

00567

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO <sup>25</sup>



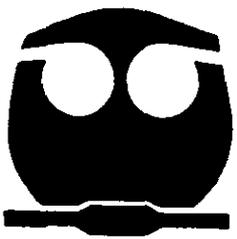
FACULTAD DE QUIMICA  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

UTILIZACION DE XILANASAS DE *Aspergillus* sp.  
FP-470 PARA EL MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD  
DE PANES ELABORADOS CON HARINAS DE BAJO  
POTENCIAL DE PANIFICACION

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS**  
**(QUIMICA DE ALIMENTOS)**  
P R E S E N T A :  
**PABLO F. MORALES RIVERA**

ASESOR DE TESIS: DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO



MEXICO, D. F. 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

272918.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio y con el apoyo de CONACYT (proyecto IF-259).**

**Las pruebas de panificación se desarrollaron en el Laboratorio de Farinología de Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, con el apoyo del Dr. Alfredo Salazar Zazueta**

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dra Amelia Farres Gonzalez

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Dr Alfredo Salazar Zazueta

por sus valiosos comentarios para la realización de este proyecto.

Gracias al jurado integrado por:

Dr. Alfredo Salazar Zazueta

Dra. Amelia Farrés González

Dra. María del Carmen Montes Horcasitas

Dr Hermilo Leal Lara

M. en C Mariano García Garibay

por su rápida evaluación del presente trabajo y sus comentarios.

## **Agradecimientos**

Quiero dar las gracias de todo corazón Dr. Guillermo Aguilar y Blanca Trejo por permitirme trabajar en su grupo, por su apoyo, por sus consejos, y sobre todo por su amistad.

Agradezco al Dr. Alfredo Salazar por permitirme utilizar las instalaciones del Laboratorio de Farinología del INIFAP y por brindarme su amistad.

Agradezco a mis compañeras de grupo Norma, Berenice, Rosa Isela y Marti por su amistad y sus consejos.

Quiero agradecer especialmente a toda mi familia por todo el apoyo y confianza que me han brindado durante mi estadía en este país.

Finalmente agradezco a mi esposa por todo su amor, comprensión y por darme las fuerzas para seguir adelante.

## Contenido

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	3
2.1. Composición química de los principales componentes de la harina	4
2.1.1. Lípidos	4
2.1.2. Proteínas	5
2.1.2.1. Proteínas solubles	6
2.1.2.2. Proteínas del gluten	6
2.1.2.2.1. Gliadinas	6
2.1.2.2.2. Gluteninas	7
2.1.3. Almidón	8
2.1.3.1. Amilosa	10
2.1.3.2. Amilopectina	11
2.1.4. Polisacáridos no almidonosos	12
2.1.4.1. Pentosanos solubles	13
2.1.4.2. Pentosanos insolubles	14
2.2. Importancia de los lípidos en panificación	15
2.2.1. Lípidos polares	15
2.2.2. Lípidos no polares	15
2.3. Importancia de las proteínas en panificación	16
2.3.1. Proteínas solubles	16
2.3.2. Proteínas del gluten	16
2.3.3. Relación gliadina/glutenina	17
2.4. Propiedades de los polisacáridos no almidonosos	18
2.4.1. Propiedades reológicas	19
2.4.2. Capacidad de retención de agua	20
2.4.3. Tensión superficial	20
2.5. Reología de la masa	21

2.6.	Xilanasas	22
2.6.1.	$\beta$ -Xilosidasas	24
2.6.2.	$\alpha$ -Arabinofuranosidasas	24
2.6.3.	$\alpha$ -Glucuronosidasas	25
2.6.4.	Acetilxilanesterasas	25
2.6.5.	Acido ferúlico y p-cumárico esterases	25
2.6.6.	Endoxilanasas	25
3.	Hipotesis y Objetivos	28
3.1.	Hipótesis	28
3.2.	Objetivo general	28
3.3.	Objetivos particulares	28
4.	Materiales y Métodos	29
4.1.	Medio de cultivo	29
4.2.	Soluciones enzimáticas comerciales	29
4.3.	Contenido de proteína	29
4.4.	Actividad enzimática	30
4.5.	Obtención de las harinas	30
4.6.	Análisis para determinar la calidad de las harinas	30
4.6.1.	Análisis físico-químicos	30
4.6.1.1.	Determinación de humedad	30
4.6.1.2.	Determinación de cenizas	30
4.6.1.3.	Determinación de proteínas	30
4.6.1.4.	Determinación de gluten	31
4.6.1.5.	Falling Number o tiempo de caída	31
4.6.1.6.	Pentosanos totales	31
4.6.1.7.	Pentosanos solubles	32
4.6.2.	Determinación de las propiedades reológicas de las harinas	32
4.6.2.1.	Farinógrafo	32
4.6.2.2.	Alveógrafo	32
4.7.	Capacidad de absorción de agua	33

4.8.	Pruebas de panificación	33
4.8.1.	Volumen	34
4.8.2.	Valoración del pan	34
4.8.2.1.	Color de la corteza	34
4.8.2.2.	Color de la miga	34
4.8.2.3.	Apariencia de la miga	34
4.9.	Textura (Vida de anaquel)	34
4.10.	Extracción y purificación de los pentosanos	34
5.	Resultados y Discusión	36
5.1.	Producción del filtrado enzimático	36
5.2.	Clasificación de las harinas a utilizarse en las pruebas reológicas y de panificación	38
5.2.1.	Análisis fisicoquímicos	38
5.2.2.	Determinación de pentosanos	39
5.3.	Pruebas reológicas	40
5.3.1.	Farinogramas	40
5.3.2.	Alveogramas	42
5.4.	Capacidad de absorción de agua	44
5.5.	Pruebas de panificación	45
5.5.1.	Prueba de panificación	45
5.5.2.	Análisis sensorial del producto terminado	48
5.6.	Textura o vida de anaquel	50
5.7.	Extracción y purificación de pentosanos	52
5.8.	Actividad xilanólítica sobre diferentes sustratos	53
6.	Conclusiones	55
7.	Bibliografía	56

## Resumen

Los pentosanos constituyen algo más del 3% del total de polisacáridos presentes en la harina de trigo, tienen la capacidad de absorber agua en cantidades superiores a 10 veces su propio peso, su contenido afecta de gran manera a las propiedades reológicas de la masa y a las características de panificación. Se ha demostrado que más del 20% del agua de las masas de harina de trigo está asociada con éstos.

Las xilanasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 de los arabinoxilanos. Algunos estudios señalan que el volumen del pan aumenta al tratar las harinas con enzimas que hidrolizan a los xilanos.

El objetivo de la presente investigación es el de utilizar enzimas xilanolíticas producidas por *Aspergillus sp.* FP-470 para mejorar las características de panes elaborados con harinas que tienen un bajo potencial de panificación.

Se obtuvo un filtrado enzimático (FX-470) que presentó mayor actividad específica que las enzimas comerciales empleadas en panificación. El tratamiento de las suspensiones de harina con este filtrado produjo disminuciones en la capacidad de absorción de agua de las mismas, permitiendo que el agua no absorbida por los pentosanos al ser hidrolizados quede a disposición de los demás componentes de la harina.

La adición de FX-470 en las masas de las diferentes harinas produjo modificaciones en sus propiedades reológicas. Los mejores resultados se obtuvieron con dosis entre 50 y 150 ppm. El grado de las modificaciones no solamente depende de la dosis enzimática sino también de la calidad de la harina.

En las pruebas de panificación se compararon los incrementos de volumen producidos por FX-470 con los de una enzima comercial. Los panes elaborados con las xilanasas del FX-470 mostraron incrementos de volumen comparables a los mostrados por los panes elaborados con la enzima comercial.

Cuando se emplearon a los pentosanos solubles (PS) e insolubles (PI) extraídos de la harina de trigo como sustrato en la determinación de la actividad xilanolítica, la actividad en los PS fue 1.2 veces mayor que en xilanos de abedul y 10 veces mayor que en los PI. Esto demuestra que los cambios observados se deben principalmente a la acción de FX-470 sobre los PS.

## 1. Introducción

El término hemicelulosa se refiere a los polisacáridos que conforman las paredes celulares de las plantas y son solubles en álcali. Las hemicelulosas o pentosanos son un grupo de polisacáridos que se clasifican de acuerdo a su composición química y su estructura. Así, se tienen los L-arabinos, que están compuestos por unidades de L-arabinosa, los D-galactanos, por unidades de D-galactosa, y los D-xilanos por unidades de D-xilosa. La mayoría de los pentosanos son heteropolímeros, en los cuales una cadena corta o ramificación está unida a la cadena principal (Bastawde, 1992).

Los pentosanos constituyen algo más del 3% del total de polisacáridos presentes en las harinas de trigo. Estos polisacáridos tienen la capacidad de absorber agua en cantidades superiores a 10 veces su propio peso (Monfort et al., 1996).

Los pentosanos son uno de los principales componentes de la fibra dietética. Su contenido afecta de gran manera las propiedades reológicas de la masa de harina de trigo (Hoseney 1984) y las características de productos de panificación (Roels et al., 1993).

La principal propiedad de los pentosanos es su gran capacidad para absorber agua, por lo que pueden formar soluciones altamente viscosas, y se ha demostrado que más del 20% del agua en las masas de harina de trigo está asociada con los pentosanos (McCleary, 1992). Otra propiedad de estos polisacáridos es su participación en las reacciones de oxidación en presencia de un agente oxidante (D'Appolonia y Schwarz, 1992).

El grupo de enzimas responsable de la degradación de las hemicelulosas es conocido como hemicelulasas y entre las principales se tienen: D-xilanasas, L-arabinasas y D-galactanasas.

Las xilanasas son capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 de los xilanos. La degradación enzimática de polisacáridos se puede realizar mediante dos mecanismos: exo y endo. En el mecanismo exo, el polisacárido es degradado por el retiro sucesivo de los azúcares terminales de la cadena polimérica. En el mecanismo del tipo endo la degradación del polisacárido se produce de manera aleatoria; en las primeras etapas, las moléculas de enzima unidas al sustrato causan rupturas múltiples en el polisacárido y producen fragmentos más cortos, que servirán como sustrato para la siguiente degradación.

Desde hace varias décadas se ha hecho una práctica común el utilizar aditivos para mejorar la masa y la calidad de los productos horneados. El uso de aditivos depende de las

características que se quieren modificar: manejabilidad de la masa, retención de agua, calidad del producto (volumen y color) y otras propiedades como dureza de la corteza y sabor. El volumen del pan es considerado como el principal parámetro de calidad. Muchos aditivos han sido empleados para mejorar el volumen; entre éstos, las enzimas de origen bacteriano y fúngico han demostrado un efecto positivo, especialmente cuando se utilizan en harinas de baja calidad (bajo contenido de gluten) (Maat et al., 1992).

El uso cuidadoso de las xilanasas puede mejorar algunas de las características del pan, como el color de la corteza y el volumen de la hogaza, sin embargo, un tratamiento de la masa con niveles excesivos de xilanasas ocasiona una pérdida rápida en la fuerza de la masa y produce una masa húmeda y pegajosa (McCleary 1992).

## 2. Antecedentes

El efecto de los pentosanos de trigo sobre las características de las masas de panificación se ha estudiado más sistemáticamente desde la década de los 60's. Sin embargo, la información de la literatura correspondiente es controvertida, al igual que el efecto de la utilización de xilanasas en panificación. Los principales hechos son los siguientes:

En 1967 se demostró que la presencia de 2% de pentosanos insolubles del endosperma mejoró el volumen del pan en 30 - 45%; así mismo se mejoró la uniformidad de la miga, la plasticidad de la masa y las características de la corteza (Hoseney 1984).

En 1968 se informó que los pentosanos tuvieron efectos negativos sobre la calidad del pan, también se demostró que el volumen de la hogaza aumentaba al tratar las harinas con enzimas que hidrolizan los arabinoxilanos (Roels et al., 1993)

En 1970, mediante cromatografía en DEAE-celulosa se obtuvieron 5 fracciones de pentosanos, dos de ellas, arabinoxilanos puros, mismos que al ser adicionados al sistema gluten-almidón produjeron un pequeño aumento en el volumen del pan y mostraron un efecto negativo en el color de la corteza (D'Appolonia y Schwarz, 1992).

En 1986, McCleary adicionó una endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasasa a la formulación del pan, obteniendo una masa húmeda y demasiado pegajosa para ser moldeada con las manos y además mostró un efecto negativo en la corteza; sin embargo, el volumen del pan se incrementó en 12% aproximadamente (D'Appolonia y Schwarz, 1992).

En 1987 Shogren y Finney informaron que la diferencia entre las calidades de

características que se quieren modificar: manejabilidad de la masa, retención de agua, calidad del producto (volumen y color) y otras propiedades como dureza de la corteza y sabor. El volumen del pan es considerado como el principal parámetro de calidad. Muchos aditivos han sido empleados para mejorar el volumen; entre éstos, las enzimas de origen bacteriano y fúngico han demostrado un efecto positivo, especialmente cuando se utilizan en harinas de baja calidad (bajo contenido de gluten) (Maat et al., 1992).

El uso cuidadoso de las xilanasas puede mejorar algunas de las características del pan, como el color de la corteza y el volumen de la hogaza, sin embargo, un tratamiento de la masa con niveles excesivos de xilanasas ocasiona una pérdida rápida en la fuerza de la masa y produce una masa húmeda y pegajosa (McCleary 1992).

## **2. Antecedentes**

El efecto de los pentosanos de trigo sobre las características de las masas de panificación se ha estudiado más sistemáticamente desde la década de los 60's. Sin embargo, la información de la literatura correspondiente es controvertida, al igual que el efecto de la utilización de xilanasas en panificación. Los principales hechos son los siguientes:

En 1967 se demostró que la presencia de 2% de pentosanos insolubles del endosperma mejoró el volumen del pan en 30 - 45%; así mismo se mejoró la uniformidad de la miga, la plasticidad de la masa y las características de la corteza (Hoseney 1984).

En 1968 se informó que los pentosanos tuvieron efectos negativos sobre la calidad del pan, también se demostró que el volumen de la hogaza aumentaba al tratar las harinas con enzimas que hidrolizan los arabinoxilanos (Roels et al., 1993)

En 1970, mediante cromatografía en DEAE-celulosa se obtuvieron 5 fracciones de pentosanos, dos de ellas, arabinoxilanos puros, mismos que al ser adicionados al sistema gluten-almidón produjeron un pequeño aumento en el volumen del pan y mostraron un efecto negativo en el color de la corteza (D'Appolonia y Schwarz, 1992).

En 1986, McCleary adicionó una endo-1,4-β-D-xilanasasa a la formulación del pan, obteniendo una masa húmeda y demasiado pegajosa para ser moldeada con las manos y además mostró un efecto negativo en la corteza; sin embargo, el volumen del pan se incrementó en 12% aproximadamente (D'Appolonia y Schwarz, 1992).

En 1987 Shogren y Finney informaron que la diferencia entre las calidades de

panificación entre las distintas harinas no solo depende del contenido y calidad de la proteína, sino también del contenido de pentosanos y por lo tanto de sus interacciones

En 1992 Maat et al. adicionaron una endoxilanasas pura a la formulación de panes y obtuvieron incrementos en el volumen cercanos al 30% con dosis de 200 mg/kg de harina.

En 1993 Roels encontró que los pentosanos solubles tienen un efecto negativo en la manejabilidad de la masa y por consiguiente en el potencial de panificación de las harinas de trigo. Este efecto puede ser el resultado de: 1) la inmovilización de una cantidad de agua necesaria para la completa hidratación del gluten; y/o 2) la interferencia de los pentosanos en la agregación de las moléculas de glutenina. El mismo autor confirmó las observaciones realizadas por Holas y Tipples (1978), quienes demostraron que el nivel de absorción en el horneado (BA) aumenta al disminuir el contenido de pentosanos solubles y el tiempo de mezclado (MT) se reduce con un alto contenido de pentosanos solubles. Análisis de pentosanos realizados en harinas indican que las harinas de baja calidad (MT corto y bajos niveles de BA) tienen un alto contenido de pentosanos solubles.

## **2.1. Composición química de los principales componentes de la harina de trigo**

### **2.1.1. Lípidos**

El contenido total de lípidos en la harina de trigo es de casi 2.5% (p/p), y su composición se muestra en la tabla 1.

Los lípidos se dividen en dos grupos: los *lípidos polares*, que pueden interactuar con el agua para formar fases acuosas, y los *lípidos no polares* que no forman fases acuosas.

Los lípidos no polares están principalmente constituidos por triglicéridos que son líquidos a temperatura ambiente (aceites). Están presentes principalmente en el embrión, y como gotas de emulsión en el endosperma. Los lípidos polares provienen de las membranas celulares y están constituidos principalmente por fosfolípidos y glicol o galactolípidos.

En la planta, así como en la harina de trigo existen enzimas con actividad lipolítica y fosfolipolítica.

Los triacilglicéridos están presentes como reserva, emulsificados en la capa de aleurona del germen; los galactolípidos son importantes por su participación en la fotosíntesis.

