



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad de Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Efecto de la Adición de Trealosa sobre las Propiedades Viscoelásticas
y de Panificación de Masas Congeladas y Calidad de Pan Tipo Bolillo

TESIS

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

María Irene Silvas García

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEL AUTOR

Este trabajo se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención de Grado de Maestro en Ciencias, Especialidad Almacenamiento y Procesamiento de Granos, de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, para ponerla a disposición de los interesados. Se puede tener autorización para reproducir y/o referirse a este escrito, en su totalidad o en parte, a través del Coordinador del Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos, cuando considere que dicha propuesta apoye el avance académico.

En cualquier otra situación se debe tener autorización del autor.

ATENTAMENTE



María Irene Silvas García

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Este trabajo se aceptó satisfactoriamente en la fecha señalada abajo:



Dr. Benjamín Ramírez Wong

8 de Octubre 2010

Fecha

AGRADECIMIENTOS

Al **Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora** por ayudar en mi desarrollo académico para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por contribuir económicamente con los fondos necesarios para el proyecto de Investigación desarrollado y por el apoyo en la manutención de mi educación de posgrado.

Al **Dr. Benjamín Ramírez Wong**, por su apoyo, dedicación, paciencia y por creer en mí, como una posible futura investigadora, por su dirección y por sus enseñanzas en este camino.

A las Doctoras **Patricia Isabel Torres Chávez, María Guadalupe Salazar García**, y a las Maestras **Guadalupe Amanda López Ahumada, Elisa Magaña Barajas**, por su importante colaboración a lo largo del trabajo de investigación, por su ayuda, aporte de ideas y revisión del mismo.

A las **muchachas y muchachos del laboratorio de Reología**, por estar siempre dispuestos cuando necesité ayuda a lo largo de la investigación, por contribuir con su experiencia, trabajo y su buena vibra. También a los del **laboratorio de química de cereales** por su ayuda en esta investigación.

A todos **mis profesores** del posgrado, de cada uno de ellos llevo una enseñanza, no solo en mi vida profesional, si no por la convivencia durante mi formación, la cual, deja en mí un gran respeto y cariño para todos ellos.

A las **personas que de alguna u otra manera contribuyeron** con su apoyo, enseñanza, en este proyecto y a lo largo de mi formación.

¡Muchas gracias!

Dedicatoria

A Dios Creador que me ha dado la vida, la fortaleza y la oportunidad de cumplir con esta meta, por llenarme de Bendiciones día a día...

A mi Esposo por apoyarme en esta etapa, por compartir su tiempo con mi sueño de ser maestra en ciencias, por ser una de las personas que más me alienta a seguir adelante y cumplir mis objetivos personales...

A mis Padres y hermanos por enseñarme que con perseverancia y trabajo puedo lograr cualquier cosa que me proponga, por estar conmigo en todo momento, por brindarme su apoyo, amor y fortaleza...

A mis profesores por enseñarme la disciplina y el método para aprender y algún día poder compartir los conocimientos que he adquirido y transmitirlos a otros...

A mis compañeros de generación con los cuales compartí, alegrías, tristezas, esfuerzos, desvelos y tantas y tantas horas de trabajo...

A mis familiares y amigos por estar a mi lado en esta bonita etapa, a pesar que a veces no tenía tiempo para ellos...

A todas aquellas personas que de alguna manera estuvieron contribuyendo día a día, con su compañerismo, sus sonrisas, consejos y palabras de aliento...

A todos, no tengo otra forma de agradecerles solo con amor...

María Irene

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	5
General.....	5
Específicos.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
Pan.....	6
Consumo de Pan en el Mundo.....	7
Consumo de Pan en México.....	9
Propiedades Reológicas de las Masas para Pan.....	9
Tecnología de la Panificación.....	14
Masas Congeladas.....	15
Principales parámetros de calidad de pan.....	15
Principales cambios durante la congelación de masas.....	17
Cambios en la levadura.....	18
Cambios en el gluten.....	18
Cambios en la distribución del agua.....	20
Cambios en las propiedades viscoelásticas de masas congeladas y calidad de pan.....	21
Trealosa como Alternativa para Mejorar la Calidad de Pan Elaborado a partir de Masas Congeladas.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Descripción General de la Investigación.....	29
Materia Prima.....	29
Evaluación de la Calidad de la Harina.....	29
Análisis químico.....	29
Volumen de sedimentación (Zeleny).....	31
Pruebas reológicas.....	31
Farinogramas.....	31
Alveogramas.....	31
Reofermentogramas.....	31
Formulación Estándar del Pan Comercial tipo Bolillo.....	32
Elaboración de Masas Congeladas.....	32
Congelación.....	32
Almacenamiento.....	32
Descongelación.....	34
Fermentación.....	34

