



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ADITIVOS Y ENZIMAS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL ALMIDÓN SOMETIDO A TRATAMIENTOS TÉRMICOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO
EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: María Santamaría Arnal

TUTOR/A ACADÉMICO: Antonio Martínez López
TUTORA EXTERNA: Cristina Molina Rosell
DIRECTOR EXPERIMENTAL: Raquel Garzón Lloria

Curso Académico:2018-2019

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2019

ADITIVOS Y ENZIMAS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL ALMIDÓN SOMETIDO A TRATAMIENTOS TÉRMICOS

María Santamaría Arnal, Cristina Molina Rosell¹, Raquel Garzón Lloria¹, Antonio Martínez López¹

RESUMEN

El almidón es el constituyente mayoritario en una gran mayoría de alimentos, incluyendo productos de panadería. Una práctica común en tecnología de alimentos es la utilización de la congelación/descongelación para incrementar la vida útil de los alimentos. El objetivo del estudio ha sido evaluar el impacto de distintos aditivos y enzimas de uso alimentario sobre las propiedades del almidón cuando se somete a tratamientos térmicos. Se evaluó el impacto de dichos aditivos y enzimas sobre las propiedades viscosimétricas del almidón de trigo, la microestructura y textura de los geles y los parámetros calorimétricos durante la congelación/descongelación. La viscosidad del gel de almidón se incrementó al adicionar goma guar y goma xantana, mientras que el SSL retrasó la gelatinización. El análisis de imagen permitió identificar las diferencias estructurales de los geles obteniendo un área de poro menor con goma xantana y mayor con SSL; aunque todos ellos fueron más blandos que el control, especialmente con SSL. La gelatinización del almidón fue retrasada por el dextrano y trehalosa, mientras que goma guar, goma xantana y glicerol disminuyeron la temperatura de transición vítrea, y junto con el SSL incrementaron la entalpía de congelación. La trehalosa y la goma xantana originaron los geles que presentaron menor sinéresis tras el almacenamiento en congelación. Los aditivos/enzimas estudiados modificaron la funcionalidad del almidón, siendo necesario la profundización en el estudio para comprender el efecto en matrices complejas.

Palabras clave: almidón, aditivos, gelatinización, congelación, estructura.

RESUM

El midó és el constituent majoritari en una gran majoria d'aliments, incloent productes de fleca. Una pràctica comuna en tecnologia d'aliments és la utilització de la congelació/descongelació per a incrementar la vida útil dels aliments. L'objectiu de l'estudi ha sigut avaluar l'impacte de diferents additius i enzims d'ús alimentari sobre les propietats del midó quan se sotmet a tractaments tèrmics. Es va avaluar l'impacte d'aquests additius i enzims sobre les propietats viscosimètiques del midó de blat, la

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos. CSIC, C/ Agustín Escardino, 7 Paterna 46980, Valencia. España.

microestructura i textura dels gels i els paràmetres calorimètriques durant la congelació/descongelació. La viscositat del gel de midó es va incrementar en afegir goma guar i goma xantana, mentre que el SSL va retardar la gelatinització. L'anàlisi d'imatge va permetre identificar les diferències estructurals dels gels obtenint una àrea de porus menor amb goma xantana i major amb SSL; encara que tots ells van ser més blans que el control, especialment amb SSL. La gelatinització del midó va ser retardada pel dextrano i trehalosa, mentre que goma guar, goma xantana i glicerol van disminuir la temperatura de transició vitrea, i juntament amb el SSL van incrementar l'entalpia de congelació. La trehalosa i la goma xantana van originar els gels que van presentar menor sinèresis després de l'emmagatzematge en congelació. Els additius/enzims estudiats van modificar la funcionalitat del midó, sent necessari l'aprofundiment en l'estudi per a comprendre l'efecte en matrius complexes.

Paraules clau: midó, anticongelants, gelatinització, congelació, estructura.

ABSTRACT

Starch is the main constituent in many foods, particularly from bakery. A common practice in food technology is the use of freezing/thawing for extending the shelf-life of the foods. The aim of this study was to evaluate the impact of different additives and enzymes of food grade, on the starch properties when subjected to thermal treatments. It was evaluated the impact of those additives and enzymes on the viscosimetric profile of wheat starch, the microstructure and texture of the gels, and the calorimetric parameters during freezing/thawing. The viscosity of the starchy gel increased when adding guar gum and xanthan gum, whereas SSL delayed the gelatinization. The image analysis revealed structural differences of the gels, having lower pore area that containing xanthan gum and higher with SSL. The starch gelatinization was delayed by dextran and trehalose, and guar gum, xanthan gum and glycerol decreased the temperature of vitreous transition, and besides SSL increased the freezing enthalpy. The trehalose and xanthan gum led to gels with lower syneresis after frozen storage. The study confirmed that the additives/enzymes evaluated affected the starch functionality, but further studies are needed to understand their effect in complex matrixes.

Key words: starch, additives, gelatinization, freezing, structure.

INTRODUCCIÓN

El almidón es uno de los constituyentes mayoritarios de los alimentos, especialmente de los productos fermentados y horneados, en los cuales se ha extendido la aplicación de las tecnologías de congelación y descongelación, bien para alargar la vida media de los productos o bien para

proporcionar productos “frescos” a cualquier hora del día en el caso de las tecnologías de la cocción en diferido (bake-off) o los precocidos congelados.

El almidón es uno de los principales polisacáridos presentes en la naturaleza, en forma de gránulos compuestos por amilosa y amilopectina. Este compuesto, cuando se somete a temperatura de calentamiento y en presencia de agua sucede el fenómeno conocido como gelatinización del almidón, donde los gránulos de almidón se hinchan, pierden el orden molecular, las cadenas de amilosa se solubilizan y se forma un gel de almidón, siendo éste digerible. Por otra parte, al enfriarse, el gel experimenta cambios que causan una estructura parcialmente cristalina dando lugar al almidón retrogradado. De otra manera, este proceso consiste en que las cadenas de amilosa solubilizadas en la gelatinización se unen y forman dobles hélices cristalinas estabilizadas por puentes de hidrógeno, las cuales se agregan para formar estructuras cristalinas tridimensionales. Asimismo, la retrogradación de la amilosa es un proceso rápido porque se produce en pocas horas, en cambio la retrogradación de la amilopectina sucede a largo plazo como son días o semanas. Finalmente, la retrogradación está relacionada en la formación de cristales, es decir, el fenómeno de nucleación (García-Alonso et al., 1999). Al mismo tiempo, el almidón forma parte de una gran variedad de productos alimentarios como ingrediente debido a sus características y funcionalidad en estos. Este puede actuar como estabilizador, espesante, endurecedor, tiene una alta capacidad de retención de agua, lo que mantiene y mejora las propiedades de textura de los productos alimentarios. Por este motivo el control de las propiedades del gel es importante, ya que las propiedades reológicas de las dispersiones de almidón pueden proporcionar información necesaria sobre su estructura y el comportamiento durante el procesamiento de alimentos en diferentes condiciones empleadas. Además, los geles de almidón se conocen como materiales viscoelásticos, es por ello por lo que la capacidad gelificante del almidón es una característica importante y que debe ser estudiada en el procesado de alimentos (Irani et al., 2019).