El patrón de ácidos grasos es dominado por el ácido linoleico (60%), seguido por el ácido palmítico (20%) y el ácido oleico (15%). Durante el almacenamiento, los ácidos

grasos libres aumentan debido a la actividad lipasa. Además, la oxidación enzimática de los ácidos grasos puede producir hidroxiácidos grasos, con efectos sensoriales negativos.

**Tabla 1. Composición de los lípidos del trigo**

<b>Lípido</b>	<b>Total</b> ( <sup>mg</sup> /100g harina)	<b>No almidonosos</b> ( <sup>mg</sup> /100g harina)	<b>Almidonosos</b> ( <sup>mg</sup> /100g harina)
Ester esteroil (EE)	90	90	18
Triglicérido (TG)	709	674	35
Diglicérido (DG)	92	86	6
Ácidos grasos libres (AGL)	129	110	19
Monogalactosil diglicérido esterificado (MGDGE) y monoglicérido (MG)	73	66	7
Esterilglicósido esterificado (EGE)	77	71	6
Monogalactosil diglicérido (MGDG)	93	87	6
Monogalactosil monoglicérido (MGMG)	30	23	7
Digalactosil diglicérido (DGDG)	226	214	12
Digalactosil monoglicérido (DGMG)	83	58	25
N-acil fosfatidil etanolamina (AFE)	72	72	-
N-acil lisofosfatidil etanolamina (ALFE)	34	34	-
Fosfatidil etanolamina (FE) y fosfatidil glicerol (FG)	19	13	6
Lisofosfatidil etanolamina (LFE) y lisofosfatidil glicerol (LFG)	69	10	59
Fosfatidil colina (FC)	104	66	38
Lisofosfatidil colina (LFC)	693	36	657
Fosfatidil serina (FS), lisofosfatidil serina (LFS), fosfatidil mioinositol (FI) y lisofosfatidil mioinositol (LFI)	35	11	24
<b>Total</b>	<b>2628</b>	<b>1703</b>	<b>925</b>

Fuente: Eliasson y Larsson, 1993

### 2.1.2. Proteínas

El contenido de proteína en el trigo oscila entre 7 y 20%. La relación entre volumen del pan y contenido de proteína es lineal, por lo menos para el intervalo de 9 - 18% de proteína. La importancia de las proteínas en la panificación no es solo cuestión de cantidad, sino también de calidad. Se sabe que es posible mejorar el rendimiento de panificación de una variedad de trigo aumentando el contenido de proteína (Eliasson y Larsson, 1993).

Las proteínas del trigo están compuestas por cinco fracciones: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), gliadinas (solubles en etanol acuoso), gluteninas (solubles o dispersables en ácido o álcali diluido) y un residuo insoluble. El porcentaje de cada fracción proteica es mostrado en la tabla 2.

**Tabla 2. Porcentaje de proteína en el trigo**

<b>Fracción</b>	<b>Porcentaje</b>
Albúmina (%)	14.7 - 15.0
Globulina (%)	3.0 - 7.0
Gliadina (%)	32.6 - 33.0
Glutenina (%)	16.0 - 45.7
Residuo (%)	33.0

Fuente: Eliasson y Larsson, 1993

### **2.1.2.1. Proteínas solubles**

Aunque las proteínas solubles son una mezcla compleja, tienen algunas propiedades en común que las diferencian de las proteínas del gluten o de almacenamiento. La mayoría de las proteínas solubles tienen un peso molecular menor a 40,000 Da y un pI de 5 - 8. La composición de aminoácidos está caracterizada por altos niveles de lisina y bajos niveles de glutamina comparados con las proteínas del gluten.

Muchas de las proteínas solubles se localizan en el embrión y en el aleurona, pero también pueden estar presentes en el endosperma.

### **2.1.2.2. Proteínas del gluten**

Las proteínas del gluten o proteínas de almacenamiento del endosperma del trigo son ricas en glutamina y prolina, pero pobres en lisina y arginina. El gluten puede ser visto como una mezcla de proteínas con una distribución de peso molecular desde 30,000 hasta 20 millones Da. No obstante los intentos realizados para dividir esta mezcla compleja en subgrupos menos complejos para comprender mejor su comportamiento, la mejor división es en: gliadinas y gluteninas (tabla 2).

#### **2.1.2.2.1. Gliadinas**

Estas proteínas son solubles en etanol acuoso y todos los enlaces disulfuro presentes son intramoleculares. La conformación de las gliadinas está estabilizada por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Constituyen del 30 al 35% del total de las proteínas (tabla 2). El grupo de gliadinas es heterogéneo y puede ser dividido en 4 fracciones:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ - gliadinas. La suma de las  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -gliadinas constituye del 34 - 48% de la proteína, mientras que las  $\omega$ -gliadinas constituyen del 8 - 13%

El peso molecular de la mayoría de las gliadinas es de 30,000 – 40,000 Da, sin embargo, el peso molecular de las  $\omega$ -gliadinas está alrededor de 60,000 – 80,000 Da. También se han encontrado algunas gliadinas de alto peso molecular (APM), en un rango de 100,000 – 200,000 Da.

La composición de aminoácidos de las gliadinas está caracterizada por un alto nivel de glutamina y prolina. El contenido de aminoácidos azufrados difiere entre las  $\omega$ -gliadinas y las otras gliadinas. Las  $\omega$ -gliadinas son las de menor carga con solo seis grupos básicos y casi la misma cantidad de grupos carboxilos libres que los calculados para una proteína de 65,000 Da.

Las  $\gamma$ -gliadinas muestran la mayor superficie hidrofóbica. Sin embargo, cuando las gliadinas forman agregados, el número de sitios de unión hidrofóbica disminuye considerablemente.

El elevado contenido de prolina afecta a la estructura secundaria de las gliadinas, ya que los residuos de prolina interrumpen las  $\alpha$ -hélices. Las  $\omega$ -gliadinas difieren de las otras en que no contienen  $\alpha$ -hélices u hojas  $\beta$ -plegadas, en cambio contienen giros  $\beta$ . Como el contenido de cisteína es muy bajo, los enlaces disulfuro no son importantes para la conformación de las  $\omega$ -gliadinas. La estructura de las  $\alpha$ -hélices de las otras gliadinas es muy estable, por ejemplo al calor. Aunque los enlaces disulfuro pueden ayudar a estabilizar a la estructura, las principales fuerzas estabilizantes son atribuidas a un elevado número de puentes de hidrógeno.

#### 2.1.2.2.2. Gluteninas

Las gluteninas son las proteínas que permanecen después de que se han extraído las albúminas, globulinas y gliadinas. Constituyen del 40 -50% de las proteínas de la harina de trigo (tabla 2). La cantidad de gluteninas aumenta cuando el contenido de proteína del trigo aumenta. Las gluteninas son dispersables en ácido o álcali diluido, en desnaturalizantes como la urea y en surfactantes.

Las gluteninas son agregados construidos por partículas esféricas. El peso molecular de cada agregado es de  $8 \times 10^5$  Da aproximadamente, el cual corresponde a una partícula de 10 nm. Las subunidades de glutenina usualmente están divididas en dos grupos: subunidades de bajo peso molecular (BPM) y subunidades de alto peso molecular (APM), aunque

algunos autores incluyen un tercer grupo de mediano peso molecular MPM que tienen un peso molecular entre 90,000 – 150,000 Da. Las subunidades de BPM tienen un peso de 30,000 – 51,000 Da. El grupo más hidrofóbico son las gluteninas de BPM, y las gluteninas de MPM son las menos hidrofóbicas.

La secuencia de aminoácidos de las gluteninas está formada de tres dominios: el dominio N-terminal consiste de aproximadamente 100 residuos, el dominio C-terminal consiste de casi 50 residuos y un dominio central constituido por 600 - 800 residuos. Los dominios N y C-terminal contienen cisteína y aminoácidos iónicos, pero un bajo contenido de prolina. El dominio central tiene altas proporciones de glutamina, glicina y prolina.

Las gluteninas de APM se caracterizan por una gran proporción de giros  $\beta$  en el dominio central y se ha sugerido que éstos son los responsables de la elasticidad de las gluteninas

Las subunidades de glutenina están unidas mediante enlaces disulfuro a los enormes agregados poliméricos de glutenina. Esto es consistente con la localización de los enlaces disulfuro en los dominios terminales de cada subunidad, que se hace evidente debido a la presencia de residuos de cisteína en dichos dominios.

Todas las subunidades de glutenina son agregados; no existen gluteninas monoméricas. Los polímeros nativos de glutenina más pequeños son dímeros de unidades de BPM con pesos moleculares entre 60,000 – 80,000 Da.

Existen dos corrientes que tratan de explicar el lugar y momento en el que se produce la polimerización de las gluteninas. Unos investigadores asumen que la polimerización de las moléculas de glutenina ocurre en el grano durante la síntesis. Los otros aseguran que la polimerización ocurre cuando las subunidades de glutenina son expuestas al aire durante el mezclado (formación del gluten) (Eliasson y Larsson, 1993).

### **2.1.3. Almidón**

El almidón es el principal componente de la harina de trigo, 74 - 90% en base seca. Este tiene propiedades que son cruciales para la función de la harina, y estas propiedades parecen ser una de las razones de las diferencias en el rendimiento de panificación entre las variedades de trigo.

El almidón provee a las levaduras de azúcares fermentables, contribuye a la

estructura de la miga y a la estructura y al color de la corteza. Durante el almacenamiento del pan, los componentes del almidón también causan cambios detrimentales. Las interacciones almidón-proteína son importantes en todo el proceso de panificación. Si estas interacciones no son optimizadas, la película que rodea a las células de gas puede romperse. Se ha sugerido que estas interacciones también están involucradas con el endurecimiento del pan (Martin y Hosney, 1991; Eliasson y Larsson, 1993)

El almidón es hidrolizado por las  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas, las primeras actúan sobre todos los enlaces glicosídicos  $\alpha(1-4)$  de la cadena, excepto en los adyacentes a los extremos y en la vecindad de las ramificaciones. Las  $\beta$ -amilasas hidrolizan el segundo enlace glicosídico  $\alpha(1-4)$  a partir del extremo reductor, produciendo maltosa. La importancia de estas enzimas en panificación radica en que al producir dextrinas de bajo grado de polimerización (2 – 7), se retarda el endurecimiento del pan (Martin y Hosney, 1991)

Los gránulos de almidón son los medios mediante los cuales las plantas de trigo almacenan energía. La forma y el tamaño del gránulo de almidón es típico de su origen botánico. Los gránulos de almidón de trigo están ilustrados en la figura 1.

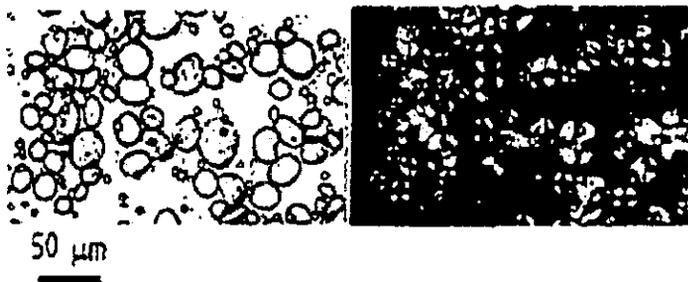


Figura 1. Gránulos de almidón de trigo. Luz ordinaria (Izq.); luz polarizada (Der.) (Fuente: Eliasson y Larsson, 1993)

El tamaño de los gránulos de almidón de trigo es de 1 -30  $\mu\text{m}$ , la distribución de tamaño es bimodal. Los gránulos B son pequeños, esféricos y tienen un diámetro menor a 10  $\mu\text{m}$ ; con un valor medio de 4  $\mu\text{m}$ . Los gránulos A son más grandes, lenticulares y con un diámetro mayor a 10  $\mu\text{m}$ , con una media de 14  $\mu\text{m}$ , y tienen un surco ecuatorial típico de ellos. Los gránulos B constituyen el 23.9 - 28.2% del volumen total de almidón, pero casi el 90% del número de gránulos de almidón.

Existen varias diferencias en la composición de los gránulos A y B, algunas de ellas están dadas en la tabla 3.

**Tabla 3. Composición de los gránulos A y B del almidón de trigo**

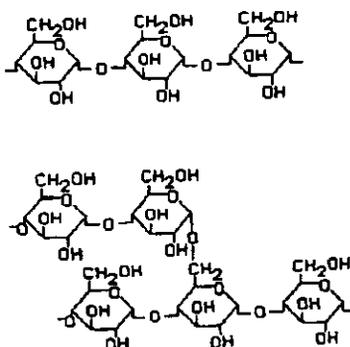
Componente	Gránulos A-	Gránulos B-
Amilosa <sup>a</sup> (%)	29.2 ± 1.0	27.4 ± 1.6
Lípidos (mg/100 g)		
AGL <sup>a, b</sup>	84 ± 25	162 ± 50
LFL <sup>a, b</sup>	845 ± 65	1062 ± 90

<sup>a</sup> Valor medio y desviación estándar de 23 variedades

<sup>b</sup> AGL = ácidos grasos libres; LFL = lipofosfolípidos

Fuente: Eliasson y Larsson, 1993

El gránulo de almidón está casi 100% compuesto de los polisacáridos amilosa y amilopectina. Tanto la amilosa como la amilopectina son polímeros de glucosa unidos por enlaces  $\alpha(1-4)$ ; la amilopectina contiene 4 - 5% de enlaces  $\alpha(1-6)$ , formando una molécula ramificada (figura 2). La amilosa y la amilopectina tienen una amplia distribución de tamaños moleculares. La proporción de amilosa en el almidón de trigo es de casi 29%.



**Figura 2.** Estructuras de la amilosa (arriba) y amilopectina (abajo)  
(Fuente: Eliasson y Larsson, 1993)

### 2.1.3.1. Amilosa

La amilosa es esencialmente lineal con un grado de polimerización (GP) promedio de 1290 en el almidón de trigo. La molécula de amilosa también puede contener algunos enlaces  $\alpha(1-6)$ . El comportamiento de la amilosa en solución ha sido interpretado como un enrollamiento al azar con estructuras helicoidales irregulares y lábiles (figura 3). Aunque la amilosa es ligeramente ramificada, las ramificaciones no modifican su comportamiento en

solución y se comporta como un polímero lineal.

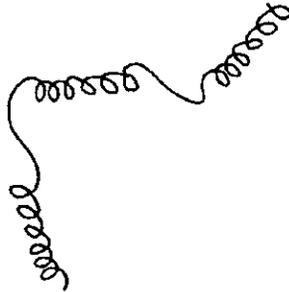


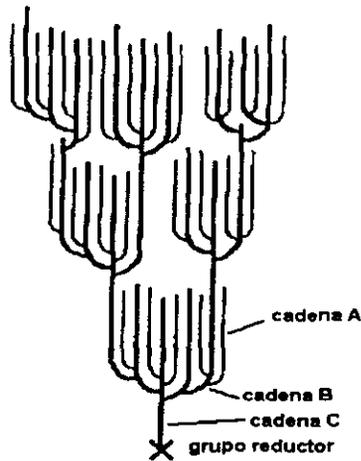
Figura 3. Amilosa en solución (Fuente Eliasson y Larsson. 1993)

Hay dos características de la amilosa que son importantes para la panificación. La primera, es la gran tendencia a formar puentes de hidrógeno intramoleculares, lo que significa una fuerte tendencia hacia la cristalización (retrogradación); por lo que una solución de amilosa no es muy estable. La segunda característica se refiere a la habilidad de la amilosa para formar complejos de inclusión.

### 2.1.3.2. Amilopectina

La amilopectina es una molécula mucho más grande que la amilosa; se han reportado valores de GP de 10,000. Es una molécula ramificada, la longitud de cadena (LC) de amilopectina en el almidón de trigo presenta una distribución trimodal. Las cadenas más cortas tienen una longitud de cadena promedio de 17, el segundo grupo de cadenas tienen un valor de 56 y las cadenas más largas tienen valores de 200 o más.

Los análisis realizados muestran que existen tres tipos de cadenas: las cadenas A que están unidas a la molécula mediante enlaces  $\alpha(1-6)$ , pero todos los demás enlaces son  $\alpha(1-4)$ ; las cadenas B que están unidas de la misma manera, pero también pueden contener otras cadenas (A o B) mediante enlaces  $\alpha(1-6)$ ; finalmente, existe una sola cadena C, que es la que lleva al único extremo reductor de la molécula (figura 4).



**Figura 4.** Modelo de amilopectina (Fuente: Eliasson y Larsson, 1993)

Las soluciones de amilopectina no muestran tendencia a la retrogradación, como las de amilosa. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas la amilopectina también puede cristalizar. La habilidad de la amilopectina para formar complejos de inclusión es menos pronunciada que la de la amilosa.

#### 2.1.4. Polisacáridos no Almidonosos

Los polisacáridos no almidonosos se encuentran principalmente en la pared celular y pueden dividirse en tres grupos: celulosa,  $\beta$ -glucanos y pentosanos. El contenido de celulosa en la harina de trigo es de 0.6%, mientras que el de los polisacáridos no celulósicos es de 2.52%. De estos, la cantidad de  $\beta$ -glucanos es muy pequeña (1 – 5%) en el trigo; mientras que en la cebada y en la avena la cantidad es muy alta (Eliasson y Larsson, 1993; Cleemput et al., 1993).