CONTENIDO (Cont...)

Horneado.....	34
Evaluaciones en Masas Congeladas.....	34
Reofermentogramas.....	34
Cromatografía líquida de exclusión molecular.....	35
Características viscoelásticas.....	35
Método dinámico.....	35
Evaluación de Calidad de Pan Tipo Bolillo.....	36
Pesa.....	36
Volumen del pan.....	36
Volumen específico.....	36
Textura del pan.....	36
Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
Calidad de la Harina.....	38
Propiedades Fermentativas (producción de CO ₂).....	40
Propiedades Viscoelásticas.....	46
Cambios en las Proteínas.....	51
Evaluación de la Calidad del Pan.....	60
Volumen específico.....	60
Textura.....	63
Correlaciones entre las diferentes determinaciones.....	66
CONCLUSIONES.....	69
RECOMENDACIONES.....	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXO A.....	84
ANEXO B.....	93

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Consumo de pan en el mundo.....	8
2	Destino de las harinas en México.....	11
3	Formulaciones para pan bolillo típico y masas congeladas.....	33
4	Características fisicoquímicas y reológicas de la harina.....	39
5	Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre la retención y desprendimiento de CO ₂ en masas congeladas.....	41
6	Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre la proteína polimérica soluble, gliadinas y albuminas-globulinas de masas congeladas.....	53
7	Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre el volumen, peso y volumen específico del pan elaborado a partir de masas congeladas.....	61
8	Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre la textura del pan elaborado a partir de masas congeladas.....	64
9	Correlaciones simples (r) entre parámetros viscoelásticos, fisicoquímicos de masas congeladas y parámetros de calidad de pan tipo bolillo.....	68

LISTA DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1	Producción de trigo en algunos estados de México en el año 2009.....	10
2	Fórmula estructural de la trealosa.....	24
3	Diagrama de flujo de la investigación para elaborar pan tipo bolillo a partir de masas congeladas, adicionándoles trealosa.....	30
4	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la producción total de CO ₂ de masas congeladas.....	42
5	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el volumen de retención de CO ₂ de masas congeladas.....	43
6	Efecto de la concentración de trealosa y el tiempo de almacenamiento sobre el desprendimiento de CO ₂ en masas congeladas.....	44
7	Efecto del tiempo de almacenamiento y la concentración de trealosa sobre el módulo de elasticidad (G').....	48
8	Efecto del tiempo de almacenamiento y la concentración de trealosa sobre el módulo de viscosidad (G'').....	49
9	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el ángulo de fase de masas congeladas.....	50
10	Efecto de la concentración de trealosa sobre el ángulo de fase de masas congeladas.....	52
11	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el porcentaje de proteína polimérica soluble de masas congeladas.....	54

LISTA DE FIGURAS (Cont...)

12	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las gliadinas de masas congeladas.....	55
13	Efecto de la concentración de trealosa sobre el porcentaje de gliadinas en masas congeladas.....	57
14	Efecto del tiempo de almacenamiento y concentración de trealosa sobre el porcentaje de albúminas y globulinas de masas congeladas.....	58
15	Efecto del tiempo de almacenamiento y concentración de trealosa sobre el volumen específico de pan elaborado de masas congeladas.....	62
16	Efecto de la concentración de trealosa y el tiempo de almacenamiento sobre la textura de pan elaborado de masas congeladas.....	65
A-1	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de almacenamiento G' en masas congeladas.....	84
A-2	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de almacenamiento G' en masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa.....	85
A-3	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de almacenamiento G' en masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa.....	86
A-4	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de pérdida G'' en masas congeladas.....	87
A-5	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de pérdida G'' en masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa.....	88

LISTA DE FIGURAS (Cont...)