En las masas congeladas se ha descrito que el proceso de congelación consta de tres etapas: i. fase de enfriamiento inicial, consiste en disminuir la temperatura hasta el punto de congelación; ii. etapa de transición de fase donde el agua se transforma en cristales de hielo debido a la eliminación del calor latente, esta fase es importante para la eficacia del proceso de congelación; iii. la última etapa consiste en el atemperado donde se reduce la temperatura de la masa hasta temperatura ambiente (Kiani y Sun, 2011). Asimismo, en la masa congelada, la cristalización del hielo se produce cuando el agua experimenta la nucleación del hielo, la cual consiste en la agregación de moléculas de agua de manera cristalina cuando el estado de energía libre del agua pura se supera, sucediendo esto en la primera etapa de la congelación citada anteriormente. Además, la nucleación del hielo y la ubicación de los cristales formados se ve influenciada por la velocidad de enfriamiento inicial, es decir, a una mayor velocidad de enfriamiento los cristales de hielo formados son más pequeños que a una velocidad inferior donde los cristales de hielo son más grandes (Omedi et al., 2019). También,

el crecimiento de los cristales de hielo ocurre a temperaturas cercanas al punto de congelación (Delgado y Sun, 2001). En consecuencia, la calidad en los productos congelados se puede ver influenciada tanto por la nucleación, como por el crecimiento del hielo. Durante el almacenamiento en congelación se generan fluctuaciones en las temperaturas que como consecuencia producen la fusión de los cristales de hielo pequeños, dando lugar a la formación de cristales de hielo más grandes en la superficie lo que afecta a la calidad del producto. Es por ello que algunos estudios han mencionado que la recristalización de hielo es uno de los principales factores que afectan a las condiciones óptimas de estos productos (Eckardt et al., 2013).

Particularmente, el almidón, tanto en forma de gránulo como en gel, modifica su funcionalidad cuando se somete a congelación. Por un lado, Tao et al., (2015) observó que al aumentar el número de ciclos de congelación y descongelación había un mayor impacto sobre la estructura del almidón de trigo, causando daños en los gránulos de almidón y la lixiviación de la amilopeptina. Otros estudios indican que la congelación induce a la reorganización del almidón, puesto que evidenciaron que se disminuye el estado amorfo y aumenta la cristalinidad de los gránulos de almidón a causa de la disociación entre el complejo amilosa-lípido. Por otra parte, los gránulos de almidón pueden verse afectados por la congelación de diferente forma atendiendo a su morfología inicial. Los gránulos de almidón como los de trigo o de patata que muestran una distribución del tamaño bimodal (grandes y lenticulares o pequeños y esféricos) son afectados por los ciclos de congelación y descongelación de manera distinta en función de su tamaño. De hecho Tao et al., (2016a) observaron que los gránulos pequeños fueron más sensibles a los daños ocasionados por los ciclos de congelación y descongelación, debido a que tienen mayor afinidad por el agua como consecuencia de su morfología (mayor área superficial).

Otro de los efectos estudiados por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en el almidón ha sido la disminución de la entalpía de gelatinización al incrementar los ciclos de congelación/descongelación. Lo cual podría estar relacionado con los daños causados en los gránulos y la pérdida de amilosa debido a los tratamientos de congelación/descongelación, que pueden retrasar la difusión del agua en el almidón. En cambio, tras el almacenamiento en refrigeración la entalpía de retrogradación de la amilopeptina aumenta, puesto que requería mayor energía para fundir los cristales formados durante el almacenamiento (Tao et al., 2018; Tao et al., 2016b). Por ello, algunos estudios se centran en la comparación de la entalpía de un pan recién horneado con un pan elaborado a partir de masa congelada (Wang et al., 2015). Observaron el incremento en la entalpía de retrogradación debido la presencia de gránulos de almidón dañados en la masa congelada.

La creciente demanda de este tipo de productos ha tenido como consecuencia el desarrollo de técnicas que permitan controlar la cristalización y recristalización del hielo con la finalidad de obtener productos

de mayor calidad. Hoy en día, se utilizan aditivos como son: los hidrocoloides, las proteínas anticongelantes (AFP) o las proteínas estructuradoras de hielo (ISP), los agentes de nucleación del hielo (INA) y nuevos productos de fermentación y enzimas que alteran las características de los cristales de hielo. Las proteínas estructurantes del hielo son aisladas de fuentes como las plantas o microorganismos con la finalidad de mejorar la tolerancia a la congelación de las masas congeladas. En un estudio se determinó el efecto de la proteína anticongelante de la cebada que tras los ciclos de congelación/descongelación se observó un aumento del calor específico aparente de la masa, aumentó la temperatura de congelación y disminuyó la entalpía de fusión y el contenido de agua congelable (Ding et al., 2015). En otro estudio, se adicionaron proteínas estructuradoras del hielo extraídas de las hojas de una planta, conocida como privet chino, lo que causó una disminución en el contenido de agua libre y en la entalpía del hielo (ΔH), mejorando la microestructura, capacidad de fermentación y las propiedades de cocción de las masas congeladas (Jia et al., 2012). Por otra parte, los agentes nucleantes del hielo tienen como objetivo minimizar el grado de sobreenfriamiento e inhibir la formación de cristales de hielo grandes. En un estudio se emplearon películas de nucleación de hielo basadas en zeína para envolver la masa congelada, los cuales se prepararon inmovilizando los nucleadores biogénicos de hielo, en la superficie de las películas de zeína se consiguió aumentar la temperatura de nucleación del hielo del agua alrededor de 8°C y reducir la pérdida de agua durante el almacenamiento de congelación (Shi et al., 2013).

Existen numerosos aditivos con distinta funcionalidad utilizados en la industria de la alimentación. En el caso de los hidrocoloides su función principal es la de formar complejos con el gluten y el agua, aumentando así la capacidad de retención de agua de la masa, lo que altera la migración de humedad pudiendo minimizar el daño en la red de gluten causada por la recristalización del hielo. Se ha estudiado que la incorporación de estos en panificación mejora la calidad del pan, ya que disminuye la dureza de la miga y aumenta la capacidad de absorción de agua, mejorando así las características sensoriales y presentando una menor dureza (Bárcenas y Rosell, 2007; Gharaie et al., 2015). Además, otros estudios apuntan el posible carácter protector frente a los efectos negativos de la congelación/descongelación y almacenamiento congelado de productos con base de almidón (Bárcenas et al., 2004; Hejrani et al., 2017). También, se hace referencia a que dichos compuestos disminuyen la retrogradación de la amilopectina mejorando así la estabilidad de los productos durante el almacenamiento (Bárcenas y Rosell, 2007; Eduardo et al., 2016).

Por otra parte, los emulgentes, son capaces de mejorar las características durante el procesado de los alimentos, puesto que pueden interactuar con las grasas, el almidón o el gluten. De esta forma, su adición ayuda al aireamiento de las emulsiones o masas, proporciona una mejor textura y esponjosidad a los alimentos. Existen estudios que han demostrado sus efectos sobre una mejora en la elaboración del pan, debido a su carácter anfifílico que permite la formación de complejos del almidón

con las proteínas (Gómez et al., 2013; Gómez et al., 2004a). Asimismo, se han estudiado otros aditivos como el glicerol, utilizado por la industria por su efecto humectante y emulgente, por su posible capacidad crioprotectora, mejorando la formación de cristales de hielo durante la congelación y el almacenamiento (Huang et al., 2011). Finalmente, las enzimas se han empleado para minimizar los daños en la red de gluten y en la viabilidad de la levadura, durante la congelación y el almacenamiento. En el caso de las enzimas transglutaminasa y glucosa oxidasa se han utilizado principalmente por su capacidad de reticulación de las proteínas, función que podría aplicarse en las masas congeladas para reducir los daños causados por la cristalización del hielo (Steffolani et al., 2012).