Los pentosanos son llamados así por ser polímeros de pentosas, siendo las más abundantes la xilosa y la arabinosa (tabla 4). Aunque estos polisacáridos son considerados como componentes menores de la harina por estar presentes en cantidades del 2 - 3% (Rouau y Moreau, 1993), tienen un efecto importante en la panificación, en los alimentos para aves (Faurot et al., 1995; Delcour et al., 1999), en el balance del agua en la masa, en las propiedades reológicas y en la retrogradación del almidón (Izydorczyk y Biliaderas, 1993).

En virtud de que los pentosanos del trigo están constituidos principalmente por arabinoxilanos (heteropolímeros de xilosa y arabinosa); en el presente trabajo el término pentosanos se refiere a los arabinoxilanos.

Los pentosanos están divididos de acuerdo a su solubilidad en: pentosanos solubles (PS) y pentosanos insolubles (PI) (Eliasson y Larsson, 1993). Del total de los pentosanos del trigo, aproximadamente el 30% son solubles. (Faurot et al., 1995).

Los pentosanos pueden tener influencia en la panificación de 2 maneras: por la capacidad de retener agua (Rouau y Moreau, 1993; Eliasson y Larsson, 1993) y por su participación en la gelificación oxidativa (Rouau y Moreau, 1993; Eliasson y Larsson, 1993; Hosney, 1984). En la 1ª, pueden modificar en la distribución de agua en la masa y también en la estabilidad de la misma debido a su comportamiento reológico. En la 2ª, el incremento en la viscosidad de la fase continua produce un aumento en la capacidad para retener gas, lo que ocasiona una disminución de la coalescencia de las burbujas de gas (Eliasson y Larsson, 1993; Sarker et al., 1998).

#### 2.1.4.1. Pentosanos solubles

Los pentosanos solubles (PS) son polisacáridos que se extraen de la harina con agua fría, están presentes en cantidades de 0.5 - 1% en la harina de trigo (Eliasson y Larsson, 1993; Fengler y Marquardt, 1988; Izydorczyk<sup>1</sup> et al., 1991; Cleemput et al., 1993). La composición de monosacáridos de los pentosanos totales y solubles, se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4. Composición de monosacáridos de los PT y PS**

Fracción	Arabinosa (%)	Xilosa (%)	Galactosa (%)	Glucosa (%)	Fructosa (%)
Pentosanos Totales	35 - 40	29 - 40	19.8 - 24	2.7 - 10.5	trazas
Pentosanos Solubles					
Arabinoxilanos	31 - 51	52.1 - 62		1.6 - 10	
Arabinogalactanos		32 - 41.5	0 - 2	45 - 59	0 - 21
Pentosanos Solubles	11 - 43	31 - 72	1.9 - 4	0 - 2	

Fuente: Eliasson y Larsson, 1993; Izydorczyk<sup>1</sup> et al., 1991; Rouau y Moreau, 1993  
Faurot et al., 1995.

La figura 5 muestra la unidad básica repetitiva de los PS (D'Appolonia y Schwarz, 1992). La cadena principal está constituida por unidades de anhidro D-xilopiranosilo unidas

mediante enlaces  $\beta$ -1,4. A la cadena principal se unen residuos de anhidro L-arabinofuranósilo en las posiciones 2 y/o 3 de las unidades de xilosa (D'Appolonia y Schwarz, 1992; Hosoney, 1984). Además de xilosa y arabinosa, el polímero puede contener galactosa (Rouau y Moreau, 1993; Hosoney, 1984; Eliasson y Larsson, 1993) y proteína (Eliasson y Larsson, 1993)

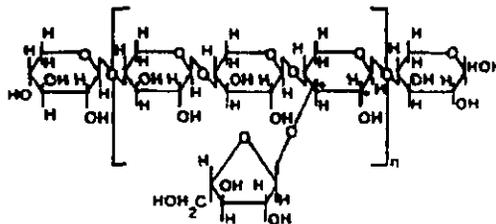


Figura 5. Estructura de los pentosanos del endosperma del trigo. \* muestra las posibles ramificaciones de arabinosa en los puntos C2 y C3 (Fuente: D'Appolonia y Schwarz, 1992)

Los PS también contienen ácido ferúlico, el cual está unido solo a los arabinoxilanos más grandes (Eliasson y Larsson, 1993) y el contenido de éste varía de 0.31 - 2.6 mg/g de pentosano (Eliasson y Larsson, 1993; Faurot et al., 1995).

#### 2.1.4.2. Pentosanos insolubles

Los principales azúcares de los PI son la D-xilosa, la L-arabinosa y la D-glucosa (tabla 5); la proporción de estos azúcares difiere entre las variedades de trigo (Eliasson y Larsson, 1993). Una de las diferencias entre los PI y los PS es el grado de ramificación, teniendo los PI un mayor grado de ramificación, de igual manera el peso molecular de estos polímeros es mayor que el de los PS. El grado de polimerización de los PS es de 160 - 190 y el de los PI es de casi 900 (Eliasson y Larsson, 1993). El contenido de proteína en los PI es de 10 - 15% (Eliasson y Larsson, 1993; Michniewicz et al., 1990; Faurot et al., 1995) y el de ácido ferúlico es de 0.86 - 1.10 mg/g de pentosano (Eliasson y Larsson, 1993; Michniewicz et al., 1990).

La pobre solubilidad de estos polisacáridos parece ser debida a su alto peso molecular (Eliasson y Larsson, 1993), a su alto grado de polimerización y al contenido de ácidos ferúlicos, por lo que para solubilizar a los PI se debe utilizar álcali (Michniewicz et

al., 1990).

**Tabla 5. Composición de monosacáridos de los PI**

Fracción	Arabinosa (%)	Xilosa (%)	Galactosa (%)	Glucosa (%)
Pentosanos Insolubles	23 - 38	28 - 59.5	trazas	6 - 34.3

Fuente: Eliasson y Larsson, 1993; Michniewicz et al., 1990;  
Rouau y Moreau, 1993; Cui et al. 1999

## 2.2. Importancia de los lípidos en panificación

Aunque el volumen puede ser influenciado por los lípidos del trigo, este no es el caso de las propiedades reológicas. El mixograma obtenido tanto para harinas deslipidizadas como para no deslipidizadas, es el mismo. El proceso de mezclado tiene influencia sobre los lípidos. Se ha observado que tanto los lípidos “libres” como los “ligados” contribuyen al volumen del pan y que no existe ninguna relación entre el rendimiento en el horneado y la proporción de los llamados lípidos ligados.

### 2.2.1. Lípidos polares

Los efectos de la adición de lípidos sobre el volumen del pan están ilustrados en la figura 6. El mínimo en el volumen es observado a un nivel más bajo de adición y el volumen aumenta más rápidamente que cuando la fracción de lípidos totales es adicionada.

### 2.2.2. Lípidos no polares

Cuando los lípidos de trigo no polares son adicionados a la harina deslipidizada, se observa una disminución en el volumen (figura 6). Para un nivel constante de lípidos existe una disminución lineal en el volumen del pan cuando va de 0 a 100% de lípidos no polares. El efecto detrimental de los lípidos no polares en la panificación ha sido atribuido a la presencia de ácidos grasos libres.

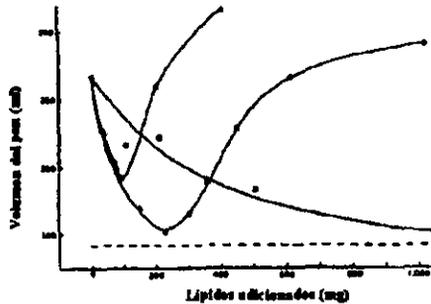


Figura 6. Relación entre volumen del pan y contenido de lípidos, cuando los lípidos extraídos son adicionados a una harina de trigo deslípida. Lípidos totales extraídos (O); lípidos no polares extraídos (□); lípidos polares extraídos (Δ). (Fuente Eliasson y Larsson, 1993)

### 2.3. Importancia de las proteínas en la panificación

#### 2.3.1. Proteínas solubles

Parece ser una opinión común que la composición de las albúminas y las globulinas no varían entre las variedades de trigo y que no existe una correlación entre la cantidad de albúminas o globulinas y el rendimiento de panificación.

Como muchas de las proteínas solubles son enzimas, ellas pueden afectar al rendimiento de panificación de manera importante. Por ejemplo, si la actividad enzimática es excesiva, como en el caso de la harina con malta, el resultado es un pan de calidad inferior, de modo que actividades proteolíticas y amilolíticas excesivas deben ser evitadas. Las lipoxigenasas, están relacionadas con las reacciones de oxidación y reducción en las masas. Otras enzimas que son de importancia, son la ácido deshidroascórbico reductasa y la ácido ascórbico oxidasa, que están relacionadas con la conversión del ácido ascórbico a ácido deshidroascórbico y las polifenol oxidasas las cuales causan el oscurecimiento de las masas del grano completo (Eliasson y Larsson, 1993).

#### 2.3.2. Proteínas del gluten

Las gliadinas parecen no ser importantes para el rendimiento de panificación. Cuando se intercambia la fracción de gliadinas entre harinas de trigo de diferente rendimiento, el efecto es mucho menor comparado con el del intercambio de gluteninas. La correlación entre volumen del pan y proporción de glutenina, es mucho mejor que la correlación entre

volumen de pan y proporción de gliadinas (Eliasson y Larsson, 1993)

Las gluteninas influyen el rendimiento de panificación de la harina de trigo en por lo menos tres formas: a través de la relación gliadina/glutenina (Eliasson y Larsson, 1993), a través de la distribución de pesos moleculares de las gluteninas y a través de la presencia de ciertas subunidades de gluteninas de APM (Huebner, 1989). Se sabe que las gluteninas controlan los requerimientos de mezclado y tienen influencia sobre el volumen del pan.

Las proteínas de APM son menos solubles que las de BPM. Las fracciones ricas en proteínas de BPM adicionadas a la harina de trigo reducen el tiempo de desarrollo en el mixógrafo así como el volumen del pan. En cambio, las fracciones con alta proporción de proteínas de APM, aumentan el tiempo de desarrollo en el mixógrafo y el volumen del pan. Las fracciones de BPM son ricas en gliadinas, mientras que las de APM son ricas en gluteninas.

Es evidente que las subunidades de glutenina de APM son importantes para el rendimiento de panificación. Sin embargo, no se sabe si la presencia de una subunidad específica de APM es directamente responsable de la calidad observada o si la presencia de subunidades coincide con otras propiedades que son la causa directa. Determinaciones electroforéticas mostraron que el volumen del pan está relacionado directamente con la proporción de subunidades de APM, lo que indica que la cantidad es más importante que el tipo de glutenina.

### **2.3.3. Relación gliadina/glutenina**

Se ha determinado una relación gliadina/glutenina de 46.5/43.5 y 54.5/45.5 para una buena variedad y una mala variedad de trigo respectivamente, los valores reportados indican que una alta proporción de gluteninas es benéfica para el rendimiento de panificación.

El comportamiento en la mezcla es muy sensible a la relación gliadina/glutenina. Si la proporción de gluteninas aumenta, los requerimientos del mezclado también aumentan y, por ejemplo, en un mixograma es necesario un mayor tiempo para obtener el pico. Cuando la proporción de gliadinas se incrementa ocurre lo inverso, es decir, en el mixograma se observa un menor tiempo de desarrollo. Si la relación gliadina/glutenina se modifica para tener una mayor proporción de gliadinas, el volumen del pan disminuirá.

Para explicar la importancia de la relación gliadina/glutenina se ha sugerido que las

gliadinas actúan como plastificante para las gluteninas. El comportamiento reológico del gluten se ve afectado ya que la gliadina interrumpe las interacciones glutenina-glutenina de manera que debilita al gluten. Sin embargo, demasiada glutenina puede resultar en un gel muy rígido, el cual puede prevenir la difusión de las células de gas.

#### **2.4. Propiedades de los polisacáridos no almidonosos**

Se ha afirmado que los pentosanos no son importantes para la panificación. Sin embargo, algunos autores aseguran que los pentosanos solubles y las glucoproteínas contribuyen a la extensibilidad del gluten y a la capacidad de retener gas de la masa (Eliasson y Larsson, 1993; Cleemput et al., 1993).

Los pentosanos pueden influenciar el comportamiento viscoelástico de la masa no solo debido a su peso molecular, sino también por su habilidad para formar geles.

La fracción de los PS está constituida por tres componentes: un arabinoxilano, una proteína libre y una proteína unida covalentemente a un arabinogalactano. Estudios viscosimétricos realizados a los extractos de harina mostraron que el polisacárido contribuye con el 95% a la viscosidad intrínseca, mientras que la proteína solo contribuye con el 5%. (Moore et al., 1990).

Las soluciones concentradas de PS forman geles a temperatura ambiente en presencia de oxidantes (Moore et al., 1990; D'Appolonia y Schwarz, 1992; Miller y Hosney, 1999). La gelificación puede ser afectada por la concentración de pentosanos, la concentración del oxidante, el pH, el contenido de cenizas y la presencia de compuestos orgánicos (Moore et al., 1990).

Debido a que la gelificación se lleva a cabo en presencia de un oxidante, el fenómeno se denomina gelificación oxidativa. Las sustancias involucradas en este fenómeno son los pentosanos, más precisamente los arabinoxilanos que contienen ácido ferúlico (Eliasson y Larsson, 1993).

La máxima absorción de los PS en el espectro UV es a 320 nm debida a la presencia de ácido ferúlico en estos polisacáridos (Hosney, 1984; Moore et al., 1990). Cuando se produce la gelificación oxidativa hay una disminución en la absorbancia, por lo que se asume que el ácido ferúlico está involucrado en el mecanismo de gelificación (Eliasson y Larsson, 1993; Hosney, 1984; Moore et al., 1990).

Existen muchas teorías para tratar de explicar la manera en la que el ácido ferúlico participa en la gelificación oxidativa, la más aceptada es la propuesta por Geissmann y Neukom en 1973, en la que proponen que la gelificación ocurre por la dimerización del ácido ferúlico mediante una reacción de acoplamiento oxidativo formando uniones intermoleculares (Moore 1990 et al.; D'Appolonia y Schwarz, 1992; Miller y Hoseney, 1999). En la figura 7 se muestra el mecanismo propuesto para esta reacción por Neukom y Markwalder en 1978 y apoyada por Moore et al. (1990), Vinkx et al. (1991) y D'Appolonia y Schwarz (1992)

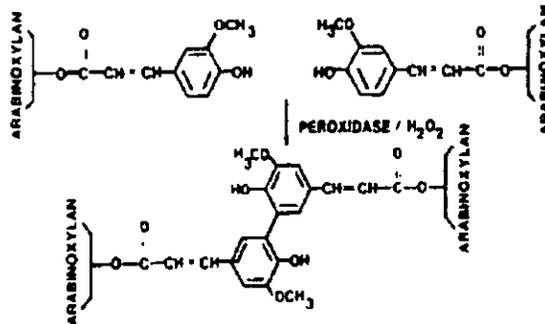


Figura 7. Mecanismo sugerido para el acoplamiento fenólico oxidativo de dos residuos de ácido ferúlico (Fuente: D'Appolonia y Schwarz, 1992)

El peróxido de hidrógeno es efectivo para producir la gelificación oxidativa, sin embargo, la concentración de este es importante, ya que niveles elevados reducen el incremento de viscosidad (Moore et al., 1990).

No todos los oxidantes son capaces de inducir la gelificación oxidativa. Además del bromato de potasio y el ácido ascórbico (oxidantes comúnmente utilizados en panificación) (Eliasson y Larsson, 1993), la cisteína, el ácido ferúlico y el ácido vainílico inhiben la gelificación (Moore et al., 1990; Vinkx et al., 1991). Otra manera de inhibir la gelificación oxidativa es la utilización de pentosanasas (Vinkx et al., 1991).

#### 2.4.1. Propiedades reológicas

Cuando los arabinoxilanos son tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidasa y dependiendo de sus concentraciones, se produce un incremento de la viscosidad y/o la formación de una red tridimensional. La composición del gel formado muestra que entre 5 - 10% de los PS están

inmovilizados por oxidación. El gel está constituido solo por arabinoxilanos, ya que los arabinogalactanos no son afectados por el oxidante (Izydorczyk<sup>h</sup> et al., 1991; Eliasson y Larsson, 1993).

Los PI también están sujetos a gelificación oxidativa. Cuando se adicionan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidasa a una suspensión acuosa de PI, se produce un incremento en el módulo de almacenamiento G' y en  $\delta$ , lo que indica la formación de un gel (Eliasson y Larsson, 1993).

Se espera que los pentosanos afecten a las propiedades reológicas de la masa debido a su elevado peso molecular.