A-6	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de pérdida G'' en masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa.....	89
A-7	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el Angulo $\tan \delta$ en masas congeladas.....	90
A-8	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el Angulo $\tan \delta$ en masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa.....	91
A-9	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el Angulo $\tan \delta$ en masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa.....	92
B-1	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0 mg/kg de trealosa y el tiempo de almacenamiento.....	93
B-2	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa y el tiempo de almacenamiento.....	94
B-3	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa y el tiempo de almacenamiento.....	95
B-4	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 0 días de almacenamiento.....	96
B-5	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50% de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 14 días de almacenamiento.....	97
B-6	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 28 días de almacenamiento.....	98

LISTA DE FIGURAS (Cont...)

B-7	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 42 días de almacenamiento.....	99
B-8	Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 56 días de almacenamiento.....	100

RESUMEN

Las tendencias actuales en el consumo y producción de pan apuntan a un producto con mayor calidad, vida útil mayor, disponibilidad y fácil de transportar. La mayoría de estas demandas se pueden lograr con el uso de masas congeladas. Sin embargo, la prolongación del almacenamiento congelado de la masa da lugar a una reducción en la calidad del pan. Una alternativa para mejorarla, es el uso de trealosa como aditivo en las masas congeladas. El objetivo del presente estudio fue evaluar los cambios en las propiedades de fermentación, viscoelásticas y de las fracciones proteicas de las masas congeladas y de la calidad del pan tipo bolillo, adicionando trealosa. Se utilizó una harina comercial, seleccionada, y caracterizada química y reológicamente. Se elaboraron masas con formulación para pan tipo bolillo, utilizando dos concentraciones de trealosa, 200 y 400 mg/kg. Las masas fueron almacenadas, en congelación lenta durante 8 semanas. Cada dos semanas se tomaron muestras de las masas, las cuales se descongelaron a temperatura de refrigeración, se fermentaron y se evaluaron. A las masas una vez descongeladas se les realizaron reofermentogramas, se evaluaron las propiedades viscoelásticas a través de los módulos de elasticidad (G') y viscosidad (G'') y el ángulo de fase y se estudiaron los cambios en las fracciones proteicas usando cromatografía de alta resolución (HPLC). Además, se elaboró pan tipo bolillo, al cual se le midió el volumen específico y la textura valorada como la firmeza máxima. Se utilizó un diseño de experimentos factorial con dos variables: concentración de trealosa (0, 200 y 400 ppm) y tiempo de almacenamiento (0, 2, 4, 6, y 8 semanas). Se observó un efecto muy significativo ($p < 0.01$) del tiempo de almacenamiento sobre producción total de CO_2 , la trealosa evitó que esta disminución fuera mayor, debido a que se observó que a medida que aumenta la concentración de trealosa incrementó la retención de CO_2 . Se observó una tendencia del ángulo de fase a mantenerse constante a cualquier concentración de trealosa, lo que indica que esta no afectó las propiedades viscoelásticas de la masa. Se observó una tendencia a aumentar la proteína polimérica soluble, con el tiempo de almacenamiento, pero esta disminuyó por efecto de la concentración de trealosa. La concentración de gliadinas, albúminas y globulinas disminuyó con el

tiempo de almacenamiento y por efecto de la concentración de trealosa estas proteínas aumentaron. El volumen específico del pan incrementó, al aumentar la concentración de trealosa con valores de 5, 5.6 y 6.2 cm³/g, para 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa, respectivamente. La textura del pan de masa congelada fue afectada por el tiempo de almacenamiento y la concentración de trealosa, aumentando la fuerza máxima con el tiempo de almacenamiento, pero el efecto se disminuyó con la concentración de trealosa, presentándose una tendencia de textura más suave con 400 mg/kg de trealosa hasta los 28 días de almacenamiento. Se concluyó que la trealosa no afectó las propiedades viscoelásticas de las masas congeladas, pero sí las características de fermentación y la calidad del pan en una forma positiva.