Como se ha comentado anteriormente, son numerosos los aditivos que se utilizan en la industria alimentaria con distintos propósitos. Sin embargo, hasta donde los autores han investigado, no existe un estudio previo que realice la comparativa de distintos aditivos sobre el comportamiento del almidón en procesos de congelación/descongelación. Así pues, el objetivo de este estudio es evaluar el impacto de aditivos y enzimas de uso alimentario sobre las propiedades del almidón al someterse a tratamientos térmicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El almidón de trigo (Natilor Chamtor, Pomacle, Francia) fue utilizado como ingrediente de referencia, el cual se combinó con diferentes compuestos utilizados en alimentación, con posible efecto durante la congelación, como: HPMC K4M de grado alimentario (Dow Chemical Company, Midland, Michigan), goma guar, goma xantana (Grupo Desarrollo, Valencia, España), dextrano (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), Estearoil Lactilato de Sodio (SSL), glicerol (EPSA, Valencia, España), trehalosa (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania), glucosa oxidasa (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) y transglutaminasa (BDF Natural Ingredients, S.L, Girona, España), utilizando en los ensayos agua Mili-Q.

Propiedades de formación de pasta y preparación de los geles

Las muestras se gelatinizaron mediante el método estándar de formación de pasta (ICC 162). Se utilizó un analizador rápido de viscosidad (RVA-4500) (Perten Instruments, Macquarie Park, Australia). Para la realización de este ensayo, primero se determinó el contenido de humedad del almidón de trigo mediante el método rutina de referencia, norma española ISO 712:2009. Después, se mezcló almidón y agua adicionando a cada muestra el aditivo correspondiente, las cuales se sometieron a una temperatura de 50 °C durante 1 min, luego se calentaron de 50 a 95 °C, y se mantuvieron a

esta temperatura durante 2 min 30 s, enfriándose de nuevo a 50 °C. Los geles obtenidos durante el ensayo fueron los utilizados para el resto de los análisis realizados. Tanto el registro del perfil de viscosidad como la preparación de geles se realizaron por duplicado.

Dureza del gel

El estudio de la dureza de los geles se llevó a cabo mediante un texturómetro TA.XT-Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Se colocaron 4 gramos de cada uno de los geles en recipientes de cristal (diámetro: 1,8 cm; altura: 3 cm) y se almacenaron a 4 °C durante 24 horas. Después, las muestras estuvieron a 25 °C durante una hora y se colocaron perpendicularmente en el equipo donde se realizó un ensayo de compresión empleando una célula de carga de 5 kg y una sonda cilíndrica de aluminio de 10 mm a una velocidad de 10 mm/s. El análisis se realizó por duplicado.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el fin de estudiar las diferencias encontradas en los distintos geles, se congelaron durante 7 días y posteriormente se liofilizaron. Las muestras liofilizadas se cortaron y se colocaron en soportes, las cuales se recubrieron con oro en un evaporador de vacío durante 120 segundos (JEE 400, JEOL, Tokio, Japón). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM, S-4800, Hitachi, Ibaraki, Japón). Todas las micrografías se registraron a un voltaje de aceleración de 10 kV y con un aumento de 100x, 150x 300x.

Se analizó la microestructura de las muestras mediante el software Fiji ImageJ. Las imágenes se guardaron en formato tiff, fueron mejoradas en cuanto a contraste/brillo para poder aplicar un umbral que diferenciase las zonas a medir y el fondo, finalmente se realizó un análisis de partículas. Los parámetros de las imágenes obtenidos fueron el área media (μm^2) y la porosidad (%).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se analizaron las propiedades de gelatinización, congelación y retrogradación del almidón de trigo junto con los distintos aditivos/enzimas con la finalidad de conocer las transiciones térmicas que sufre el almidón con los distintos coadyuvantes estudiados. El ensayo se realizó mediante el equipo DSC Q200 (TA Instruments, Newcastle, DE). Para ello se colocó en cápsulas de acero inoxidable de gran capacidad 40 mg con una relación 1:0,8 (almidón+aditivo : agua). Las temperaturas y gradientes utilizados en cada una de las etapas se describen en la Tabla 1. Después de la congelación y antes de la retrogradación de las muestras, éstas se almacenaron a temperatura de refrigeración durante 3 días. A partir de los valores registrados en el termograma se obtuvieron los siguientes

parámetros: la temperatura de inicio (T_0), temperatura de transición vítrea (T_g), incremento de la entalpía (ΔH) expresada como joule por gramo, la diferencia de tiempos (tiempo total que tarda la muestra en finalizar la congelación) y la diferencia de temperaturas (incremento de temperatura debido a la reacción exotérmica producida por la nucleación del hielo) en la etapa de congelación. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

TABLA 1. Etapas establecidas para la calorimetría diferencia de barrido.

Etapas	Proceso	Temperaturas	Gradiente
1 ^a	Gelatinización	25°C / 125°C	10°C/min
2 ^a	Congelación	25°C / - 40°C	5°C/min
3 ^a	Retrogradación	25°C / 125°C	10°C/min

Sinéresis

La sinéresis se analizó sometiendo las muestras descongeladas a una centrifugación en la centrífuga Eppendorf 5415 R, (Eppendorf, Alemania). A partir del gel resultante del RVA se colocó 1 g en cada eppendorf y se almacenaron en congelación durante distintos tiempos (3, 7 y 10 días). El día de la determinación las muestras eran descongeladas durante 2 horas a 25 °C y se centrifugaban a 25 °C y 3000 *g* (*rcf*) durante 10 minutos. Tras someter las muestras a una centrifugación, el agua libre se eliminó, expresándola como porcentaje de cantidad de agua liberada de los geles. El análisis se realizó por cuadruplicado para cada muestra y día de almacenamiento.

Análisis de datos

Los resultados experimentales obtenidos se analizaron mediante un análisis múltiple de las variables para comprobar las diferencias encontradas para cada uno de los tipos de compuesto empleado en cada una de las variables estudiadas. También, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) teniendo en cuenta las variables que más significativas para determinar el efecto producido por los compuestos utilizados. Los datos fueron analizados mediante el Software estadístico del Startgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, UK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades de formación de pasta (RVA)

Los efectos de los distintos coadyuvantes tecnológicos sobre la capacidad de la formación de pasta del almidón de trigo se observan en la Figura 1. En general, la incorporación de estos compuestos no modificó el perfil viscosimétrico del almidón de trigo, detectándose el pico de viscosidad correspondiente a la gelatinización del almidón durante el calentamiento y el incremento de viscosidad durante el enfriamiento, derivado este de la gelificación del almidón. Respecto a los valores obtenidos, los aditivos no modificaron la viscosidad máxima durante el calentamiento, obteniendo unos valores de viscosidad de pico alrededor de 2700 cP, a excepción de la goma guar y la goma xantana (3019 y 3056 cP, respectivamente). Además, estos dos hidrocoloides aumentaron también la viscosidad final tras el enfriamiento. Se ha descrito en otros estudios realizados con almidón de arroz el debilitamiento de las estructuras de los geles tras la incorporación de hidrocoloides (Rosell et al., 2011). Según estos autores, la mezcla de hidrocoloides con el almidón puede provocar la interacción de la amilosa lixiviada y la amilopectina de bajo peso molecular con los hidrocoloides durante el proceso de gelatinización y dar lugar a estructuras distintas que alteran la formación de pasta y las propiedades reológicas, lo cual depende del tipo de hidrocoloide y de la concentración empleada.

