman

A2 = Máximo aumento de volumen durante la fermentación

AACC = American Association of Cereal Chemists

AOAC = Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional

b* = Parámetro de color del espacio CIELAB

BPF = Buenas Prácticas de Fabricación

C % = % de cenizas en el residuo de fibra

CAA: Código Alimentario Argentino

CF = Calcoflúor White

CONAL = Comisión Nacional de Alimentos

CSL = Estearoil Lactilato de Calcio

CSLM = Microscopía Láser Confocal de Barrido

dx = Constante del modelado de Boltzman

DATEM = Diglicéridos de Ácido Diacetil Tartárico

DCC = Diseño Central Compuesto

DMA = Análisis Mecánico Dinámico (por sus siglas en ingles)

DS = Desviación Estándar

DSC = Calorimetría Diferencial de Barrido (por sus siglas en ingles)

E' = Módulo elástico

E'' = Módulo viscoso

F = Factor de conversión de nitrógeno a proteína

FAO = Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FD = Fibra Dietaria

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos del gobierno de Estados Unidos

FDT = Fibra Dietaria Total

FITC = Isotiocianato de Fluoresceina

G* = Módulo complejo

G' = Módulo de almacenamiento

G'' = Módulo de pérdida

HMW-GT = Gluteninas de Alto Peso Molecular

I = Intensidad de señal

IR = Índice de Retrogradación

IRAM = Instituto Argentino de Normalización y Certificación

L* = Parámetro de luminosidad en espacio CIELAB

LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad

LMW-GT = Gluteninas de Bajo Peso Molecular

m = Masa de muestra

m₀ = Masa del balón vacío (determinación de lípidos)

M = Margarina

M₀ = Masa del filtro con celite

m₁ = Masa del balón con + extracto etéreo (determinación de lípidos)

M₁ = Masa del filtro con celite + residuo de fibra dietaria

M₂ = Masa del filtro con celite + cenizas

m_a = Masa de cápsula + muestra calcinada

m_b = Masa de cápsula vacía

m_s = Masa de muestra seca

N = Normalidad

ND = No determinado

N_{HCl} = Normalidad del HCl

OMS = Organización Mundial de la Salud

P % = % de proteínas en el residuo de fibra

P_{meq} = Peso miliequivalente del nitrógeno

RMN = Resonancia Magnética Nuclear

Rod B = Rodamina B

RSM = Metodología de Superficies de Respuesta

SDS = Dodecil Sulfato Sódico

SEM = Microscopía Electrónica de Barrido

SSL = Estearoil Lactilato de Sodio

T = Temperatura

t = Tiempo

T₁, T₂ = Tiempos de relajación de esfuerzo

T_0 = Temperatura de inicio de pico de gelatinización
 T_I = Temperatura del primer pico de gelatinización
 T_{II} = Temperatura del segundo pico de gelatinización
 T_{III} = Temperatura de pico amilosa-lípido
 T_F = Temperatura final de pico de gelatinización
 T_{R0} = Temperatura de inicio del pico de retrogradación
 T_R = Temperatura del pico de retrogradación
 T_{RF} = Temperatura final de pico de retrogradación
TG = enzima transglutaminasa
TG1 = concentración 0,01% de enzima transglutaminasa
TG2 = concentración 0,1% de enzima transglutaminasa
TPA = Análisis de Perfil de Textura
 T_{rel} = Tiempo de relajación
UB = Unidades Brabender
UF = Unidades Farinográficas
USDA = Departamento de Agricultura de Estados Unidos
 V_b = Volumen de HCL gastado para titular el blanco en Kjeldahl
VDR = Valor Diario de Referencia
VE = Volumen Específico
 V_{HCL} = Volumen de HCL gastado para titular la muestra en Kjeldahl
 X_i = Factores en diseño central compuesto
 x_0 = Constante del modelado de Boltzman
Y = Respuesta de la muestra

Otros símbolos utilizados:

β_i = Coeficientes de regresión
 σ = Esfuerzo
 $\sigma_1; \sigma_2$ = Factores pre exponenciales, modelo de Maxwell para relajación de esfuerzo
 σ_E = Valor de esfuerzo alcanzado en el equilibrio
 η = Coeficiente de viscosidad dinámica
 $\dot{\gamma}$ = Gradiente de velocidad
 γ = Deformación

γ_0 = Deformación aplicada

ω = Velocidad angular

δ = Angulo de desfasaje

λ = Tiempo de relajación spin-spin

ΔH_G = Entalpía de gelatinización

ΔH_R = Entalpía de retrogradación

ϵ_0 = Constante de deformación