INTRODUCCIÓN

El pan es un alimento fermentado básico en muchas culturas. La masa está constituida fundamentalmente de harina de trigo, agua, levadura y sal; además, pueden estar presentes componentes minoritarios (Arpita y Datta, 2008). Es uno de los productos alimenticios más consumidos en el mundo, y la tecnología de la panificación es probablemente una de las más conocidas desde la antigüedad. Esta tecnología ha evolucionado continuamente a lo largo de los años; nuevos materiales, ingredientes y equipo se han introducido para la producción de pan de mejor calidad (Anon y col., 2004).

A pesar de su gran consumo, gran cantidad de pan se desecha como consecuencia del envejecimiento, que es la disminución de la aceptación por parte del consumidor, causada por cambios que no resultan de la acción de microorganismos dañinos. Entre las alteraciones que se destacan, se encuentran el endurecimiento de la miga, los cambios en el sabor y el aroma y la pérdida de crujibilidad de la corteza (Cauvain, 2003). El rechazo de los productos de panificación relacionado con su envejecimiento representa una importante pérdida económica. Una de las estrategias usadas para disminuir dichas pérdidas, es la congelación de las masas, ya que este proceso permite ofrecer permanentemente al consumidor un producto recién elaborado. A partir de la década de los 50's las masas congeladas han sido muy utilizadas por los productores de pan.

Al haber un prolongado almacenamiento en congelación y habiendo ciclos de congelación y descongelación, ocurren algunos inconvenientes. Hay una disminución en el volumen del pan, debido a una reducción del potencial de fermentación, al haber una disminución de la viabilidad de la levadura; por lo tanto, aumentan los tiempos de fermentación, además la red de gluten se ve afectada (Anon y col., 2004; Casey y Foy 1995; Giannou y col., 2005).

Se ha observado, que algunos aditivos tienen la capacidad de evitar o disminuir los procesos adversos, que ocurren en las masas congeladas. Estos ayudan a la crioprotección de las levaduras y la red de gluten (Octaviani y Zhou, 2007). El uso de aditivos se ha convertido en una práctica común en la industria panadera. El objetivo de su uso es mejorar las propiedades de las masas, aumentar la calidad del pan y extender su vida de anaquel. Con este propósito, se utilizan ampliamente, aditivos químicos de diferentes estructuras. Actualmente se han incorporado a las formulaciones, enzimas, gomas hidrocoloides, emulsificantes y trealosa, entre otros (Kim y col., 2008).

En estudios recientes sobre la inclusión de la trealosa en productos de panadería con masas congeladas, se considera un crioprotector eficaz, debido a que reduce el punto de congelación, ayudando a la protección contra lesiones por deshidratación y desnaturalización de las proteínas y levaduras. (Gancedo y Flores, 2004).

En esta investigación se estudió a la trealosa como aditivo en masas congeladas, con el fin de mejorar las propiedades viscoelásticas de estas. Así mismo, se identificaron los cambios que sufren las proteínas durante el congelamiento de la masa y se evaluó la calidad del pan tipo bolillo obtenido de masas congeladas. El bolillo es un tipo de pan de gran consumo entre los mexicanos, por lo que elaborarlo con la tecnología de masas congeladas podría ayudar a ofrecer al consumidor un producto recién elaborado y disponible todo el tiempo.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a las tendencias mundiales, los consumidores prefieren pan artesanal, por ser de mejor calidad sensorial y nutricional, con bajo costo. El pan bolillo es de tipo artesanal y conserva los atributos sensoriales, además de los nutricionales, debido a que contiene baja cantidad de grasa, no contiene azúcares refinados y se puede conseguir a bajo costo.

Además, los productores panaderos están en busca de alternativas para evitar la problemática a la que se enfrentan día a día, debido a que es difícil, para ellos predecir la cantidad de pan que venderán por día. Ellos producen pan en base a experiencia de ventas anteriores, elaborando un excedente del producto, para asegurar la disponibilidad de este. Cuando la demanda no es la esperada, el pan se desecha, presentándose pérdidas principalmente de tipo económico.