#### **2.4.2. Capacidad de retención de agua**

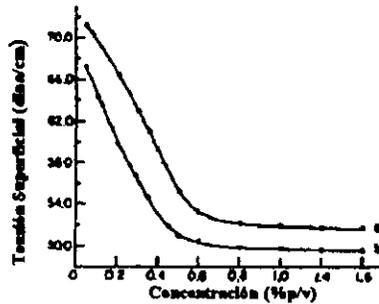
Una de las principales propiedades de los pentosanos es su gran capacidad para retener agua. La cantidad de agua que los pentosanos son capaces de retener es de 10 - 15 g de H<sub>2</sub>O/g pentosano, misma que es mucho mayor a los 0.44 - 0.45 g de H<sub>2</sub>O/g de gránulo de almidón y 1 - 3 g de H<sub>2</sub>O/g de proteína (Boyacioglu y D'Appolonia, 1992; Hamer, 1992). Estudios realizados muestran que más del 34% del agua en las masas está asociada a los pentosanos (D'Appolonia y Schwarz, 1992).

La capacidad de retención de agua de los PS (AX + AG) oxidados es de 40 - 60% y de los arabinoxilanos oxidados es de 75% (Eliasson y Larsson, 1993).

La capacidad de retención de agua de los PI es de 3.2 - 9.4 g de H<sub>2</sub>O/g de PI (Rouau y Moreau, 1993; Michniewicz et al., 1990). La influencia que tienen los PI sobre la absorción en el farinograma es mayor que la de los PS. Cuando se añade 1% de pentosanos a una masa de harina de trigo, se produce un incremento en la absorción desde 63% hasta 68% en el caso de los PS y 73.5% en el caso de los PI (Eliasson y Larsson, 1993).

#### **2.4.3. Tensión superficial**

La tensión superficial del agua disminuye al aumentar la concentración de arabinoxilanos y arabinogalactanos (figura 8). El efecto es más marcado para los últimos, sin embargo, ambos muestran el mismo comportamiento (Izydorczyk<sup>h</sup> et al., 1991).



**Figura 8.** Reducción de la tensión superficial del agua por arabinóxilano(a) y arabinogalactano(b) varias concentraciones. Tensión superficial de agua a  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$  fue  $72 \pm 0.5$  dina/cm. (Fuente Izzydorczyk<sup>b</sup> et al., 1991)

Si se piensa en un complejo de asociación entre los pentosanos y la proteína debido a que ambos participan en la reducción de la tensión interfacial; probablemente la proteína dominaría y al aumentar la concentración excluiría poco a poco al carbohidrato y se esperaría un comportamiento diferente al observado. La curva obtenida es característica de una molécula anfifílica. Así, el comportamiento observado indica que los arabinóxilanos están unidos covalentemente a las proteínas (Eliasson y Larsson, 1993).

La formación y expansión de la espuma son impedidas mediante la adición de pentosanos debido a un aumento en la viscosidad del medio líquido, también se previene la ruptura de las burbujas de gas durante la expansión térmica del  $\text{CO}_2$ . Así, los pentosanos junto con el gluten juegan un papel importante en disminuir la velocidad de difusión del  $\text{CO}_2$  de la masa durante el horneado, y por lo tanto, pueden afectar al volumen del pan y a la estructura final de la miga (Izzydorczyk<sup>b</sup> et al., 1991).

## 2.5. Reología de la masa

La harina de trigo es un sistema coloidal muy complejo e inestable, que sufre continuas modificaciones en sus características debido a la acción de fuerzas físicas, químicas y biológicas. La masa debe sus propiedades a las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y a algunos componentes menores. Componentes como agua, aire y aditivos también influyen en las propiedades de la masa. Los gránulos de almidón mantienen su identidad en la masa y están incrustados en una fase de proteína hidratada e hinchada, el aire está atrapado en esta fase y los lípidos están esparcidos en la superficie de los gránulos de

almidón. Las propiedades viscoelásticas de la masa son el resultado de una red tridimensional formada por reacciones de intercambio tiol-disulfuro entre las proteínas del gluten.

El estudio del flujo de materiales o reología caracteriza las fuerzas de deformación en términos de tensión y esfuerzo con relación al tiempo, permitiendo la determinación de propiedades físicas inherentes del material.

La masa de harina de trigo exhibe propiedades viscoelásticas, donde la tensión es función del esfuerzo aplicado y la velocidad del esfuerzo, mostrando la masa un comportamiento viscoelástico no lineal. Tal comportamiento requiere que las componentes viscosa y/o elástica sean determinadas en función de la velocidad de prueba y del nivel de esfuerzo (Venkateswara Rao y Haridas Rao, 1993).

Las mediciones experimentales son difíciles, y la selección de técnicas apropiadas es necesaria para medir la reología de la masa. El diseño empírico de los instrumentos no permite medidas reológicas absolutas o el entendimiento de las características físicas de la masa. Las pruebas mecánicas empíricas (pruebas físicas) ayudan en la evaluación de la calidad y funcionalidad de la harina, y del efecto de los aditivos tales como enzimas, oxidantes y emulsificantes. La limitación que tienen las pruebas físicas es que los resultados no pueden ser descritos como propiedades reológicas fundamentales (Dreese et al., 1988; Venkateswara Rao y Haridas Rao, 1993).

Existen varios instrumentos disponibles para obtener datos objetivos sobre las propiedades de la masa a fin de predecir la deseabilidad de la harina para los diferentes productos horneados. Los instrumentos comercialmente más importantes son: mezcladoras con registro (farinógrafo Brabender, mixógrafo); medidores de extensión (alveógrafo de Chopin, extensógrafo Brabender); viscosímetros (Hagberg falling number, visco-amilógrafo Brabender) e instrumentos de producción y/o retención de gas (expansógrafo, maturógrafo Brabender) (Venkateswara Rao y Haridas Rao, 1993).

## **2.6. Xilanasas**

La hemicelulosa es un heteropolisacárido ampliamente distribuido en la naturaleza y está constituido por xilanos, los que son los componentes principales de la pared celular de las plantas. Los xilanos están constituidos por una cadena principal de xilosa con

ramificaciones de L-arabinosa, acetilo, ácido glucurónico, ácido 4-O-metilglucurónico y ácido ferúlico (Jeffries 1996; Sunna y Antranikian, 1997); la o las ramificaciones que están unidas a la cadena principal dependen del origen de los xilanos, por ejemplo, en cereales como trigo o centeno los arabinoxilanos tienen ramificaciones de L-arabinosa, en plantas de madera dura se tienen glucoronoxilanos con ramificaciones de acetilo y ácido 4-O-metilglucurónico y, en el caso de plantas de madera suave se tiene glucoronoxilanos con ramificaciones de L-arabinosa y ácido 4-O-metilglucurónico.

Debido a la heterogeneidad de los xilanos, la hidrólisis de éstos requiere la acción de un sistema enzimático complejo, que puede mostrar una acción sinergista entre los componentes de dicho sistema. En la naturaleza, el sistema xilanolítico está presente en hongos, algas marinas, crustáceos, insectos y semillas (Kluepfel et al., 1990; Monti et al., 1991; Krengel et al., 1996; Sunna y Antranikian, 1997).

Las xilanasas (enzimas que degradan a los xilanos) juegan un rol fisiológico importante en los tejidos vegetales, ya que están involucradas en el ablandamiento de las frutas, la germinación de las semillas y algunas enzimas microbianas inducen la formación de etileno (Biely et al., 1992; McLauchlan et al., 1999).

Desde hace algunos años las xilanasas microbianas reciben gran atención debido a la variedad de usos industriales que se les puede dar. Los principales usos están en la industria del papel y de los alimentos. Estas enzimas pueden ser empleadas en procesos en los que los xilanos deban ser despolimerizados. Tales procesos incluyen la hidrólisis de los complejos xilano-lignina en la pulpa y la liberación de cromóforos con lo que se facilita y disminuye el uso de cloro para el blanqueo de la pulpa en la industria del papel (Fishman et al., 1995; Clarke et al., 1997); en la industria de los alimentos pueden utilizarse para obtener xilooligosacáridos mediante hidrólisis parcial de los xilanos y que estos actúen como conservadores de humedad (Biely et al., 1992; Jeffries 1996; Mendicuti et al., 1997). Las xilanasas también pueden utilizarse en panificación para mejorar las características físicas de la masa, aumentar el volumen del pan y retardar el proceso de "staling" (Monfort et al., 1996); en la elaboración de alimentos balanceados para aves y cerdos para disminuir la viscosidad de las soluciones de los polisacáridos y así facilitar la absorción de los nutrientes en el intestino (McCleary, 1992). Estas enzimas también pueden utilizarse en la industria textil y para el tratamiento de desechos (Jeffries 1996; Mendicuti et al., 1997).

Como se mencionó anteriormente los xilanos son polímeros heterogéneos, por lo que para ser degradados requieren de la participación de varias enzimas, entre las que se encuentran las  $\beta$ -xilosidasas, las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas, las  $\alpha$ -glucuronidasas, las acetilxilanesterasas, las ácido ferúlico y p-cumárico esterasas y las endoxilanasas. La participación de las diferentes enzimas en la degradación de los xilanos, depende del sustrato (xilanos de madera dura, blanda o cereales).

A continuación se describen las características más importantes de las enzimas que componen el sistema xilanolítico.

### 2.6.1. $\beta$ -Xilosidasas

Las  $\beta$ -D-xilosidasas ( $\beta$ -D-xilosido hidrolasa; EC 3.2.1.37) son exoglicosidasas que hidrolizan xilooligosacáridos cortos y xilobiosa de los extremos no reductores para liberar xilosa, siendo la xilobiosa el mejor sustrato; la afinidad de las enzimas hacia los xilooligosacáridos disminuye al aumentar el grado de polimerización (GP). Las  $\beta$ -xilosidasas tienen pesos moleculares de 60 –360 KDa, pueden ser mono o diméricas, su actividad es inhibida por su producto de hidrólisis (xilosa). Algunas  $\beta$ -xilosidasas muestran actividad  $\alpha$ -arabinofuranosidasa y transferasa. Entre los microorganismos productores de  $\beta$ -xilosidasas se tienen a *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei*, y *Penicillium wortmanni* (Sunna y Antranikian, 1997).

### 2.6.2. $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasas

Existen dos tipos de arabinasas, las de actividad exo-  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) que son activas contra el p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido y contra los arabinanos ramificados; y las endo-1,5-  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.99) que son activas contra los arabinanos lineales. La mayoría de las enzimas degradadoras de arabinanos estudiadas hasta ahora tienen actividad exo. Las arabinofuranosidasas tienen pesos moleculares hasta de 495 KDa y se encuentran en formas mono, di, tetra, hexa y octoméricas. Entre los microorganismos productores de endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas se encuentran *Bacillus subtilis* y *Clostridium felsineum*; mientras que entre los productores de exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas se tiene a *Aspergillus niger* (Sunna y Antranikian, 1997).

### 2.6.3. $\alpha$ -Glucuronidasas

Las  $\alpha$ -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.-) hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,2 entre el ácido glucurónico y los residuos de xilosa en los glucuronoxilanos. Estas enzimas solo son activas sobre fragmentos de glucuronoxilanos de bajo peso molecular resultantes de la hidrólisis del xilano por la acción de las endoxilanasas. La acción de algunas  $\alpha$ -glucuronidasas es inhibida por la presencia de grupos acetilo cercanos a los sustituyentes glucuronosilos. El peso molecular de las  $\alpha$ -glucuronidasas es mayor a 100 KDa. Entre los microorganismos productores de estas enzimas se tienen a *Agaricus biosporus*, *Aspergillus niger* y *Fibrobacter succinogenes* (Sunna y Antranikian, 1997).

### 2.6.4. Acetilxilanesterasas

Las acetilxilanesterasas (EC 3.1.1.6) retiran los sustituyentes o-acetil de las posiciones C-2 y C-3 de los residuos de xilosa en los acetilxilanos, de manera que retiran el impedimento estérico que inhibe la acción de las otras xilanasas. Las acetilxilanesterasas tienen un peso molecular de 34 KDa y son producidas por *Trichoderma reesei*, *T. Viride*, *A. niger*, *Schizophyllum commune* y *F. succinogenes* (Sunna y Antranikian, 1997).

### 2.6.5. Ácido ferúlico y p-cumárico estererasas

Los ácidos ferúlico y p-cumárico están unidos al xilano mediante enlaces éster. Las ácido ferúlicoesterasas (EC 3.1.1.-) cortan las uniones éster entre las cadenas laterales de arabinosa y el ácido ferúlico en el xilano; de igual manera, las ácido p-cumárico estererasas (EC 3.1.1.-) cortan las uniones éster entre la arabinosa y el ácido p-cumárico. Son pocas las enzimas ácido ferúlico y p-cumárico estererasas caracterizadas y purificadas, de entre estas, las primeras tienen un peso molecular aproximado de 11 KDa y son producidas por *S. commune* y *Streptomyces olivochromogenes*; las segundas tienen pesos moleculares entre 24 – 68 KDa y son producidas por *S. viridosporus* y el hongo *Neocallimastix cepa* MC-2 (Sunna y Antranikian, 1997).

### 2.6.6. Endoxilanasas

Las endoxilanasas son con mucho las más enzimas más estudiadas de entre las demás xilanasas. Las  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (1,4-  $\beta$ -D-xilano xilanhidrolasas; EC 3.2.1.8) cortan los

enlaces glicosídicos internos del esqueleto del heteroxilano, resultando en una disminución en el grado de polimerización del sustrato (Sunna y Antranikian, 1997).

En las primeras etapas de la hidrólisis de los xilanos los principales productos son xilooligosacáridos, conforme la hidrólisis avanza los oligosacáridos son cortados para producir principalmente xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y en menor grado xilosa (Kluepfel et al., 1990; Monti et al., 1991; Ujiie et al., 1991; Maat et al., 1992; Kormelink et al., 1992; Törrönen et al., 1992; Bartolomé et al., 1995; Maringer et al., 1995; Sunna et al., 1996; Mendicutti et al., 1997). Existen endoxilanasas que producen exclusivamente xilobiosa como producto final, como es el caso de la xilanasas de *Aspergillus sydowii* MG49, éstas enzimas son conocidas como xilobiohidrolasas (Ghosh y Nanda, 1994). El ataque al sustrato no es aleatorio y las uniones a ser hidrolizadas dependen de la naturaleza del sustrato (tamaño y grado de ramificación, o presencia de sustituyentes) (Sunna y Antranikian, 1997) y de la arquitectura del sitio de unión al sustrato de la enzima (Biely et al., 1992).

Una propiedad de las endoxilanasas parece ser la relación entre su peso molecular y su punto isoeléctrico. Así, surge una clasificación propuesta por Wong et al. en 1988, en la que se divide a las endoxilanasas en dos grupos: las básicas con peso molecular menor a 30 KDa y las ácidas con peso molecular mayor a 30 KDa. Sin embargo, existen excepciones a este comportamiento, por ejemplo las endoxilanasas de *A. niger var. awamori* que tiene un pI de 3.7 y un peso molecular de 20 KDa (Maat et al., 1992).

Algunas endoxilanasas son capaces de liberar residuos de  $\alpha$ -L-arabinofuranósilo de los arabinoxilanos o de los arabinoxilooligosacáridos, debido a esto es que se pueden clasificar en: desramificadoras (liberadoras de arabinosa) y no desramificadoras (no liberadoras de arabinosa) (Biely et al., 1992; Sunna y Antranikian, 1997). Por otro lado, la mayoría de las endoxilanasas estudiadas hasta ahora, no presentan actividad celulolítica (Biely et al., 1992; Jeffries, 1996).

Las endoxilanasas tienen un pH óptimo de 4.0 – 7.0; sin embargo algunas enzimas tienen pH extremos, como es el caso de la endoxilanasas C producida por *A. kawachii* con pH óptimo de 2.0, o la endoxilanasas producida por *Cryptococcus flavus* con pH de 10.0. (Sunna y Antranikian, 1997). La temperatura óptima de las endoxilanasas está entre 45 – 75°C y solo un número pequeño de estas enzimas presentan actividad a temperaturas mayores, como es el caso de las producidas por *Thermotoga thermarum* activas a

temperaturas entre 80 – 100°C (Sunna y Antranikian, 1997).

Las endoxilanasas de un mismo microorganismo pueden diferir en el grado de hidrólisis del heteroxilano, aparentemente como consecuencia del tamaño de los sitios de unión al sustrato. Enzimas con sitios de unión grandes hidrolizan en mayor grado al heteroxilano y originan productos más grandes que las endoxilanasas con sitios de unión pequeños. De igual manera, las enzimas que tienen sitios de unión grandes muestran mayor afinidad por xilooligosacáridos lineales que las enzimas con sitios de unión pequeños (Biely et al., 1992).

Todas las endoxilanasas, principalmente a altas concentraciones de sustrato, siguen un mecanismo de doble desplazamiento en el cual el intermediario reactivo se une a la enzima, esto les permite llevar a cabo reacciones de transglicosilación, obteniéndose productos mayores que los sustratos iniciales (Biely et al., 1992, Jeffries 1996). A continuación se describe brevemente la degradación de la xilotriosa, a altas concentraciones de sustrato, la enzima interactúa con dos moléculas de xilotriosa, cortando a una de las moléculas principalmente en el segundo enlace glicosídico a partir del extremo reductor, esto es acompañado por la transferencia de un xilosilo a la otra molécula de xilotriosa para dar xilotetraosa que es mejor sustrato que la xilotriosa y es cortada para producir dos moléculas de xilobiosa (Biely et al., 1992).