El estearoil lactilato de sodio (SSL) incrementó la viscosidad final y el “setback”, valor que define la diferencia entre la viscosidad final y el pico más bajo de la curva. Los emulgentes son compuestos tensoactivos, cuya estructura química posee fracciones hidrofílicas e hidrófobas, generando así un carácter anfifílico que posibilita la formación de complejos con almidón y proteínas. Gómez et al., (2004a) observaron un aumento en el tiempo de amasado al preparar panes de trigo con la adición de emulgentes, como el SSL. Dicho efecto lo atribuyeron a la capacidad de los mismos para formar complejos con las proteínas, induciendo la agregación proteína-proteína que podría retrasar el desarrollo de la masa. Sin embargo, también podrían influir en la formación de complejos lípido-amilosa modificando así la viscosidad del almidón de trigo (Gómez et al., 2013).

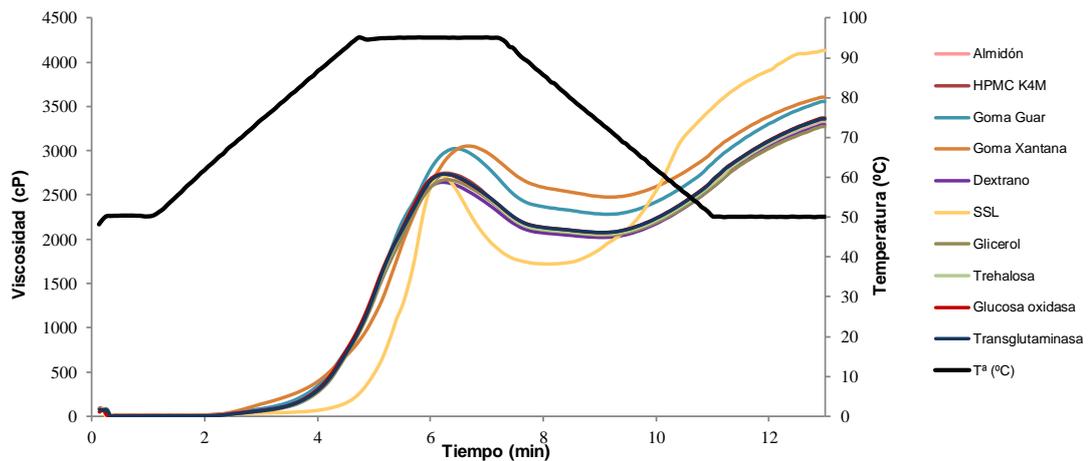


FIGURA 1. Impacto de los distintos coadyuvantes sobre la capacidad de formación de pasta del almidón de trigo.

Dureza del gel

Los geles resultantes de la gelatinización del almidón de trigo en presencia de distintos coadyuvantes tecnológicos mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) con el gel control (Figura 2). Todos los aditivos evaluados disminuyeron la dureza del gel control (275 g), destacando el gel que contenía SSL con un valor de dureza de 139 g. Kamel y Hoover (1992) observaron que la sustitución de manteca por un emulgente como el SSL, incrementaba la incorporación de aire en la masa panaria durante el mezclado. Por otra parte, Gómez et al., (2004b) observaron que la adición de SSL en la elaboración de pan, originó panes más blandos comparados con el control. Dichos efectos podrían estar relacionados con la capacidad de los emulgentes para formar una estructura laminar en la interfaz proteína-almidón, que mejoraría la capacidad de las proteínas para formar una estructura reticular capaz de retener las burbujas de aire durante la formación del gel con SSL y, por lo tanto, originar geles con una menor dureza.

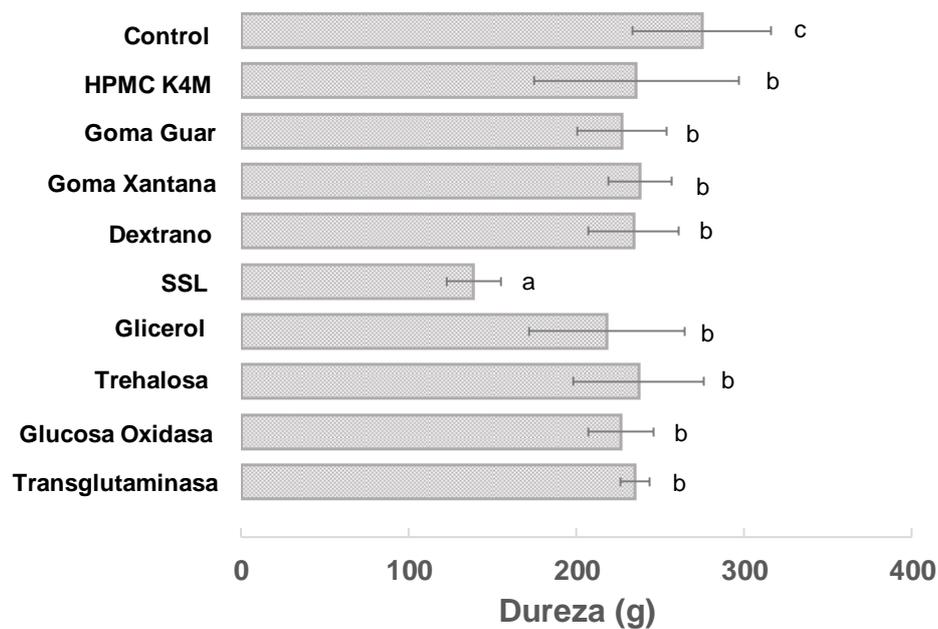


FIGURA 2. Representación de la dureza de los geles obtenidos. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas al 95% de confianza entre los distintos coadyuvantes tecnológicos ($P < 0,05$).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el objetivo de observar los cambios que podían inducir los distintos aditivos en la microestructura de los geles formados, las muestras liofilizadas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido y cuantificaron los cambios posteriormente (Figura 3 y Figura 4). La adición de los distintos coadyuvantes estudiados originó estructuras con diferente aspecto, en cuanto a porosidad y homogeneidad de las muestras. Los geles con una estructura más abierta fueron goma guar, control y SSL, siendo la goma guar la que originó una estructura menos organizada y más frágil (Figura 3). En cambio, las muestras que contenía goma xantana, trehalosa o HPMC presentaron una estructura más cerrada, con poros más pequeños, y homogénea.