Otro problema común es la falta de homogeneidad entre franquicias de una panadería, debido a que la preparación, generalmente se hace in situ. Para dar abasto a la demanda del producto, evitando pérdidas económicas y asegurando la homogeneidad del pan, el uso de masas congeladas podría ser una alternativa.

Sin embargo, de igual manera se presentan inconvenientes debido a que el pan confeccionado a partir de masas congeladas presenta una reducción en el volumen y pérdida de la viabilidad de la levadura. Por lo cual, es de gran importancia investigar acerca de alternativas para mejorar la calidad del pan elaborado con estas, para dar propiedades lo más cercanas a un pan fresco, con opciones que ahorren tiempo y dinero a los productores panaderos.

El uso de trealosa como crioprotectante en las masas congeladas, es una alternativa que podría solucionar efectos adversos, ya que ayudaría a preservar las características de calidad del producto final, protegiendo la red de gluten y preservando la viabilidad de las levaduras. Además, puede ayudar a mejorar la calidad del pan después del descongelado de la masa. El modelo de pan a utilizarse

es el tipo bolillo, ya que es el más consumido en México, de gran aceptación por los consumidores y de formulación sencilla.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la trealosa y el tiempo de almacenamiento en las propiedades viscoelásticas, de fermentación y fracciones proteicas de masas congeladas y la calidad de pan tipo bolillo.

Específicos

1. Evaluar los cambios fermentativos y viscoelásticos de masas congeladas para pan tipo bolillo a diferentes concentraciones de trealosa y tiempos de almacenamiento.
2. Evaluar los cambios en las fracciones proteicas de masas congeladas para pan tipo bolillo a diferentes concentraciones de trealosa y tiempos de almacenamiento.
3. Evaluar los cambios en volumen y texturales del pan tipo bolillo elaborado a partir de masas congeladas con diferentes concentraciones de trealosa y tiempos de almacenamiento.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Pan

El pan es un alimento fermentado básico en muchas culturas. La masa está constituida fundamentalmente de harina de trigo, agua, levadura y sal; además, pueden estar presentes componentes minoritarios, cuya función es mejorar las características del producto. El agua y la harina son los ingredientes más importantes en una formulación de pan, ya que afectan directamente la textura y la miga. La harina es siempre el 100 % y el resto de los ingredientes son en proporción de esa cantidad en peso.

El añadir aproximadamente el 50% de agua da como resultados una textura fina y ligera del pan. La mayoría de las fórmulas para pan artesanal contienen desde 60 % al 75 % de agua. En panes de levadura, los porcentajes más altos de agua dan lugar a más burbujas de CO₂ y un pan con mayor volumen en la miga. Si se toma como base 100 % de harina, el resto de los ingredientes se da en las siguientes medidas: 2 % de levadura, 4 % de azúcar, 2 % de sal y 3 % de manteca (Arpita y Datta, 2008).

El pan es un alimento diferente a algunos otros alimentos comunes, ya que es un producto fermentado. Se obtiene de la fermentación de azúcares liberados a partir del almidón de la harina, por la acción de las enzimas naturales de esta. La fermentación del pan es causada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo utilizado comercialmente. En la fermentación, el azúcar se convierte en agua y CO₂. El vapor de agua y el CO₂ se expanden, debido a las altas temperaturas, dando como resultado un aumento en el volumen de la masa y de la miga de pan en el momento del horneado. El azúcar se agrega para iniciar la fermentación y se añade sal para fortalecer al gluten y convertir la acción de la levadura en una expansión controlada de la masa. La grasa se añade para

Tabla 1. Consumo de pan en el mundo

País	Consumo Per Cápita (kg)
Alemania	106
Chile	96
Francia	56
Estados Unidos	48
Perú	28
Brasil	27
Colombia	24

Fuente: El Consumo de Pan y las Tendencias a Nivel Mundial
http://www.panera.com.pe/revistas/Rev3/rev03_10-11_Internacional3.pdf

formulaciones tienen mayor valor dietético y nutricional (sin grasa, con un porcentaje mínimo de azúcar o a veces sin azúcar).