Debido a la tendencia a utilizar cada vez menos compuestos químicos en la industria alimentaria, y a la controversia surgida sobre el uso del bromato de potasio como aditivo en la panificación por sus efectos cancerígenos, se ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas que puedan substituir este tipo de compuestos. En este sentido, la utilización de xilanasas surge como una nueva alternativa para aumentar el volumen del pan.

### **3. Hipótesis y Objetivos**

#### **3.1. Hipótesis**

Con la adición de las xilanasas de *Aspergillus sp.* FP-470 se modifica la estructura de los pentosanos presentes en la masa del pan, lo que altera su capacidad para absorber agua, de modo que parte del agua absorbida por estos polisacáridos se redistribuye entre los demás constituyentes de la masa y provoca un incremento en el volumen del pan, modifica la apariencia de la corteza y miga del pan y altera las propiedades reológicas de la masa.

#### **3.2. Objetivo General**

Mejorar las características de los panes elaborados con harinas de bajo potencial de panificación con el uso de las enzimas xilanólíticas producidas por *Aspergillus sp.* FP-470

#### **3.3. Objetivos Particulares**

Los objetivos particulares de la presente investigación son:

- Determinar el efecto de las xilanasas sobre las características de los panes (volumen, color de la corteza, color y textura de la miga).
- Comparar el efecto de las xilanasas producidas por *Aspergillus sp.* FP-470 con enzimas comerciales recomendadas para panificación.
- Conocer la manera en la que las xilanasas afectan a los parámetros reológicos de la masa (absorción, tiempo óptimo de amasado, estabilidad de la masa, índice de tolerancia, fuerza de la masa, tenacidad y elasticidad).
- Determinar el efecto de las xilanasas sobre la capacidad de hidratación de los pentosanos.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1. Medio de cultivo**

*Aspergillus sp.* FP-470 se cultivó en un medio basal que contenía:

- 0.4% de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$
- 0.2% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0.2% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 0.3% de extracto de levadura
- 1% de xilanos de abedul u olote.

La producción de la enzima se realizó de acuerdo con el método descrito por Mendicuti *et. al.* (1997). El medio se esterilizó a 121°C y 15 psi por 20 minutos. Las esporas de *Aspergillus* FP-470 se inocularon en 10 l de medio contenidas en un fermentador instrumentado y agitados a 100 r.p.m. a 37°C durante 72 horas.

### **4.2. Soluciones enzimáticas comerciales**

Se prepararon soluciones con una concentración de 37.5 mg/ml de cuatro enzimas comerciales: Novozyme, Harizyme-GSP, Glucozyme y Celulasa-4000 identificadas como Nz, Hz, Gz y Cl. A estas soluciones se les determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína y los resultados fueron comparados con los de nuestro filtrado enzimático.

### **4.3. Contenido de proteínas**

Se usó el método de Lowry para conocer el contenido de proteína presente en el filtrado enzimático, los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/ml}$ . Se colocaron en un tubo de ensayo 0.3 ml de filtrado enzimático previamente dializado, luego se añadieron 0.7 ml de agua, 5 ml de una solución compuesta por 1% de tartrato de Na y K (al 2%), 1% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (al 1%) y 98% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en NaOH (0.1 N); se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 10 minutos, al cabo de los mismos, se adicionaron 0.5 ml de la solución de Folin (50% de reactivo de Folin y 50% de agua) a cada tubo y se dejaron reaccionar durante 30 minutos medidos desde la última alícuota, finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a longitud de onda de 620 nm.

#### **4.4.Actividad enzimática**

La actividad xilanolítica se efectuó por la cuantificación de los azúcares reductores producidos por la acción de la enzima sobre los xilanos y los resultados fueron expresados en unidades por ml (U/ml). Una unidad de actividad xilanolítica se define como la cantidad de enzima que produce un  $\mu\text{mol}$  de xilosa en 10 min bajo las condiciones de ensayo. Se preparó una solución de xilanos de abedul (2%), se colocaron 0.5 ml de ésta en un tubo de ensayo, luego se añadieron 0.4 ml de buffer acetatos pH 5 y se incubaron durante 3 minutos a 50°C, posteriormente se adicionaron 0.1 ml de filtrado enzimático y se dejó reaccionar por 10 minutos a la misma temperatura, luego se añadió 1 ml de DNS y se puso a ebullición por 5 minutos. Finalmente se añadieron 5 ml de agua y se leyó en el espectrofotómetro a longitud de onda de 570 nm.

#### **4.5.Obtención de las harinas**

Las harinas, Euskaro (E) y Victoria (V) y Medalla de oro (MO) fueron obtenidas de Harinera Nacional S.A. de Central Harinera S.A., a ninguna de las tres harinas se adicionó aditivos en el molino.

#### **4.6.Análisis para determinar la calidad de las harinas**

##### **4.6.1. Análisis fisicoquímicos**

Estos análisis se realizaron de acuerdo a los métodos aprobados por la American Association of Cereal Chemists (AACC, 1983).

##### **4.6.1.1.Determinación de Humedad (Método 44-10)**

10 g de harina se calentaron a 155°C en una estufa hasta peso constante; por la pérdida de peso se calculó la humedad. Mediante esta prueba y con la ayuda de una tabla, se determinó la cantidad de agua que se debe adicionar para la realización del (micro)alveograma.

##### **4.6.1.2.Determinación de Cenizas (Método 44-10)**

10 g de harina se carbonizaron en una mufla a 550°C por 6 hrs. La ceniza de tono blanco o ligeramente gris se pesó.

##### **4.6.1.3.Determinación de Proteínas**

Esta determinación se realizó para conocer el contenido proteico de las harinas

empleadas en el presente trabajo, mediante espectrometría de infrarrojo cercano.

#### **4.6.1.4. Determinación de Gluten**

Se realizó en un aparato automático conocido como “Glutomatic” (Glutomatic 2100). Se mezclaron 10 g de harina con 4.5 ml de una solución de NaCl (2%) y se depositaron en la cámara de prueba. Se puso en marcha el aparato y durante los primeros 20 seg se realizó el mezclado de la masa. Después se lavó la masa por 5 min a una velocidad de flujo de la solución salina de 2 - 3 gotas/seg. Posteriormente, el gluten obtenido se dividió en dos y se llevó a la centrifuga (Centrifuge 2012) durante 1 min para eliminar el exceso de agua, finalmente el gluten húmedo se pesó.

#### **4.6.1.5. Falling Number o tiempo de caída (Método 56-81B)**

Se basa en la habilidad de las  $\alpha$ -amilasas para licuar un gel de almidón. El tiempo de caída es definido como el tiempo en seg necesario para permitir que el agitador caiga una distancia medida a través de un gel que ha sido licuado.

Se requiere del equipo “Falling Number”. Se pesaron 7 g de harina en un tubo seco del equipo, se adicionaron 25 ml de agua destilada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , se tapó el tubo y se agitó hasta obtener una suspensión uniforme, se quitó el tapón y se puso el agitador en el tubo. Se pusieron el tubo y el agitador en un baño de agua y se puso en marcha el equipo. El tiempo total en segundos, calculado a partir de la inmersión total del tubo en el baño de agua, hasta el momento en el que el agitador está totalmente sumergido en la suspensión gelatinizada, es leído directamente de la pantalla del equipo, y representa el tiempo de caída o Falling Number.

#### **4.6.1.6. Pentosanos totales**

Este análisis se realizó mediante el método del orcinol-hidroclórico descrito por Hashimoto<sup>8</sup> et al. (1987). Se hidrolizaron 10 mg de harina con la adición de 2 ml de HCl (2N), la mezcla se calentó a ebullición por 2.5 hrs. Después de enfriar la mezcla, se adicionaron 2 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2N) y 2 ml de una suspensión de levadura (25 mg/ml en buffer de sodio-fosfato 0.2M, pH 7), se dejó fermentar por espacio de 2 hrs a  $30^\circ\text{C}$  con agitación continua. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Se tomaron 2 ml del sobrenadante y se adicionaron a un tubo con 1 ml de agua, luego se adicionaron 3 ml de una solución de  $\text{FeCl}_3$  (0.1% en HCl concentrado) y 0.3 ml de Orcinol (1% en etanol), se agitaron en vortex y se llevó a ebullición por 30 min; se dejó enfriar a temperatura ambiente

y se leyó en espectrofotómetro a longitud de onda de 670 nm

#### **4.6.1.7. Pentosanos solubles**

Este análisis se realizó mediante el método del orcinol-hidroclórico descrito por Hashimoto<sup>3</sup> et al. (1987). Se mezclaron 100 mg de harina con 10 ml de agua y se mantuvo bajo agitación por 2 hrs a 30°C, luego se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. A 1 ml del sobrenadante se añadieron 4 ml de HCl (4N), se dejó reaccionar por 2 hrs a ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se tomó 1 ml y se mezcló con 2 ml de H<sub>2</sub>O, 3 ml de una solución de FeCl<sub>3</sub> (0.1% en HCl concentrado) y 0.3 ml de Orcinol (1% en etanol), se agitó en vortex y se dejó reaccionar a ebullición por 30 min; se enfrió a temperatura ambiente y se leyó en espectrofotómetro a longitud de onda de 670 nm

#### **4.6.2. Determinación de las propiedades reológicas de las harinas**

Estos análisis se realizaron de acuerdo a los métodos aprobados por la AACC (1983).

##### **4.6.2.1. Farinógrafo (Método 54-21)**

Mide y registra la resistencia de una masa al mezclado. Se encendieron el termostato y la bomba de circulación de agua 1 hr antes de utilizar el instrumento. Una vez determinada la humedad, se pesaron 10 g de harina (14% humedad) y se colocaron en la mezcladora del equipo. Se llenó la bureta con agua a temperatura ambiente. La pluma se puso en contacto con el papel de registro en la posición de 9 min. Se encendió el equipo y se dejó funcionar a alta velocidad hasta que se alcanzó la línea de 1 min. En ese momento se añadió el agua hasta que la curva alcanzó la línea de las 500 UB. Cuando la masa comenzó a formarse se puso en marcha el cronómetro. Luego se cubrió la mezcladora con un plato de vidrio para evitar la evaporación. Esta operación se repitió hasta obtener una curva que tiene su resistencia máxima centrada en la línea de 500 UB. En la titulación final el agua se añadió dentro los 25 seg después de abrir la llave de la bureta. Se dejó correr el equipo hasta 12 min después de alcanzar el pico máximo. Los parámetros considerados en ésta prueba son absorción de agua en porcentaje (A), tiempo óptimo de amasado en minutos (TO), estabilidad al amasado en minutos (E) y el índice de tolerancia en UB (IT).

##### **4.6.2.2. Alveógrafo (Método 54-30)**

Mide la resistencia de la masa a la extensión y qué tanto puede ser estirada bajo las condiciones del método. La prueba se realizó con un microalveógrafo de Chopin. Una vez

determinada la humedad de la harina, se calculó la cantidad de solución de NaCl (2.5%) que se debe utilizar para formar la masa. Se colocaron en la amasadora 60 g de harina y se puso en marcha el equipo, se añadió la solución de NaCl, (debe ser completada en 20 seg). Se dejó formar la masa por un minuto y se detuvo el equipo, se dejó reposar y se incorporó toda la masa (este proceso debe durar 1 min). Se volvió a encender el equipo y se realizó el amasado por 6 min (tiempo total 8 min). Se detuvo el equipo, se abrió la compuerta de extrusión y se extrajo la masa en un soporte metálico ligeramente engrasado. La masa se llevó a un plato de vidrio ligeramente engrasado, luego se pasó por un rodillo, se realizó un corte circular y la masa se llevó a los platos de descanso. El plato se colocó en el compartimento de descanso del alveógrafo (25°C) y se dejó reposar la masa durante 20 min. La operación se repitió con el resto de la masa. Se retiró la masa y se puso sobre la plataforma giratoria que prensa la masa, se puso en contacto la pluma con el papel de registro en el punto cero. Se infló la masa mediante un flujo de aire controlado hidrostáticamente (formando una gran burbuja) hasta que la masa se rompió, momento en el cual se detuvo el flujo de aire. Se volvió a ajustar el papel de registro a la posición cero y se repitió el procedimiento con el resto de la masa. Los parámetros considerados en esta prueba son: fuerza de la masa (W) en erg; tenacidad de la masa (T) en mm y extensibilidad (E) en mm.

#### **4.7. Capacidad de absorción de agua**

Fue determinada utilizando el método descrito por Bertin (1988). Se pesó 1 gr de harina, se adicionó un exceso de agua, se agitó en vortex y se dejó reposar durante 2 hrs a 36°C. Luego se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min, el sobrenadante se descartó por decantación y la muestra húmeda fue pesada. La capacidad de absorción (%AA) de agua es calculada basándose en la cantidad de agua absorbida (MH) por unidad de peso seco.

#### **4.8. Pruebas de panificación**

Esta prueba permite conocer las características de la masa antes de la fermentación y del producto final y el comportamiento en el horno. El método utilizado para esta determinación es el 10-09 de la AACC. Primeramente se pesaron y se colocaron en el recipiente de la amasadora todos los elementos sólidos (100 g de harina y 4 g de leche en

polvo) y semisólidos (3 g de manteca vegetal), luego se adicionaron los compuestos líquidos (10 ml de una solución de azúcar (5%) y sal (1.5 %) y 10 ml de una suspensión de levadura al 2%), también se adicionó la cantidad de agua que fue necesaria para formar la masa. La diferentes dosis de enzima se adicionaron diluyendo éstas en el agua que se adicionó. Luego se procedió al mezclado y al amasado, el tiempo varió de acuerdo al tipo de harina. La masa se colocó en recipientes metálicos para su traslado a la cámara de fermentación, donde permaneció por espacio de 3.5 hrs a una temperatura de  $36^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$ . Una hora antes de que termine la fermentación, se dio forma a la masa pasándola a través un sistema de rodillos, luego fue colocada en el molde previamente engrasado y éste se llevó a la cámara de fermentación para la última etapa de la fermentación. Los moldes se colocaron en el horno, previamente calentado a  $220^{\circ}\text{C}$ , el tiempo de horneado fue de 25 min, al cabo de este tiempo se retiraron los moldes del horno y los panes fueron inmediatamente desmoldados y pesados

#### **4.8.1. Volumen**

Es expresado en  $\text{cm}^3$ , se determinó mediante desplazamiento de la semilla de colza en el aparato para la determinación de volumen.

#### **4.8.2. Valoración del pan**

Esta determinación se realizó 24 hrs después de la elaboración del pan, y son evaluados en una escala del 1 al 10. Los parámetros que se toman en cuenta son:

##### **4.8.2.1. Color de la corteza**

##### **4.8.2.2. Color de la miga**

##### **4.8.2.3. Apariencia de la miga**

Se refiere al tamaño y la regularidad de los poros

#### **4.9. Textura**

Fue evaluada utilizando la prensa universal Instron, empleando una fuerza de 5 Kg-f, hasta alcanzar un 25% de aplastamiento.

#### **4.10. Extracción y Purificación de los pentosanos**

Se realizó de acuerdo al método descrito por Rouau y Moreau (1993). Se mezclaron 100 gr de harina con 50 ml de agua, se amasó por 20 min y se dejó reposar la masa otros 20 min a temperatura ambiente. La masa se lavó con agua fría desionizada ( $4^{\circ}\text{C}$ ). El efluente se

centrifugó a 15,000\*g por 20 min a 4 °C. La parte soluble se llevó a ebullición por 10 min, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que las proteínas desnaturalizadas precipitaron. El extracto se centrifugó a 15,000\*g por 20 min. a 20°C. Se ajustó el pH del sobrenadante a 5 con HCl antes de adicionar 50 mg de amiloglucosidasa y se dejó reaccionar por 3 hrs a 60°C. Después se enfrió a 40°C, se mezcló con 30 mg de pronasa y 5 ml de buffer de fosfato (1M, pH 5.7) y se incubó bajo agitación por 4 hrs a 40°C. La solución se calentó 10 min en microondas para inactivar la pronasa, se enfrió y se pasó a través de papel filtro. A la solución clara se adicionaron 5 volúmenes de etanol al 95% bajo agitación. Se dejó reposar durante la noche a 4°C, el sobrenadante fue parcialmente removido por succión, se centrifugó (15,000\*g, 20 min a 20°C) y los "pellets" de pentosanos solubles (PS) fueron secados mediante intercambio de solvente.

Las "colas" se tomaron de la superficie de los pellets y se dispersaron en 100 ml de agua, se ajustó el pH a 5 con HCl y se dejó incubar con 0.4 ml de Termamyl a ebullición por 30 min bajo agitación. Se dejó enfriar, se adicionaron 50 mg de amiloglucosidasa, y la mezcla se incubó bajo agitación por 3 hrs a 60°C. Después se adicionaron 5 ml de buffer de fosfato (1M, pH 7.5) que contenían 30 mg de pronasa, la mezcla se incubó por 4 hrs a 40°C bajo agitación. Luego la solución se centrifugó a 15,000\*g durante 20 min a 20°C. Los pellets de pentosanos insolubles (PI) se lavaron con agua destilada y se secaron por intercambio de solvente (etanol, acetona, éter).