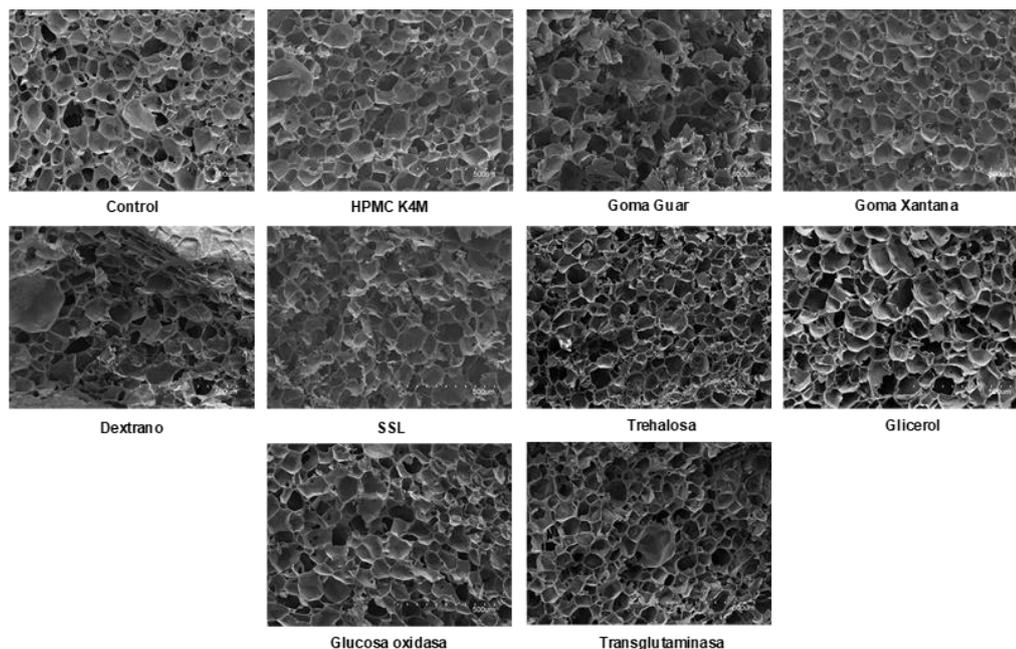


FIGURA 3. Imágenes de las muestras obtenidas mediante SEM (aumento 100x).

Una vez cuantificados los cambios originados por los distintos coadyuvantes en la estructura de los geles (Figura 4), se confirmó que el gel conteniendo goma xantana originó poros de menor tamaño, lo cual pudo estar relacionado con el aumento de viscosidad de pico observado durante el ensayo de las propiedades de formación de pasta. La goma xantana, al no recubrir totalmente los gránulos de almidón, facilita su hinchamiento durante la gelatinización. Sin embargo, esto no fue así en el caso de la goma guar, que también obtuvo una viscosidad elevada (Figura 1). No obstante, la muestra que mostró mayor mediana en el área de poro fue el SSL, lo cual pudo estar relacionado con la caída observada en el perfil de viscosidad tras el calentamiento, esta menor consistencia permitió la formación de burbujas de aire de mayor tamaño a expensas de la coalescencia de las burbujas de menor tamaño formadas inicialmente. Además, estos mayores poros en la estructura de los geles explicarían la menor dureza de los geles, es decir, pese a que obtuvo la mayor viscosidad final, los geles obtenidos fueron menos firmes. Por otra parte, se analizó la porosidad de las muestras lo cual proporciona información sobre la estructura, especialmente sobre el grosor de las paredes de las muestras. En la Figura 4 las muestras con mayor porosidad después de la muestra control, fueron glucosa oxidasa y HPMC, respectivamente. Las muestras que contenían SSL, goma guar, dextrano y transglutaminasa presentaron una porosidad menor, indicando geles con una estructura de paredes más gruesas. Estos resultados podrían estar relacionados con los encontrados en fideos de trigo por Niu et al., (2017), que observaron estructuras más irregulares con la incorporación de glucosa oxidasa; sin embargo, la adición de transglutaminasa mostró pasta con una estructura más gruesa y compacta asociada a la mayor resistencia y

estabilidad de la masa, como la observada en los geles obtenidos durante el estudio.

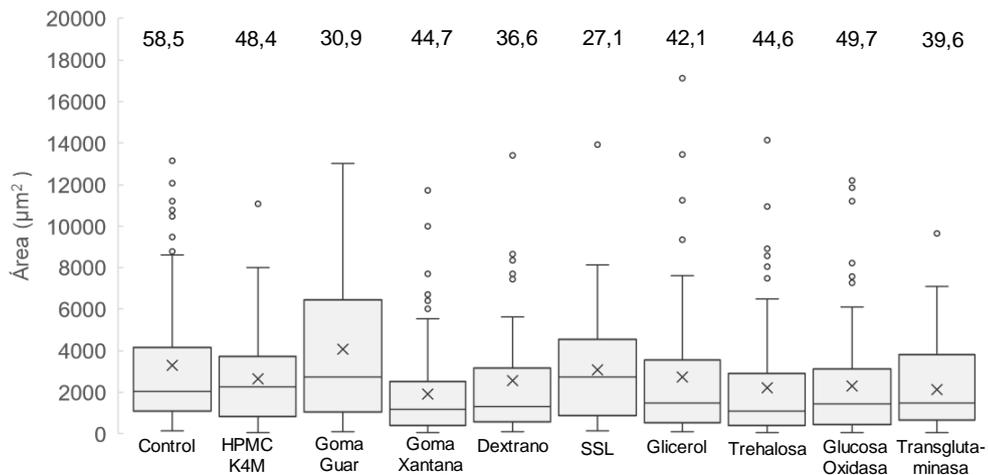


FIGURA 4. Representación del área (μm^2) de las muestras. El número indicado en la parte superior de cada una de las cajas corresponde al porcentaje de porosidad calculado para cada una de las muestras.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Con el objetivo de comprender los cambios que puede sufrir el almidón tras su calentamiento, congelación y almacenamiento en presencia de los distintos aditivos y enzimas evaluados, se obtuvieron distintos termogramas mediante calorimetría diferencial de barrido. Con ello, se adquirieron valores referentes a la gelatinización (T_0 , ΔH); congelación (T_g , ΔH , diferencia de temperaturas, diferencia de tiempos); y retrogradación de la amilopectina (ΔH) (Tabla 2). Tras llevar a cabo dicho análisis, se obtuvieron valores con diferencias estadísticamente significativas (Valor de $P < 0,05$) a excepción del parámetro diferencia de tiempos.

En general, en la etapa de gelatinización se observó un incremento en la temperatura inicial, a excepción de la muestra con glucosa oxidasa, más acusado en las muestras conteniendo aditivos con grupos $-\text{OH}$, como la trehalosa, glicerol e hidrocoloides. Peng et al., (2017) observó que la temperatura de gelatinización del almidón de trigo con trehalosa fue mayor, lo que podía deberse a una gelatinización parcial del almidón debido a los enlaces de hidrógeno formados entre la trehalosa y el agua disponible. En relación con la entalpía, el SSL y glicerol obtuvieron valores más elevados, posiblemente asociado a la estabilización de la estructura de los gránulos de almidón. En relación a la congelación, la temperatura de transición vítrea (T_g), valor en el cual las moléculas pierden su organización y el polímero cambia de estado, el mayor valor absoluto se observó con la glucosa oxidasa, dextrano y trehalosa, pero las diferencias no fueron significativas respecto al control. Por el contrario, los menores valores absolutos se observaron en presencia de goma guar, goma xantana y glicerol. En cuanto

a la entalpía durante la congelación, goma xantana, goma guar obtuvieron los valores superiores, seguido de los emulgentes como el glicerol y SSL. Huang et al., (2011) investigó la posible actividad crioprotectora de la trehalosa y de los emulgentes, observando que la adición de glicerol evitó la formación de cristales durante el tiempo de congelación y el almacenamiento aumentando la calidad del pan. Además, la levadura mejoró la capacidad de fermentación de la masa y la tolerancia al estrés por la congelación/descongelación. Esto podría ser debido a que el glicerol es un poliol soluble en agua que protege de la cristalización masiva del hielo, uniendo el agua a sus grupos hidroxilos a través de enlaces de hidrógeno y así reducir el punto de congelación del agua.