<http://www.panera.com.pe/revistas/Rev3/rev0310-11Internacional3.pdf>

Consumo de Pan en México

El pan es uno de los productos alimenticios más consumidos en el mundo y la tecnología de la panificación es probablemente una de las más antiguas técnicas conocidas (Anon y col., 2004). Durante años, los productos de panadería han sido objeto de una continua transformación impulsada por los cambios en los hábitos sociales, la demanda de los consumidores, y el interés de los productores panaderos en el ahorro de mano de obra y costo (Rosell y Gómez, 2007). En México el 71.94% (Fig. 1), de las harinas obtenidas por las industrias molineras se destina a la elaboración del pan, (Tabla 2), (Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo, CANIMOLT, 2009). En el país el consumo de pan bolillo es una tradición popular. La Cámara Nacional de la Industria Panificadora (CANAIPA, 2009) reportó que el pan bolillo es uno de los tres tipos de pan más consumidos a nivel nacional. El consumo total de pan en México es de tres mil quinientos millones de kilos al año, mientras que cada mexicano consume entre 32 y 33 kilos en el mismo período. (NotiMex, 2009).<http://www.notimex.com.mx/> consultada 18-abril-2009.

Propiedades Reológicas de las Masas para Pan

Durante el proceso de panificación se llevan a cabo una serie de cambios en las propiedades físicas y químicas de la masa (Scanlon y Zghal, 2001). Entre los principales cambios fisicoquímicos se tienen cambios en las propiedades reológicas de la masa; estas pueden estar relacionadas con el volumen específico del pan y sus características texturales. Hay diferentes métodos para evaluar las propiedades reológicas de la masa y con esto predecir si la materia prima dará un pan de buena calidad (Islas y col., 2005).

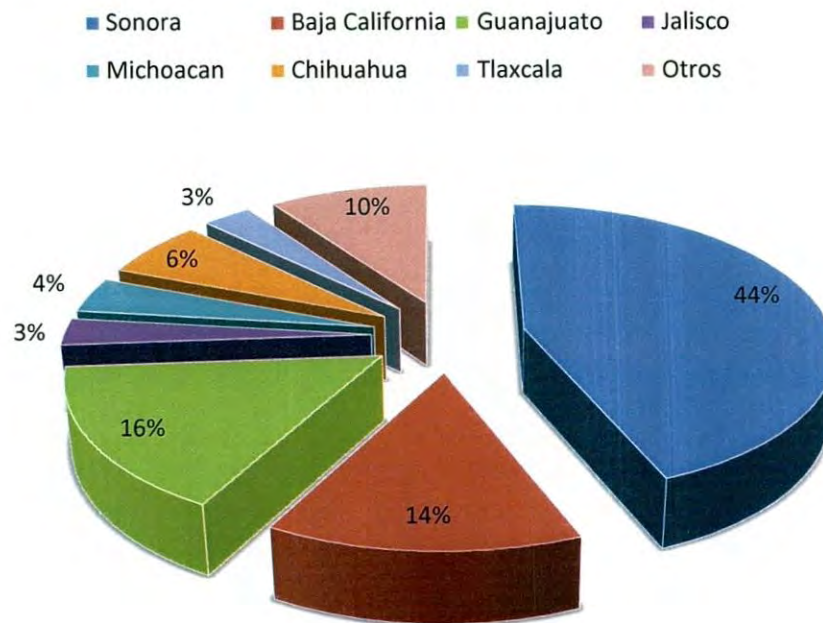


Fig. 1. Producción de trigo en algunos estados de México en el año 2009
Fuente: <http://www.siap.gob.mx/> consultada 30 de marzo de 2010

Tabla 2. Destino de las harinas en México

Tipo de harina y sémola	Producción (miles de toneladas)
Harina	4' 043
Para pan	2'477
Para galletas, tortillas, coberturas y otros	1, 062
Para pastas	504

Fuente: Datos estimados por CANIMOLT, 2009
<http://www.harina.org/contenido.php?cadid=2>