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Producción del filtrado enzimático

Se hizo crecer la cepa de *Aspergillus sp.* FP-470 en un fermentador instrumentado, utilizando el medio descrito por Mendicuti et al (1997), empleando olote de maíz al 1% como fuente de carbono. Las condiciones para el crecimiento fueron 37°C, pH 6.5 y 72 hrs. Posteriormente se procedió a eliminar al microorganismo y los sólidos del medio de cultivo pasándolo a través de algodón y papel filtro, obteniendo así aproximadamente 10 l de filtrado enzimático; la actividad xilanolítica de este filtrado fue de 44.45 U/ml y el contenido de proteína de 648.33 µg/ml, luego la muestra enzimática fue dispersada y congelada. Se liofilizaron 500 ml del filtrado y el material seco obtenido fue denominado FX-470.

Para las determinaciones de la actividad xilanolítica, amilolítica y cantidad de proteína, así como para la comparación con las enzimas comerciales diseñadas para panificación se empleó una solución de FX-470 a una concentración de 37.5 mg/ml.

La tabla 6 muestra algunas características de las enzimas comerciales empleadas en el presente trabajo.

**Tabla 6. Características de las enzimas comerciales**

Muestra	Actividad	Apariencia	Soluble	Distribuidor
Novozyme 384	Xilanasa	Granular crema	Parcialmente	NOVO
Glucozyme	Amiloglucosidasa	Polvo crema	Parcialmente	ENMEX
Harizyme GSP	Amilasa	Polvo blanco	Parcialmente	ENMEX
Celulasa 4000	Xilanasa	Polvo crema	Sí	ENMEX

La actividad xilanolítica que fue determinada mediante el método del DNS a la solución FX-470 y a las soluciones de las enzimas comerciales, se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Determinación de la actividad xilanolítica**

Muestra	Actividad ( $U/ml$ )	Proteína ( $mg/ml$ )	Act. Específica ( $U/mg\text{ proteína}$ )
FX-470	3642.22	1.25	2.92
Nz	6.14	1.09	$5.63 \times 10^{-3}$
Gz	6.49	4.70	$1.38 \times 10^{-3}$
Hx	1.04	0.27	$3.85 \times 10^{-3}$
Cl	1878.62	1.01	1.86

Como se puede observar la mayor actividad bajo las condiciones del ensayo la mostró FX-470 seguida por Cl, las demás enzimas comerciales no presentaron actividad significativa. La actividad mostrada por FX-470 es casi el doble de la mostrada por Cl a la misma concentración, esto nos indica que FX-470 no solo tiene actividad xilanolítica, sino que además su actividad es mucho mayor que la de las enzimas comerciales.

La actividad amilolítica fue medida con el método del lugol. FX-470 no mostró actividad amilolítica, el mismo comportamiento es mostrado por Cl y Nz; sin embargo, las otras enzimas comerciales Gz y Hx sí mostraron actividad amilolítica, siendo mayor la mostrada por Gz.

Antes de realizar la determinación del contenido de proteínas mediante el método de Lowry, las soluciones enzimáticas fueron sometidas a un proceso de diálisis. Los resultados de la cuantificación de proteína se muestran en la tabla 7. Como se puede observar Gz mostró el mayor contenido de proteína, siendo casi 4 veces mayor al de FX-470, esto indica que solo un porcentaje muy pequeño de la proteína en Gz presentó actividad xilanolítica lo que se ve reflejado en una baja actividad específica, de igual manera, Nz y Hx también presentaron muy baja actividad específica (tabla 7). Con respecto a Cl y FX-470, se pudo observar que pese a tener un contenido proteico mucho menor al de Gz mostraron alta actividad xilanolítica.

La actividad específica fue estimada tomando como base a la actividad xilanolítica y es mostrada en la tabla 7. Como se puede observar, FX-470 presentó el valor de actividad específica más alto, siendo aproximadamente 60% mayor al mostrado por Cl. Esta última se eligió como referencia para utilizarla en las pruebas de panificación y comparar sus resultados con los de FX-470, por ser la enzima comercial que mostró la mayor actividad específica.

## 5.2. Clasificación de las harinas a utilizarse en las pruebas de panificación y reológicas

### 5.2.1. Análisis fisicoquímico de las harinas

En la tabla 8 se muestran los resultados de los análisis practicados en las tres harinas.

Tabla 8. Análisis fisicoquímicos de las harinas

Muestra	Humedad (%)	Proteína <sup>b</sup> (%) (Nx5.7)	Cenizas <sup>b</sup> (%)	Gluten <sup>c</sup> (%)	Ind. Sedim. (ml)	T. de Caída <sup>d</sup> (seg)
MO	13.30	11.90	0.57	27.50	33	800
E	13.00	10.60	0.60	27.60	33	800
V	12.70	12.05	0.51	29.60	39	800
Estándar <sup>a</sup>	14.00	12.00	0.50	30.00	IS < 5 mediocre 16 - 35 discreta IS > 35 buena	250 - 400

<sup>a</sup> AACC, 1983

<sup>b</sup> Datos expresados a 14% de humedad

<sup>c</sup> Datos expresados en base húmeda

<sup>d</sup> Tiempo de caída = Falling Number

Como se puede observar el contenido de humedad fue similar para las tres harinas, siendo mayor el de la harina **MO**. El contenido de humedad es importante ya que con base en este se hacen los cálculos para la adición de agua en las pruebas reológicas. En el contenido de proteína sí se observaron diferencias entre las tres harinas, siendo mayor el de la harina **V**, las otras dos harinas tienen contenidos de proteína que están por debajo de las especificaciones de harinas para panificación mecanizada.

El contenido de cenizas es el parámetro de calidad más usado en la industria molinera y panadera para comercializar las harinas, y está asociado a la incorporación de paredes celulares del pericarpio durante el proceso de molienda, y consecuentemente, afecta el color de las harinas y las propiedades reológicas de las masas. Cuanto más bajo sea el contenido de cenizas mejor será la calidad de las harinas (AACC, 1983). En la tabla anterior se puede apreciar que las tres harinas están por encima del valor de cenizas recomendado; si tomamos en cuenta el criterio de calidad mencionado podemos decir que la harina **V** es la de mejor calidad.

Otro parámetro de calidad es el contenido de gluten, mientras más alto mejor será la harina y mejor será el rendimiento en panificación. Como se puede observar, el valor más alto correspondió a la harina **V**, aunque éste es ligeramente menor al estándar para las

harinas panificables, podemos decir nuevamente que ésta harina es la de mejor calidad

El índice de sedimentación es un indicador de la calidad de las proteínas del gluten, y como se puede observar los valores de las tres harinas fueron bajos; sin embargo, la harina V alcanzó ligeramente la calificación de buena, una vez más ésta es la de mejor calidad.

El tiempo de caída (Falling Number) es una medida de la actividad  $\alpha$ -amilasa en las harinas, valores menores de 250 seg son rechazados por la industria molinera (AACC, 1983). En este caso las tres harinas muestran valores muy elevados, lo que indica baja actividad  $\alpha$ -amilasa, misma que puede ser consecuencia de las condiciones secas donde se cultivó el trigo.

Con base en estos resultados podemos calificar como harina panificable a la harina V y como harinas de bajo potencial de panificación a la MO y la E. Es así que la harina V fue utilizada como control tanto en las pruebas reológicas como en las de panificación y sus resultados se compararon con los de las otras dos harinas.

Estas tres harinas son representativas de las calidades que se comercializan y emplean en la industria de panificación en México. Cabe mencionar que ninguna de ellas cumple con la norma en cuanto a contenido de gluten para considerarla buena para panificación. En general, harinas con bajo contenido de gluten producen panes de poco volumen, por lo que se espera que la adición de las enzimas de FX-470 mejoren esta característica.

### **5.2.2. Determinación de pentosanos**

Como parte del análisis fisicoquímico se realizó la determinación de pentosanos a las tres harinas, a dos harinas comerciales (una de ellas integral) y una muestra de salvado. Los resultados se muestran en la tabla 9.

El salvado (S) mostró el mayor contenido de pentosanos totales, sin embargo, el contenido de pentosanos solubles más alto correspondió a la harina integral (HI). Las harinas que se utilizaron en las demás pruebas mostraron un contenido de pentosanos totales similar al informado por Hashimoto<sup>b</sup> et al. (1987), Delcour et al. (1989), Eliasson y Larsson (1993), Faurot et al. (1995) y Petit-Benvegnem et al. (1998). De igual manera, el contenido de pentosanos solubles es de aproximadamente el 30% de los pentosanos totales, lo que está de acuerdo con lo encontrado por Hashimoto<sup>b</sup> et al. (1987), Delcour et al. (1989), Izydorczyk<sup>b</sup> et al. (1991) y Eliasson y Larsson (1993).

**Tabla 9. Determinación de pentosanos**

Muestra	Pentosanos totales (%)	Pentosanos solubles (%)
MO	2.52	0.72
E	3.19	0.80
V	3.17	0.84
S	10.92	1.23
H. blanca	3.09	1.23
HI	4.45	1.33

La presencia de esta cantidad de pentosanos ( $\pm 3\%$ ) en las harinas significa que de los  $\pm 50$  ml de agua que se adicionan a la formulación de panes de 100g de harina, 15 ml de agua podrían estar directamente asociados a estos polisacáridos

### 5.3. Pruebas reológicas

Para conocer el efecto que tiene la adición de diferentes dosis de FX-470 sobre las masas de las tres harinas, se realizaron las siguientes pruebas reológicas: farinogramas y microalveogramas. Estas pruebas son las más empleadas, tanto a nivel industrial como científico para la evaluación de las harinas.

#### 5.3.1. Farinogramas

Los resultados de los farinogramas de las tres harinas se muestran en la tabla 10. Como se observa, la adición de FX-470 produjo un incremento en la absorción de agua en las 3 harinas. La absorción de agua está definida como la cantidad de agua requerida para centrar el farinograma en las 500 unidades Brabender (UB). Sin embargo, la cantidad de agua absorbida y las dosis en las que se produjo el incremento son distintas para las tres harinas. El mayor incremento es observado en la harina **V** con dosis de 100 ppm y mayores; el menor incremento en la absorción de agua se presentó en la harina **MO** a dosis de 200 ppm; mientras que en la harina **E** es alcanzado con dosis de 50 ppm y mayores. La dosis enzimática dependerá entonces del tipo de harina utilizada.

**Tabla 10. Farinogramas de las 3 harinas**

<b>Muestra (ppm)</b>	<b>Absorción (% H<sub>2</sub>O)</b>	<b>TO (min)</b>	<b>E (min)</b>	<b>IT (UB)</b>
<b>Medalla de oro</b>				
Control	61.00	5'54"	4'36"	30.00
50	61.00	5'12"	5'30"	20.00
100	61.00	3'30"	6'36"	20.00
150	61.00	4'30"	6'42"	30.00
200	61.25	4'57"	4'18"	32.50
<b>Euskaro</b>				
Control	61.00	5'12"	5'30"	30.0
50	61.50	5'42"	2'42"	50.0
100	61.50	5'18"	3'06"	50.0
150	61.50	4'24"	3'36"	30.0
200	61.50	4'00"	2'48"	40.0
<b>Victoria</b>				
Control	59.50	4'30"	7'24"	30.00
50	61.50	5'06"	7'24"	25.00
100	62.00	4'18"	8'30"	20.00
150	62.00	5'36"	6'30"	35.00
200	62.00	5'30"	7'00"	40.00

El tiempo óptimo de amasado (TO), que es el tiempo en el que la masa alcanza su máxima consistencia o el pico de la curva (Othón Serna, 1996), mostró en el caso de la harina **MO** una disminución con la adición de FX-470, esto es de importancia principalmente a nivel industrial, ya que dicha reducción implica un ahorro de energía. En el caso de la harina **E** se observó que los cambios más importantes se presentan por encima de las 100 ppm, produciendo como en el caso anterior una disminución del tiempo óptimo de amasado. Respecto a la harina **V** se observó lo contrario, es decir que el tiempo óptimo aumentó con la adición de FX-470.

La estabilidad (E) al amasado es una medida del tiempo desde que la masa alcanza las 500 UB hasta que la deja soportando la acción mecánica del amasado (Othón Serna, 1996). La adición de FX-470 produjo un aumento en la estabilidad de las masas de harinas **MO** y **V** hasta las 150 ppm y 100 ppm respectivamente, encima de estas dosis la estabilidad cayó por debajo de la mostrada por los controles. En el caso de la harina **E**, se observó que la adición de FX-470 produjo una gran disminución en la estabilidad.

El índice de tolerancia (IT) es un indicativo de la pérdida de consistencia en UB 5

minutos después del tiempo óptimo de amasado (Othón Serna 1996). En el caso de las harinas **MO** y **V** se observó una tendencia a disminuir con la adición de FX-470 hasta alcanzar los 150 ppm y 200 ppm respectivamente, por el contrario el **IT** para la masa de la harina **E** mostró tendencia aumentar con la adición de FX-470. Según Venkateswara Rao y Haridas Rao (1993), mientras mayor sea el **IT** la harina será más débil, de acuerdo a esto podemos decir que las masas de las harinas **MO** y **V** aumentan su consistencia al adicionar 150 ppm y 200 ppm de FX-470 respectivamente y la masa de la harina **E** se vuelve más débil con la presencia de FX-470.

Debido a la diferente concentración de pentosanos no se pudo establecer una correlación de los datos farinográficos con la dosis enzimática. Si bien con la harina **E** se obtuvo el mayor efecto, esto no ocurre con las otras dos harinas. Las diferencias en concentración de pentosanos son bajas y no permiten establecer la correlación.

De estos resultados podemos decir que la adición de FX-470 produce modificaciones en las distintas masas, el tipo y grado de éstas va a depender no solamente de la dosis de FX-470 sino también de la calidad de la harina. Este filtrado enzimático produce, en el caso de la harina **E**, un gran debilitamiento en la masa, esto se ve reflejado en el **IT** y la estabilidad, lo que nos indica que la presencia de pentosanos en esta harina es muy importante para su consistencia. Por el contrario, las otras dos harinas muestran una mejora en su consistencia, también reflejada en la estabilidad y el **IT**, de manera que la hidrólisis de los pentosanos tiene un efecto positivo en las masas de estas harinas.

### **5.3.2. Alveogramas**

La tabla 11 muestra los valores de los parámetros alveográficos de las 3 harinas. Como se puede apreciar la adición de las diferentes dosis de FX-470 en las masas de las distintas harinas produjo modificaciones en los distintos parámetros alveográficos. En el caso de la tenacidad (**T**) se puede observar que ésta aumentó con la dosis enzimática para la harina **MO**, lo cual muestra que FX-470 tiene un efecto positivo en esta harina aumentando su resistencia a la deformación; mientras que en las otras 2 harinas el efecto mejorador se observó hasta las 100 ppm, por encima de esta dosis la resistencia a la deformación de ambas harinas disminuyó.

**Tabla 11. Alveogramas de las distintas harinas**

<b>Muestra (ppm)</b>	<b>T (mm)</b>	<b>E (mm)</b>	<b>W (erg)</b>
<b>Medalla de oro</b>			
Control	106.70	53	196
50	110.55	68	242
100	105.60	68	229
150	111.65	60	233
<b>Euskaro</b>			
Control	110.00	56	229
50	116.60	70	270
100	114.40	68	264
150	119.90	61	268
200	107.80	58	227
<b>Victoria</b>			
Control	135.30	82	387
50	133.10	73	346
100	145.20	72	379
150	133.10	92	408
200	129.80	85	388

Respecto a la extensibilidad (E) se observó que el efecto de FX-470 sobre las masas de las harinas **MO** y **E** es de aumentarla hasta dosis de 100 ppm y 50 ppm respectivamente, para posteriormente disminuir. En el caso de la harina **V** el comportamiento no es muy claro, pero se observó una tendencia a aumentar.

Con respecto a la fuerza de la masa (W), que es una medida del trabajo necesario para lograr su deformación (Othón Serna, 1996). En el caso de las harinas **MO** y **E** aumentó hasta dosis de 50 ppm, por encima de ésta, la fuerza de la masa disminuyó. El comportamiento de la harina **V** tampoco es muy claro, pero también se observó una tendencia a incrementar la fuerza de la masa.

En resumen, podemos decir que la adición de FX-470 hasta determinadas dosis (50 ppm para las harinas **MO** y **E**, y 100 – 150 ppm para la harina **V**) producen mejoras en los parámetros alveográficos, es decir que las masas tratadas soportaran mejor que las masas sin tratamiento la expansión durante la fermentación y el horneado sin que se produzca el colapso de las mismas.

#### 5.4. Capacidad de absorción de agua

Para realizar esta prueba se preparó una solución de FX-470 con una concentración de 37.5 mg/ml y se realizaron diluciones. Los resultados de la prueba de absorción se muestran en la figura 9.

Como se puede apreciar la aplicación de FX-470 produjo cambios en la capacidad de absorber agua de las tres harinas. Estos cambios se aprecian mejor en la figura 10, en la que se representa la pérdida de absorción en porcentaje con respecto a las harinas sin tratamiento.