En el análisis calorimétrico de las muestras, se observó que durante la congelación experimentaban un calentamiento a causa de la reacción exotérmica originada al formarse los cristales de hielo. El intervalo de temperatura en el que se produjo fue distinto dependiendo de las muestras, pudiendo estar relacionada con la velocidad de nucleación de los cristales de hielo, siendo la goma xantana la que mostró mayor temperatura y la muestra control menor temperatura. Además, los geles obtenidos con goma xantana obtuvieron una estructura regular, y con un área de poro inferior al resto de muestras, así como, unos valores de sinéresis bajos durante el almacenamiento. Esto puede ser indicativo de que la goma xantana modifica la estructura, afectando a la etapa de congelación, lo que produce una reacción exotérmica durante la congelación mayor que el resto de los aditivos estudiados. Sin embargo, las diferencias observadas entre las muestras durante en el tiempo empleado para la congelación total de las muestras fueron menos acusadas, siendo el control la muestra que necesitó más tiempo para terminar el cambio de estado. Este resultado indicó que la adición de los aditivos y enzimas seleccionados puede estar favoreciendo una congelación más rápida, lo que implicaría la formación de cristales más pequeños.

Tras la descongelación y almacenamiento en refrigeración de las muestras, se observó un pico de envejecimiento endotérmico como resultado de la entalpía de fusión de la amilopectina recristalizada. Los hidrocoloides, glicerol, trehalosa y transglutaminasa incrementaron significativamente la entalpía de retrogradación de la amilopectina, respecto al control. Eduardo et al., (2016) observaron que la adición de un emulgente redujo la retrogradación de la amilopectina en el pan sin gluten, que se relacionó con la formación de un complejo amilosa-emulgente, que evitó la retrogradación de la amilopectina. En el presente estudio no se observó dicho efecto, posiblemente la presencia de otros ingredientes, u otro tipo de almidón podría explicar las diferencias. En cuanto a los hidrocoloides, Tebben y Li (2019) no observaron modificaciones en la retrogradación cuando se añadió goma xantana, atribuido a una disminución de la formación de complejos lípido-amilosa.

TABLA 2. Media \pm desviación estándar sobre las propiedades térmicas en función del coadyuvante empleado. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95% de confianza entre los distintos coadyuvantes ($P < 0,05$).

MUESTRA	Gelatinización		Congelación			Retrogradación	
	To (°C)	Entalpía (J/g)	Tg (°C)	Entalpía (J/g)	Diferencia temperatura (°C)	Diferencia Tiempos (min)	Entalpía (J/g)
Control	58,48 \pm 0,27 ^a	0,95 \pm 0,05 ^a	-27,32 \pm 1,93 ^{abc}	70,12 \pm 5,67 ^a	-0,46 \pm 0,34 ^d	1,86 \pm 0,16 ^b	1,53 \pm 0,11 ^a
HPMC K4M	60,10 \pm 0,09 ^c	0,93 \pm 0,03 ^a	-25,17 \pm 1,55 ^{bcde}	68,09 \pm 3,99 ^a	-2,78 \pm 0,81 ^a	1,33 \pm 0,11 ^a	1,89 \pm 0,03 ^{bc}
Goma Guar	60,93 \pm 0,10 ^{de}	1,37 \pm 0,12 ^c	-23,63 \pm 1,30 ^{de}	95,65 \pm 3,10 ^{bc}	-2,64 \pm 0,34 ^{ab}	1,63 \pm 0,10 ^{ab}	1,89 \pm 0,05 ^{bc}
Goma Xantana	60,60 \pm 0,12 ^d	1,35 \pm 0,12 ^c	-23,17 \pm 0,55 ^e	96,69 \pm 5,36 ^c	-3,02 \pm 0,35 ^a	1,53 \pm 0,31 ^{ab}	1,89 \pm 0,05 ^{bc}
Dextrano	61,41 \pm 0,23 ^f	1,22 \pm 0,12 ^{bc}	-27,63 \pm 0,72 ^{ab}	73,54 \pm 5,02 ^a	-1,63 \pm 0,23 ^c	1,50 \pm 0,10 ^{ab}	1,83 \pm 0,06 ^b
SSL	59,62 \pm 0,40 ^b	1,69 \pm 0,19 ^d	-24,82 \pm 2,28 ^{cde}	88,15 \pm 5,29 ^b	-1,93 \pm 0,29 ^{bc}	1,68 \pm 0,32 ^{ab}	1,72 \pm 0,34 ^{ab}
Glicerol	60,14 \pm 0,11 ^c	1,63 \pm 0,08 ^d	-24,36 \pm 1,97 ^{de}	89,81 \pm 5,22 ^{bc}	-1,76 \pm 0,14 ^c	1,63 \pm 0,38 ^{ab}	1,92 \pm 0,06 ^{bc}
Trehalosa	61,29 \pm 0,01 ^{ef}	1,12 \pm 0,02 ^{ab}	-27,21 \pm 1,68 ^{abc}	73,16 \pm 4,30 ^a	-1,91 \pm 0,55 ^{bc}	1,76 \pm 0,18 ^b	1,78 \pm 0,07 ^b
Glucosa oxidasa	58,17 \pm 0,32 ^a	1,07 \pm 0,08 ^{ab}	-28,34 \pm 0,73 ^a	70,82 \pm 3,03 ^a	-1,60 \pm 0,25 ^c	1,70 \pm 0,05 ^{ab}	1,72 \pm 0,17 ^{ab}
Transglutaminasa	59,91 \pm 0,10 ^{bc}	1,25 \pm 0,14 ^{bc}	-26,04 \pm 0,92 ^{abcd}	70,99 \pm 4,25 ^a	-1,83 \pm 0,23 ^c	1,65 \pm 0,13 ^{ab}	2,08 \pm 0,03 ^c
P-valor	0,0000	0,0000	0,0031	0,0000	0,0001	0,3662	0,0076

Sinéresis

Tras la congelación y posterior descongelación de los geles se produce la liberación de agua desde la red polimérica formada, lo cual se conoce como sinéresis, que se ha relacionado con la capacidad del almidón para retener agua y su tendencia a retrogradarse, específicamente la amilopectina. Tras el almacenamiento en congelación los valores de sinéresis de los geles presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) según el aditivo adicionado. Los valores más bajos se observaron en presencia de goma xantana y trehalosa. En general, no se observaron diferencias significativas durante el almacenamiento hasta 10 días en congelación, excepto en el caso del HPMC y el dextrano experimentaron un incremento progresivo durante el tiempo de almacenamiento. Observando todas las muestras en conjunto, cabe destacar que la mayor diferencia encontrada en el décimo día de almacenamiento lo presentó la que contenía HPMC (Figura 5). Las muestras que contenían goma xantana y trehalosa obtuvieron unos resultados de sinéresis menores, lo que podría indicar que tienen facilidad para retener el agua. Se ha reportado que la presencia de trehalosa incrementa la capacidad de retención de agua (Peng et al., 2017). Esto podría relacionarse con los grupos hidroxilos que posee este compuesto, que causa la unión del hidrógeno con el agua y con ello limita la movilidad de la molécula de agua durante el almacenamiento. El efecto observado con la goma xantana también se podría ser atribuido a la presencia de grupos hidroxilo, aunque no se observó en otros hidrocoloides como el HPMC. Horstmann et al., (2018) evaluaron el efecto de distintos hidrocoloides sobre masas de trigo, observando que el HPMC y goma guar formaron una película gruesa que se expandía sobre los gránulos de almidón, generando una especie de red. Por el contrario, la incorporación de goma xantana mostró un menor recubrimiento con partículas que cubrían la superficie de los gránulos. Es por ello que esta diferencia en el tipo de recubrimiento podría explicar la distinta sinéresis observada entre la goma xantana y los otros hidrocoloides evaluados.

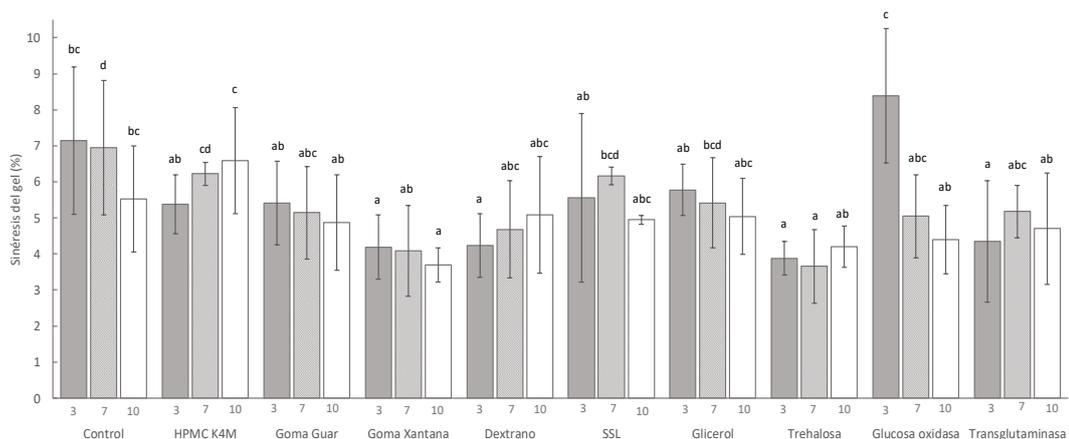


FIGURA 5. Representación de la sinéresis de cada gel durante los diversos días de almacenamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas al 95% de confianza para todas las muestras en función del período de almacenamiento (3,7 y 10 días) ($P < 0,05$).

Análisis de componentes principales (PCA)

Con el fin de comprender el efecto global de los aditivos y enzimas evaluados sobre el almidón de trigo y las diferencias o semejanzas entre ellos, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (Figura 6). Para ello sólo se tuvieron en cuenta los parámetros más representativos de cada uno de los ensayos realizados. El PCA de los datos experimentales obtenidos dio como resultado que dos componentes principales explicaron el 36% y 24% de la variación de los datos. Por lo tanto, el modelo explicó el 60% de la variación de los datos. El componente 1 (PC1) fue definido por la temperatura de inicio en la formación de pasta, la sinéresis del día 7 y el calentamiento en la congelación en el eje positivo, y la entalpía de congelación, gelatinización, viscosidad final y área media de los poros en el eje negativo. El componente 2 (PC2) fue definido por la viscosidad mínima, la entalpía de retrogradación, temperatura de inicio de gelatinización, pico de viscosidad, Tg, dureza y porosidad relativa. Por tanto, el estudio realizado permitió discriminar la funcionalidad de los aditivos/enzimas utilizados. Primero goma guar, goma xantana y glicerol siendo los que más difieren de la muestra control. En segundo lugar, SSL debido al área media de los poros. Las muestras conteniendo transglutaminasa, trehalosa, dextrano, HPMC y glucosa oxidasa fueron agrupadas en base a la dureza de los geles y la porosidad relativa de los mismos.

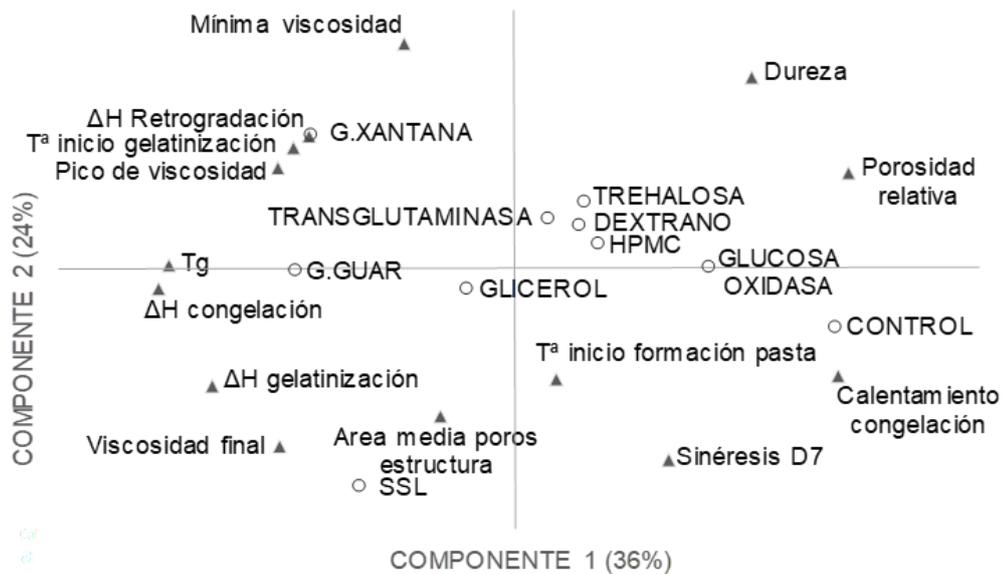


FIGURA 6. Análisis de componentes principales.

CONCLUSIONES

Al evaluar la funcionalidad de distintos aditivos y enzimas utilizados en la industria alimentaria sobre la congelación/descongelación de geles de almidón de trigo se observó que dichos compuestos modificaron la estructura de los geles obtenidos, afectando además los procesos de congelación y descongelación de los geles. La viscosidad y dureza de los geles se afectaron principalmente por la goma guar, goma xantana y SSL. La trehalosa y la goma xantana fueron los aditivos que redujeron la sinéresis de los geles, indicando una mayor capacidad para retener el agua durante el almacenamiento en congelación. La microestructura de los geles se modificó dependiendo del aditivo utilizado y esta se relacionó tanto con en el perfil de viscosidad como con la dureza de las muestras. Las propiedades térmicas del almidón de trigo se vieron modificadas en función del tipo de aditivo, originando diferencias estadísticamente significativas, destacando la reducción de la temperatura de transición vítrea producida por la goma guar, goma xantana y glicerol. Sin embargo, se requieren estudios adicionales, que permitan conocer el carácter crioprotector en matrices alimentarias más complejas.