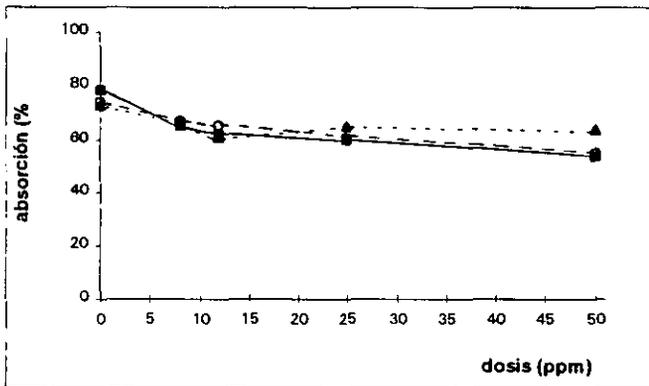


Figura 9: Capacidad de absorción de agua de las tres harinas con diferentes dosis de FX-470. MO (■), E (○) y V (▲).

Se observa claramente que al adicionar FX-470 a las suspensiones de las tres harinas se produjo una importante pérdida en la capacidad de absorber agua, la cual se incrementó con la concentración enzimática. Esto demuestra que al producirse un mayor número de oligómeros por la hidrólisis enzimática de los pentosanos "in situ", se tiene como consecuencia la disminución en su capacidad de absorber agua. La mayor disminución se presenta en la harina MO, misma que tuvo el menor contenido de pentosanos totales y solubles.

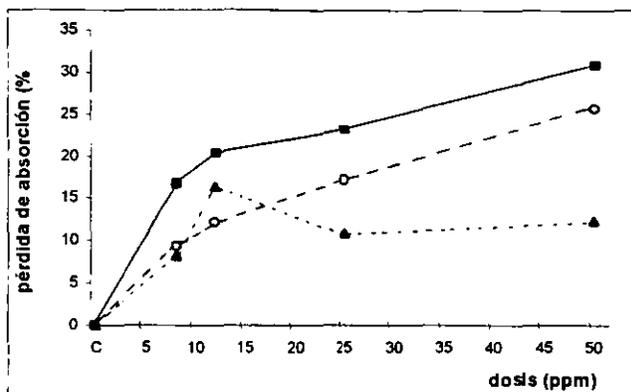


Figura 10: Pérdida en la capacidad de absorción de agua de las tres harinas con diferentes dosis de FX-470. MO (■), E (○) y V (▲).

La pérdida en la capacidad de absorción que es atribuida a la hidrólisis de los pentosanos permite que el agua que es liberada por estos quede a disposición de otros componentes de la harina, principalmente el gluten y el almidón.

### 5.5. Pruebas de panificación

Antes de realizar estas pruebas y comparar los resultados contra los de la xilanas comercial (CI), se realizó una prueba preliminar para ver si la adición de FX-470 en la formulación del pan tenía algún efecto en el producto terminado. Se utilizó una harina comercial que a diferencia de las harinas utilizadas (MO, E y V) ésta contenía aditivos y antioxidantes. Se adicionaron 100 ppm de FX-470 en la formulación, el resultado de esta prueba fue positivo, lográndose un incremento de volumen de 4% en el pan adicionado con enzima con respecto al control. Habiendo visto que la adición de FX-470 sí produjo cambios en el producto final, se realizaron las pruebas de panificación en las tres harinas empleadas en la investigación.

#### 5.5.1. Prueba de panificación

Las dosis empleadas en estas pruebas expresadas en ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) y sus equivalentes en contenido de proteína se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12. Dosis enzimática**

Muestra	ppm	Act. adicionada ( <sup>U</sup> /100g harina)	µg prot adicionada 100 g harina
FX-470	50	485.63	166.35
FX-470	100	971.26	332.71
FX-470	150	1456.89	499.06
FX-470	200	1942.52	665.41
FX-470	250	2428.15	831.77
Cl	200	1001.93	537.69

Para las dosis de FX-470 se tomaron como base las referencias bibliográficas (Maat et al., 1992; Lindahl y Eliasson, 1992 y Rouau y Moreau, 1993) y a partir de estas se variaron las dosis haciendo pruebas de dosis-respuesta para determinar cual de ellas produce los cambios más importantes. La dosis de Cl fue tomada de los datos técnicos proporcionados por el proveedor.

La figura 11 muestra los resultados del peso de los panes elaborados con las diferentes harinas y dosis enzimáticas.

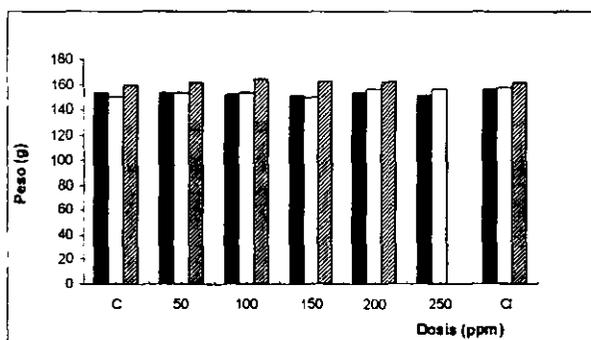


Figura 11: Peso de los diferentes panes: MO (■), E (□) y V (▨). Las desviaciones estándar fueron 0.8839, 1.591 y 1.2963 para las harinas MO, E y V respectivamente.

Como se puede observar el peso de los panes no sufrió grandes modificaciones con la adición de las diferentes dosis enzimáticas, este es un resultado esperado ya que para todos los casos se utiliza la misma formulación. Las diferencias observadas se pueden deber

a pérdidas de agua durante el horneado o la fermentación.

A diferencia del peso de los panes, en el volumen sí se observaron modificaciones importantes, mismas que pueden apreciarse en la figura 12, en la que se representan los incrementos de volumen en porcentaje respecto a sus respectivos controles.

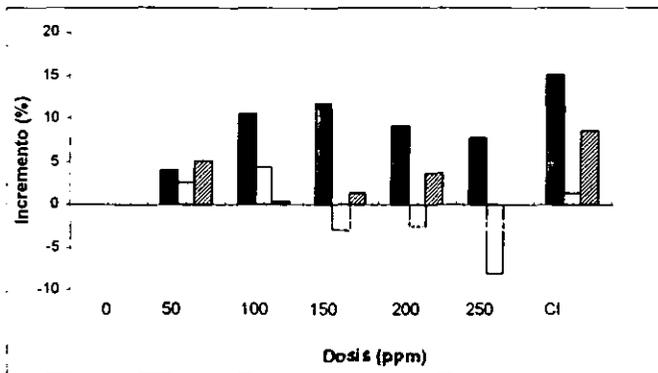


Figura 12: Incremento de volumen de los diferentes panes: MO (■), E (□) y V (▨)

Como se puede observar, los panes de las tres harinas mostraron incrementos en el volumen al adicionar en su formulación FX-470; sin embargo la respuesta de cada una de las harinas fue distinta. Cuando se utilizó FX-470 en la formulación de los panes elaborados con la harina MO se observó un incremento de volumen al aumentar la dosis enzimática hasta las 150 ppm donde se presentó el mayor efecto mejorador, por encima de esta dosis los incrementos en volumen son menores. En el caso de los panes elaborados con la harina E, se lograron incrementos de volumen hasta dosis de 100 ppm, observándose con ésta el mayor incremento, por encima de esta dosis el efecto sobre el producto fue detrimental, es decir volúmenes menores que los mostrados por su control, estos resultados están de acuerdo con lo informado por McCleary (1992), quien dice que un exceso de xilanasas tiene efectos negativos en el pan. Las masas elaboradas con harinas que tienen bajo contenido de proteínas (MO y E) tienen una matriz de gluten delgada, esto tiene como consecuencia que estas harinas se expandan menos y a menor velocidad (He y Hosoney, 1992). Respecto a la harina panificable (V), el mayor efecto mejorador se alcanzó con 50 ppm, por encima de esta dosis los incrementos de volumen al igual que con la harina MO, son menores.

En resumen, con el empleo de FX-470 en la formulación de los panes el mayor

incremento de volumen fue en la harina **MO** (11.76%), seguido por la harina **V** con un incremento de 5.13% y con la harina y el menor incremento de volumen (4.32%) se obtuvo con la harina **E**. Comparando estos resultados con los obtenidos utilizando la enzima comercial, se puede observar que aunque los resultados mostrados por **Cl** son algo mayores en el caso de las harinas **MO** y **V** y menor con la harina **E**, ésta enzima presenta el mismo comportamiento que **FX-470**, es decir el mayor incremento de volumen se obtuvo en los panes elaborados con harina **MO** y el menor incremento lo presentan los panes elaborados con harina **E**.

Ya que la masa del pan es una matriz compleja, las modificaciones que pueda sufrir dependen de las interacciones que se produzcan entre sus componentes y no dependen únicamente de uno de ellos, en este caso los pentosanos. Debido a esto es que no se pudo establecer una correlación directa entre el incremento de volumen y el contenido de pentosanos, lo que se vio reflejado en el mayor incremento de volumen mostrado por la harina con menor contenido de pentosanos totales y solubles (**MO**). Sin embargo, se pudo establecer la correlación entre contenido de gluten/contenido de pentosanos (**G/P**) y el incremento de volumen (tabla 13), observándose que a mayor valor de **G/P**, mayor fue el incremento de volumen del pan.

**Tabla 13. Correlación entre gluten/pentosanos e incremento de volumen**

<b>Harina</b>	<b>Gluten/P. totales (G/PT)</b>	<b>Gluten/P. solubles (G/PS)</b>	<b>Incremento de volumen (%)</b>
MO	10.91	38.19	11.76
V	9.34	35.24	5.20
E	8.65	34.50	4.32

### **5.5.2. Análisis sensorial del producto terminado**

En la tabla 14 se presentan los resultados del análisis sensorial realizado a los panes elaborados con las tres harinas y las diferentes dosis enzimáticas.

**Tabla 14. Análisis sensorial de los panes elaborados con las tres harinas**

<b>Muestra (ppm)</b>	<b>Apariencia de miga<sup>a</sup></b>	<b>Color de corteza<sup>b</sup></b>	<b>Color de miga<sup>c</sup></b>
<b>Medalla de oro</b>			
Control	8 - B	8 - B	9/A-Cr
50	8 - B	8 - B	9/A-Cr
100	9 - MB	9 - MB	9/A-Cr
150	9 - MB	9 - MB	9/A-Cr
200	9 - MB	9 - MB	9/A-Cr
250	9 - MB	9 - MB	9/A-Cr
Cl	8 - B	9 - MB	9/A-Cr
<b>Euskaro</b>			
Control	8 - B	8 - B	8/Cr
50	8 - B	8 - B	8/Cr
100	8 - B	9 - MB	8/Cr
150	7 - R	9 - MB	8/Cr
200	7 - R	9 - MB	8/Cr
250	7 - R	9 - MB	8/Cr
Cl	8 - B	9 - MB	9/A-Cr
<b>Victoria</b>			
Control	8 - B	9 - MB	9/A-Cr
50	9 - MB	9 - MB	9/A-Cr
100	8 - B	9 - MB	9/A-Cr
150	8 - B	9 - MB	9/A-Cr
200	8 - B	9 - MB	9/A-Cr
Cl	9 - MB	9 - MB	9/A-Cr

<sup>a</sup> R: apariencia de miga regular, B: apariencia de miga buena, MB apariencia de miga muy buena

<sup>b</sup> B: color de corteza buena y MB color de corteza muy buena

<sup>c</sup> Cr: color crema, A-Cr: color amarillo-crema

Como se puede observar, con la aplicación de FX-470 en los panes elaborados con la harina **MO** se obtuvieron mejoras tanto en la apariencia de la miga como en el color de la corteza, mientras que el color de la miga se mantuvo sin cambios; el empleo de la enzima comercial solo produjo mejoras en el color de la corteza. En el caso de la harina **E** (tabla 14) a dosis de 150 ppm y mayores se observó un efecto detrimental de la apariencia de la miga debido al empleo de FX-470, por el contrario sí se observaron mejoras en el color de la corteza, mientras que el color de la miga al igual que en el caso anterior se mantuvo sin cambios; la utilización de la enzima **Cl** produjo modificaciones tanto en el color de la corteza

como en el color de la miga. Respecto a la harina **V** (tabla 14), se puede apreciar que FX-470 no produjo ningún cambio ni en la corteza ni en la miga; en el caso de **Cl**, ésta si produjo una mejora en la apariencia de la miga.

Las mejoras en la apariencia de la miga se refieren la uniformidad del tamaño de los poros, esto puede deberse a que la acción de FX-470 sobre los xilanos de la masa reducen la viscosidad, permitiendo la difusión más homogénea del CO<sub>2</sub> y evitando la coalescencia de las burbujas. El efecto detrimental observado en los panes elaborados con la harina **E** y con dosis mayores a las 100 ppm pueden deberse a la menor viscosidad de la masa debido a la acción enzimática de FX-470, de modo que no tiene la suficiente fuerza para retener las burbujas de CO<sub>2</sub>, lo que produce un colapso de la masa, con la consecuente reducción en el volumen del producto terminado.

Las mejoras en el color de la corteza se refieren a la adquisición por parte de los panes de un color pardo claro durante el horneado, en lugar de un color pardo oscuro. Durante el periodo de fermentación (principalmente) se produce la hidrólisis de los pentosanos por parte de FX-470, liberándose azúcares que van a contribuir con el color durante el horneado.

Durante la elaboración de los panes, la masa obtenida presentó una textura pegajosa y difícil de manejar con las manos, esta observación concuerda con las realizadas por McCleary (1992) y D'Appolonia y Schwarz (1992); sin embargo, la observación de un mejor color con el empleo de FX-470 está en contra de la realizada por D'Appolonia y Schwarz (1992). En lo que al volumen se refiere, D'Appolonia y Schwarz (1992) encontraron incrementos de 12% que corresponden al máximo incremento obtenido en nuestro laboratorio para la harina **MO**.

### **5.6. Textura (Vida de anaquel)**

Los resultados de la determinación de la textura de los panes elaborados con las tres harinas y dos diferentes dosis de FX-470 se muestran en las figuras 13, 14 y 15.

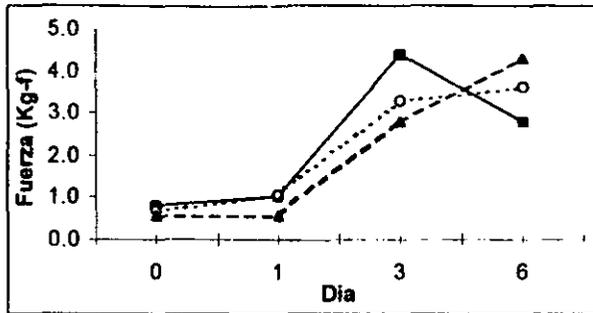


Figura 13: Textura de los panes de la harina MO con diferentes dosis enzimáticas. Control (■), 100 ppm (○) y 150 ppm (▲)

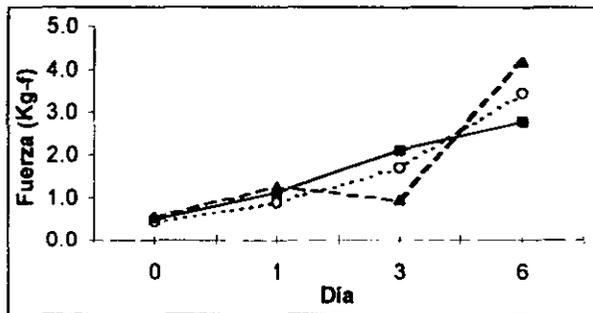


Figura 14: Textura de los panes de la harina E con diferentes dosis enzimáticas. Control (■), 100 ppm (○) y 150 ppm (▲)

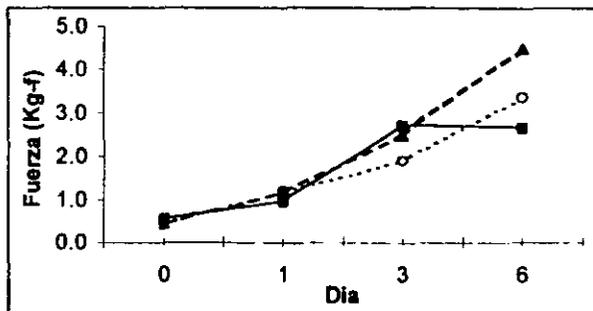


Figura 15: Textura de los panes de la harina V con diferentes dosis enzimáticas. Control (■), 100 ppm (○) y 150 ppm (▲)

Como se puede observar, las tres harinas presentaron el mismo comportamiento, es decir, al día cero y al primero los panes con y sin FX-470 tienen valores de textura o dureza muy parecidos, mismos que aumentaron como es de esperarse, con el transcurso de los días. Al día seis los panes que contienen FX-470 mostraron mayor endurecimiento que los testigos.

El endurecimiento debido a la retrogradación depende de la relación agua-almidón (Eliasson y Larsson, 1993), la presencia del FX-470 en los panes produce la hidrólisis de los pentosanos ocasionando la liberación del agua contenida en estos y aumentando dicha relación, por lo tanto, conducen a un mayor endurecimiento de los panes que contienen el filtrado enzimático.

Es necesario hacer notar que debido a las condiciones utilizadas en esta prueba de endurecimiento, los panes tratados enzimáticamente y los no tratados presentaron después del primer día una dureza excesiva que hizo que todos los panes no sean aptos para el consumo humano.