REFERENCIAS

Bárceñas, M.E.; Benedito, C.; Rosell, C. M. 2004. Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage. *Food Hydrocolloids*, **18 (5)**: 769-774.

Bárceñas, M. E.; Rosell, C. M. 2007. Different approaches for increasing the shelf life of partially baked bread: Low temperatures and hydrocolloid addition. *Food Chemistry*, **100 (4)**: 1594-1601.

Delgado, A. E.; Sun, D.W. 2001. Heat and mass transfer models for predicting freezing processes. *Journal of Food Engineering*, **47 (3)**: 157-174.

Ding, X.; Zhang, H.; Wang, L.; Qian, H.; Qi, X.; Xiao, J. 2015. Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles. *Food Hydrocolloids*, **47**: 32-40.

Eckardt, J.; Öhgren, C.; Alp, A.; Ekman, S.; Åström, A.; Chen, G.; Langton, M. 2013. Long-term frozen storage of wheat bread and dough – Effect of time, temperature and fibre on sensory quality, microstructure and state of water. *Journal of Cereal Science*, **57 (1)**: 125-133.

Eduardo, M.; Svanberg, U.; Ahrné, L. 2016. Effect of hydrocolloids and emulsifiers on the shelf-life of composite cassava-maize-wheat bread after storage. *Food Science & Nutrition*, **4 (4)**: 636-644.

García-Alonso, A.; Jiménez-Escrig, A.; Martín-Carrón, N.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. 1999. Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. *Food Chemistry*, **66 (2)**: 181-187.

Gharaie, Z.; Azizi, M. H.; Barzegar, M.; Aghagholizade, R. 2015. Effects of Hydrocolloids on the Rheological Characteristics of Dough and the Quality of Bread Made From Frozen Dough. *Journal of Texture Studies*, **46 (5)**: 365-373.

Gómez, A. V.; Buchner, D.; Tadini, C.C.; Añón, M.C.; Puppo, M.C. 2013. Emulsifiers: Effects on Quality of Fibre-Enriched Wheat Bread. *Food and Bioprocess Technology*, **6 (5)**: 1228-1239.

Gómez, M.; del Real, S.; Rosell, C.M.; Ronda, F.; Blanco, C.A.; Caballero, P.A. 2004a. Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread. *European Food Research and Technology*, **219**: 145-150.

Gómez, M.; del Real, S.; Rosell, C.M.; Ronda, F.; Blanco, C.A.; Caballero, P.A. 2004b. Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread quality. *European Food Research and Technology*, **219 (2)**: 145-150.

Hejrani, T.; Sheikholeslami, Z.; Mortazavi, A; Davoodi, M.G. 2017. The properties of part baked frozen bread with guar and xanthan gums. *Food Hydrocolloids*, **71**: 252-257.

Horstmann, S.W.; Axel, C.; Arendt, E.K. 2018. Water absorption as a prediction tool for the application of hydrocolloids in potato starch-based bread. *Food Hydrocolloids*, **81**: 129-138.

Huang, L.; Wan, J.; Huang, W.; Rayas-Duarte, P.; Liu, G. 2011. Effects of glycerol on water properties and steaming performance of prefermented frozen dough. *Journal of Cereal Science*, **53 (1)**: 19-24.

Irani, M.; Razavi, S.M.A.; Abdel-Aal, E.S. M.; Hucl, P.; Patterson, C. A. 2019. Viscoelastic and textural properties of canary seed starch gels in comparison with wheat starch gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, **124**: 270-281.

Jia, C.; Huang, W.; Wu, C.; Zhong, J.; Rayas-Duarte, P. Guo, C. 2012. Frozen Bread Dough Properties Modified by Thermostable Ice Structuring Proteins Extract from Chinese Privet (*Ligustrum vulgare*) Leaves. *Cereal Chemistry*, **89 (3)**: 162-167.

- Kamel, B.S.; Hoover, R. 1992. Production of bread using sodium stearoyl lactylate as a replacement for shortening. *Food Research International*, **25 (4)**: 285-288.
- Kiani, H.; Sun, D.W. 2011. Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, **22 (8)**: 407-426.
- Niu, M.; Hou, G.G.; Kindelspire, J.; Krishnan, P.; Zhao, S. 2017. Microstructural, textural, and sensory properties of whole-wheat noodle modified by enzymes and emulsifiers. *Food Chemistry*, **223**: 16-24.
- Omedi, J.O.; Huang, W.; Zhang, B.; Li, Z.; Zheng, J. 2019. Advances in present-day frozen dough technology and its improver and novel biotech ingredients development trends. *Cereal Chemistry*, **96 (1)**: 34-56.
- Peng, B.; Li, Y.; Ding, S.; Yang, J. 2017. Characterization of textural, rheological, thermal, microstructural, and water mobility in wheat flour dough and bread affected by trehalose. *Food Chemistry*, **233**: 369-377.
- Rosell, C.M.; Gómez, M. 2007. Frozen Dough and Partially Baked Bread: An Update. *Food Reviews International*, **23 (3)**: 303-319.
- Rosell, C.M.; Yokoyama, W.; Shoemaker, C. 2011. Rheology of different hydrocolloids–rice starch blends. Effect of successive heating–cooling cycles. *Carbohydrate Polymers*, **84 (1)**: 373-382.
- Shi, K.; Yu, H.; Jin, J.; Lee, T.C. 2013. Improvement to baking quality of frozen bread dough by novel zein-based ice nucleation films. *Journal of Cereal Science*, **57 (3)**: 430-436.
- Steffolani, M.E.; Ribotta, P.D.; Perez, G.T.; Puppo, M.C.; León, A.E. 2012. Use of Enzymes to Minimize Dough Freezing Damage. *Food and Bioprocess Technology*, **5 (6)**: 2242-2255.
- Tao, H.; Huang, J.S.; Xie, Q.T.; Zou, Y.M.; Wang, H.L.; Wu, X.Y.; Xu, X.M. 2018. Effect of multiple freezing-thawing cycles on structural and functional properties of starch granules isolated from soft and hard wheat. *Food Chemistry*, **265**: 18-22.
- Tao, H.; Wang, P.; Wu, F.; Jin, Z.; Xu, X. 2016a. Particle size distribution of wheat starch granules in relation to baking properties of frozen dough. *Carbohydrate Polymers*, **137**: 147-153.
- Tao, H.; Yan, J.; Zhao, J.; Tian, Y.; Jin, Z.; Xu, X. 2015. Effect of Multiple Freezing/Thawing Cycles on the Structural and Functional Properties of Waxy Rice Starch. *PLOS ONE*, **10 (5)**: e0127138.
- Tao, H.; Zhang, B.; Wu, F.; Jin, Z.; Xu, X. 2016b. Effect of multiple freezing/thawing-modified wheat starch on dough properties and bread quality using a reconstitution system. *Journal of Cereal Science*, **69**: 132-137.
- Tebben, L.; Li, Y. 2019. Effect of xanthan gum on dough properties and bread qualities made from whole wheat flour. *Cereal Chemistry*, **96 (2)**: 263-272.
- Wang, P.; Tao, H.; Jin, Z.; Xu, X. 2015. The final established physicochemical properties of steamed bread made from frozen dough: Study of the combined effects of gluten polymerization, water content and starch crystallinity on bread firmness. *Journal of Cereal Science*, **63**: 116-121.