### 5.7.Extracción y purificación de pentosanos

Ya que nuestros resultados sugerían que los pentosanos solubles eran los principales responsables de los cambios en el comportamiento de las harinas, masas y efectos sobre el pan, se procedió a una extracción y purificación de pentosanos solubles e insolubles para posteriormente utilizarlos como sustratos en pruebas de actividad xilanolítica.

Los resultados de la extracción y purificación de ambas fracciones se muestran en la tabla 15

**Tabla 15. Extracción de las fracciones soluble e insoluble**

<b>Muestra</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>%</b>
Xilanos solubles	1.47	0.74
Xilanos insolubles	2.24	1.12

Las cantidades obtenidas en ambas fracciones son bajas ya que se esperaba un total aproximado del 2.5 al 3 %; sin embargo estas son suficientes para nuestros propósitos.

### 5.8. Actividad xilanolítica sobre diferentes sustratos

Esta prueba se realizó a fin de conocer sobre que fracción (PS o PI) tendrá mayor actividad el FX-470 y estos resultados compararlos con los de sustratos regularmente utilizados en la determinación de la actividad xilanolítica (xilanos de abedul y avena). Los resultados se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16. Actividad xilanolítica sobre diferentes sustratos**

<b>Sustrato</b>	<b>Actividad relativa (%)</b>
Xilanos solubles de trigo	100
Xilanos insolubles de trigo	10
Xilanos de abedul <sup>a</sup>	82
Xilanos de avena <sup>a</sup>	62

<sup>a</sup> Sigma Chemical

Se observa claramente que FX-470 presentó mayor actividad sobre los PS de trigo, misma que es diez veces mayor que la actividad sobre los PI de trigo y 1.2 veces mayor que la actividad sobre xilanos de abedul. Estos resultados nos indican que FX-470 actuará principalmente sobre la fracción soluble de los pentosanos.

Los resultados obtenidos, indican que la aplicación de FX-470 a la formulación del pan produce modificaciones en la estructura de los pentosanos, siendo éstas más importantes en los pentosanos solubles, posiblemente debido a ser más accesibles para las xilanasas del FX-470. Estas modificaciones, producen una disminución en la capacidad de absorber agua de los pentosanos, lo que ocasiona que el agua no absorbida por estos polisacáridos se redistribuya entre los demás componentes del "sistema" masa, teniendo como consecuencia cambios en la consistencia de la masa, mismos que se ven reflejados tanto en las propiedades reológicas como en el producto final. Sin embargo, tales cambios en la masa no son consecuencia únicamente de la hidrólisis de los pentosanos debida a la acción de las xilanasas del FX-470, ya que la consistencia de la masa depende de la concentración de todos sus componentes y de las interacciones que pueden producirse entre estos. Debido a

esto, es que se hace muy complicado establecer una correlación directa entre uno de los componentes de la masa, en este caso los pentosanos y los cambios sufridos por la masa o el producto final, o la dosis enzimática. Por otro lado, se pueden establecer correlaciones no directas, que representen las interacciones entre los componentes de la masa y los cambios sufridos por la masa. En este caso, se estableció la correlación entre contenido de gluten/contenido de pentosanos (G/P) con el incremento de volumen, y se observó que a mayor valor de G/P, mayor fue el incremento de volumen de los panes.

Finalmente, cabe mencionar que el tratamiento de las masas con un exceso de xilanasas de FX-470 causó efectos detrimentales en las mismas, esto probablemente debido a una disminución en la viscosidad de las masas.

## 6. Conclusiones

El filtrado enzimático obtenido bajo estas condiciones presentó una actividad xilanolítica casi 2 veces mayor que CI, la preparación comercial de mayor actividad.

FX-470 mostró una actividad específica casi 60% mayor a CI, con lo que se requerirá menor cantidad de FX-470 que las preparaciones comerciales para alcanzar una actividad dada.

La presencia de FX-470 en las masas produjo mejoras en los parámetros farinográficos: absorción, tiempo óptimo de amasado, estabilidad e índice de tolerancia en dosis de 100 – 200 ppm para la harina MO, 50 ppm para la harina E y 100 ppm para la harina V.

Los parámetros alveográficos: fuerza de la masa, tenacidad y extensibilidad también fueron mejorados con la presencia de FX-470 en dosis de 50 ppm para las harinas MO y E y 100 – 150 ppm para la harina V.

La presencia del filtrado FX-470 en una suspensión de harina ocasionó pérdidas en la capacidad de absorción de agua de hasta 30, 25 y 12% para las harinas MO, E y V respectivamente.

La adición de FX-470 en la formulación de los panes produjo incrementos de volumen de casi 12%, 5% y 4% para las harinas MO, V y E respectivamente.

Los incrementos de volumen obtenidos con FX-470 son comparables con los de la preparación comercial utilizada.

Se estableció una correlación entre contenido de gluten/contenido de pentosanos (G/P) con el incremento de volumen: a mayor valor de G/P, mayor el incremento de volumen del pan.

Las características sensoriales (color de miga, color de corteza y apariencia de la miga) de los panes de las tres harinas adicionadas con FX-470 fueron mejores o iguales que el control sin enzima y que los panes elaborados con la preparación comercial.

FX-470 mostró una actividad xilanolítica aproximadamente 20% mayor cuando se utilizaron pentosanos solubles de trigo como sustrato en lugar de xilanos de abedul.

## 7. Bibliografia

- AACC. 1983. Approved methods, American Association of Cereal Chemists. 8<sup>th</sup> Edition. St Paul, Minnesota.
- Bartolomé B., Faulds C.B., Tuohy M., Hazlewood G.P., Gilbert H.J. and Williamson G. 1995. "Influence of different xylanases on the activity of ferulic acid esterase on wheat bran". *Biotechnol. Appl. Biochem.* 22, 65 – 73
- Bastawde K.B. 1992. "Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action". *World J. Microbiol. and Biotechnol.*, Vol. 8,
- Bertin Ch., Rouau X. and Thibault J.F. 1988. "Structure and properties of sugar beet fibres". *J. Sci. Food Agric.* 44, 15 - 29
- Biely P., Vrsanka M. and Kucar S. 1992. "Identification and mode of action of endo-(1-4)- $\beta$ -xylanases". En: *Xylans and Xylanases*. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B.V. 81 - 95
- Boyacioglu M.H. and D'Appolonia B.L. 1994. "Characterization and utilization of durum wheat for breadmaking. I. Comparison of chemical, rheological, and baking properties between bread wheat flours and durum wheat flours". *Cereal Chem.* 71 (1), 21 - 28
- Clarke J.H., Rixon J.E., Ciruela A., Gilbert H.J., and Hazlewood G.P. 1997. "Family-10 and family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 177 - 183
- Cleemput G., Roels S.P., Van Oort M., Grobet P.J. and Delcour J.A. 1993. "Heterogeneity in the structure of water-soluble arabinoxylans in european wheat flours of variable bread-making quality". *Cereal Chem.* 70 (3), 324 - 329
- Cui W., Wood P.J., Weisz J. and Beer M.U. 1999. "Nonstarch polysaccharides from preprocessed wheat bran: carbohydrate analysis and novel rheological properties". *Cereal Chem.* 76 (1), 129 - 133

- D'Appolonia B I. and Schwarz P B 1992. "Importance of cereal non-starchy polysaccharides in end-products" Cereal Chemistry and Technology: A Long Past and a Brigh Future. 9<sup>th</sup> International Cereal and Bread Congress, Paris, 43 - 55
- Delcour J.A., Van Hamel S. and De Geest C. 1989. "Physico-chemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. I. Colorimetric analysis of pentosans and their relative monosaccharide compositions in fractioned (milled) rye products". Cereal Chem. 66 (2), 107 - 111
- Delcour J.A., Rouseu N. and Vanhaesendonck I.P. 1999. "Pilot-scale isolation of water-extractable arabinoxylans from rye". Cereal Chem. 76 (1), 1 - 2
- Dreesse P.C., Faubion J.M. and Hosney R.C. 1988. "Dynamic rheological properties of flour, gluten, gluten-starch doughs. II. Effect of variuos processing and ingredient changes" Cereal Chem. 65 (4), 354 - 359
- Eliasson A.C and Larsson K. 1993. "Cereals in breadmaking: A molecular colloidal approach". Capitulo 2, Marcel Dekker, Inc.
- Faurot A.L., Saulnier L, Bérot S., Popineau Y., Petit M.D., Rouau X. and Thibault J.F. 1995. "Large scale isolation of water-soluble and water-insoluble pentosans from wheat flour". Lebensm. Wiss. U. Technol. 28 (4), 436 - 441
- Fengler A. and Marquardt R.R. 1988. "Water-soluble pentosans from rye: I. Isolation, partial purification and characterization". Cereal Chem. 65 (4), 291 - 297
- Fishman A., Berk Z. and Shoham Y. 1995. "Large-scale purification of xylanase T-6" Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 88 - 93
- Geismann T. And Newkom H.C. 1973. "On the composition of the water soluble wheat flour pentosans and their oxidative gelation". Lebensm Wiss. U. Technol. 6 (1), 59 - 62
- Ghosh M. and Nanda G. 1994. "Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49". Appl. Environ. Microbiol. 60 (12), 4620 - 4623
- Hamer R.J. 1992. "Enzymes and baking industry: Friends or foes?". "Importance of

cereal non-starchy polysaccharides in end-products". *Cereal Chemistry and Technology A Long Past and a Bright Future*. 9<sup>th</sup> International Cereal and Bread Congress, Paris, 7 - 23

- Hashimoto S., Shogren M.D. and Pomeranz Y. 1987. "Cereal pentosans. Their estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products". *Cereal Chem.* 64 (1), 30 - 34
- Hashimoto S., Shogren M.D. Bolte L.C. and Pomeranz Y. 1987. "Cereal pentosans: their estimation and significance. III. Pentosans in abraded grains and milling by-products". *Cereal Chem.* 64 (1), 39 - 41
- He H. and Hosney R.C. 1992. "Effect of the quantity of wheat flour protein on bread loaf volume". *Cereal Chem.* 69 (1), 17 - 19
- Holas J. and Tipples K.H. 1978. "Factors affecting farinograph and baking absorption I. Quality characteristics of flour streams". *Cereal Chem.* 55 (6), 637 - 640
- Hosney R.C. 1984. "Functional properties of pentosans in baked foods". *Food Technol.* 38, Enero, 114 - 117
- Huebner F.R. 1989. "Assessment of potential breadmaking quality of hard spring wheats by HPLC of gliadins - Year two". *Cereal Chem.* 66 (4), 333 - 337
- Izydorczyk M.S., Biliaderas C.G. and Bushuk W. 1991. "Comparison of the structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat varieties". *Cereal Chem.* 68 (2), 139 - 144
- Izydorczyk M.S., Biliaderas C.G. and Bushuk W. 1991. "Physical properties of water-soluble pentosans from different wheat varieties". *Cereal Chem.* 68 (2), 145 - 150
- Izydorczyk M.S. and Biliaderas C.G. 1993. "Structural heterogeneity of wheat endosperm arabinoxylans". *Cereal Chem.* 70 (6), 641 - 646
- Jeffries T.W. 1996. *Biochemistry and genetics of microbial xylanases*". [xyl\\_rev.html](http://xyl_rev.html) En: [calvin.biotech.wisc.edu](http://calvin.biotech.wisc.edu)

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

- Kluepfel D., Vats-Mehta S., Aumont F., Shareck F. and Morosoli R. 1990 "Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66" *Biochem. J.* 267, 45 - 50
- Kormelink F.J.M., Gruppen H., Wood T.M. and Beldman G. 1992. "Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori*". En: *Xylans and Xylanases*. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B.V. 141 - 147
- Krengel U., and Dijkstra B.W. 1996. "Three-dimensional structure of endo-1,4- $\beta$ -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular basis for its low pH optimum" *J. Mol. Biol.* 263 (1), 70 - 78
- Lindahl L. and Eliasson A.C. 1992. "Influence of added enzymes on the rheological properties of a wheat flour dough". *Cereal Chem.* 69 (5), 542 - 546
- Maat J., Roza M., Verbakel J., Stam H., Santos Da Silva M.J., Bosse M., Egmond M.R. and Hagemans M.L.D. 1992. "Xylanases and their application in bakery". En: *Xylans and Xylanases*. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B.V. 349 - 360
- Maringer U., Wong K.K.Y., Saddler J.N and Kubicek C.P. 1995 "A functional comparison of two pairs of  $\beta$ -1,4- xylanases from *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* rut C-30". *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21, 49 - 65
- Martin M.L. and Hosoney R.C. 1991. "A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes". *Cereal Chem.* 68 (5), 503 - 507
- McCleary B.V. 1992. "Measurement of endo-1,4- $\beta$ -D-Xylanase". En *Xylans and Xylanases*. Ed. J. Visser. Elsevier Science Publishers B.V. 161 - 169
- McCleary B.V., Gibson T.S. Allen H. And Gams T.C. 1986. Enzymic hydrolysis and industrial importance of  $\beta$ -glucans and wheat flour pentosans". *Starke.* 38, 433 - 437
- McLauchlan W.R., Garcia-Conesa M.T., Williamson G., Roza M., Ravestein P. and Maat J. 1999. "A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases". *Biochem. J.* 338, 441 - 446

- Mendicuti Castro L.P., Trejo Aguilar B.A. and Aguilar Osorio G. 1997. "Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain" FEMS Microbiol. Lett. 146, 97 - 102
- Michniewicz J., Biliaderis C.G. and Bushuk W. 1990. "Water-insoluble pentosans of wheat: Composition and some physical properties". Cereal Chem. 67 (5), 434 - 439
- Miller K.A. and Hosney R.C. 1999. "Effect of oxidation on the dynamic rheological properties of wheat flour-water doughs". Cereal Chem. 76 (1), 100 - 104
- Monfort A., Blasco A., Prieto J.A. and Sanz P. 1996. "Combined expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X-24 and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amilase in industrial baker's yeast and their use in bread making". Appl. Environ. Microbiol. 62 (10), 3712 - 3715
- Monti R., Terenzi H.F. and Jorge J.A. 1991. "Purification and properties of an extracellular xylanase from thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *Thermoidea*". Can. J. Microbiol. 37, 675 - 681
- Moore A.M., Martínez Muñoz I. and Hosney R.C. 1990. "Factors affecting the oxidative gelation of wheat water-solubles". Cereal Chem. 67 (1), 81 - 84
- Newkome H. and Markwalder H.V. 1978. "Oxidative gelation of wheat flour pentosans: A new way of crosslinking polymers". Cereal Food World. 23, 374 - 376
- Othón Serna Saldívar S.R. 1996. "Química, almacenamiento e industrialización de los cereales". Capítulo 13, AGT Editor S.A.
- Petit-Benvegnen M.D., Saulnier L. and Rouau X. 1998. "Solubilization of arabinoxylans from isolated water-unextractable pentosans and wheat flour doughs by cell-wall-degrading-enzymes". Cereal Chem. 75 (4), 551 - 556
- Roels S.P., Cleemput G., Vandewalle X., Nys M. and Delcour J.A. 1993. "Bread volume potential of variable-quality flours with constant protein level as determined by factors governing mixing time and baking absorption levels". Cereal Chem. 70 (3), 318 - 323

- Rouau X. and Moreau D. 1993 "Modification of some physicochemical properties of wheat flour pentosans by an enzyme complex recommended for baking". *Cereal Chem.* 70 (6), 626 - 632
- Sarker D.K., Wilde P.J. and Clark D.C. 1998. "Enhancement of protein foam stability by formation of wheat arabinoxylan-protein crosslinks". *Cereal Chem.* 75 (4), 493 - 494
- Shogren M.D. and Finney K.F. 1984. "Bread making test for 10 gr of flour" *Cereal Chem.* 61 (5), 418 - 423
- Sunna A., Puls J. and Antranikian G. 1996. "Purification and characterization of two thermostable endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Thermotoga thermarum*". *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24, 177 - 185
- Sunna A. and Antranikian G. 1997. "Xylanolytic -enzymes from fungi and bacteria". *Crit. Rev. Biotechnol.* 17 (1), 39 - 67
- Törrönen A., March R.L., Messner R., Gonzales R., Kalkkinen N., Harkki A. and Kubicek C.P. 1992. "The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: Characterization of both enzymes and genes". *Biotechnol.* 10, 1461 - 1465
- Ujiié M., Roy C. and Yaguchi M. 1991. "Low-molecular weight xylanase from *Trichoderma viride*". *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (6), 1860 - 1862
- Venkateswara Rao G. and Haridas Rao P. 1993. "Methods for determining rheological characteristics of doughs: A critical evaluation". *J. Food Sci. Technol.* 30 (2), 77 - 87
- Vinkx C.J.A., Van Nieuwenhove C.G. and Delcour J.A. 1991. "Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. III. Oxidative gelation of a fraction containing water-soluble pentosans and proteins". *Cereal Chem.* 68 (6), 617 - 622
- Wong K.K.Y., Tan L.U.L. and Saddler J.N. 1988 "Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications". *Microbiol. Rev.* 52, 305 - 317