Las pruebas reológicas pueden ser utilizadas para obtener información acerca de la viscosidad y elasticidad de la masa. El trigo es único entre los cereales que presenta propiedades viscoelásticas de masa desarrolladas al mezclar su harina con Agua (Pomeranz, 1987). Estas propiedades de la masa están relacionadas con el tiempo de fermentación, el volumen de pan y la calidad del producto. Las pruebas reológicas empíricas, tales como farinógrafo, o extensógrafo, usan relativamente grandes fuerzas de deformación, las cuales causan grandes deformaciones. Por lo tanto, son idóneas para describir los cambios mecánicos y de procesamiento del material (Kenny y col., 1999). Se utiliza una fuerza de deformación y el resultado es una medida de un solo punto en unidades arbitrarias. Las pruebas reológicas fundamentales, tales como las que se llevan a cabo en un reómetro (método dinámico), usa pequeños esfuerzos para causar pequeñas deformaciones con el fin de describir las propiedades físicas o reológicas de un material. Se puede utilizar un amplio rango de esfuerzos y deformaciones para obtener medidas continuas en unidades absolutas (Blocksma, 1990; Weipert, 1992). El farinógrafo es el equipo más utilizado para medidas reológicas empíricas. Con esta prueba se puede predecir las propiedades de la masa de harina de trigo tales como la absorción de agua, tiempo de desarrollo de la masa y tiempo de estabilidad, entre otras. El reómetro es el más usado para las medidas fundamentales, con esta prueba se puede conocer la viscoelasticidad de la masa (Razmi-Rad y col., 2007).

Las propiedades reológicas están relacionadas con la proteína de la harina, específicamente las que forman el gluten, que son las proteínas de almacenamiento. La masa, como material viscoelástico, presenta propiedades intermedias entre un sólido perfectamente elástico y un fluido perfectamente viscoso. Las propiedades viscoelásticas de la masa es el resultado de una fase continua de proteínas, que en una masa completamente desarrollada rodea los gránulos de almidón. Los gránulos insertos en la red hacen más rígida la estructura y probablemente afecten las propiedades viscoelásticas mediante sus interacciones (Blokma, 1971).

El comportamiento reológico del gluten depende de las propiedades moleculares de los componentes que interactúan y del tipo de enlaces que involucra la matriz polimérica. Se reconocen a dos grupos de proteínas que forman la red de gluten; gliadinas y gluteninas. Es aceptado comúnmente que las subunidades de gluteninas son capaces de establecer enlaces disulfuro intra e intermoleculares, pero no así las gliadinas. Esta diferencia permite la formación de macro polímeros de gluteninas, que juegan un papel especial en el mantenimiento de la estructura del gluten. Las proteínas poliméricas dan fuerza y elasticidad a la masa de trigo, mientras que las gliadinas monoméricas son responsables principalmente y en parte de las propiedades de viscosidad de la masa (Shewry y col., 1992; Belton, 1999).

De acuerdo a Bushuk y MacRitchie (1989), la fuerza de la red polimérica de proteínas se atribuye a la concentración y fuerza de los enlaces entre las cadenas, la masa molecular de las regiones que interactúan, la masa molecular promedio y la distribución de masas moleculares de las proteínas constituyentes. Estudios diferentes mostraron que estos polímeros, están compuestos por agregados débiles de subunidades de gluteninas, que pueden romperse durante el amasado y liberar oligómeros y dímeros de composición definida (Weegels y col., 1996; Weegels y col., 1997; Lindsay y Skerit, 1999; Steffolani y col., 2008). Este macro polímero, se disocia en varias subunidades que son clasificadas en dos grupos: subunidades de glutenina de alto (HMW-GS, por sus siglas en inglés) y bajo (LMW-GS, por sus siglas en inglés) peso molecular. La fracción de gliadinas contiene principalmente cadenas polipeptídicas simples (monómeros) asociados por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. El solvente con que se extrae a la proteína y el sistema analítico utilizado para separar las distintas fracciones proteínicas determinan su separación y cuantificación. Los sistemas analíticos más utilizados son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en su modalidad de fase inversa, de interacción hidrofóbica y de exclusión por tamaño, así como los sistemas de electroforesis disociante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) y en capilares (SDS-CE, por sus siglas en inglés) y

los de electroforesis capilar de zona libre (FZCE, por sus siglas en inglés) (Islas y col., 2005).

Tecnología de la Panificación

La industria de la panadería se ha visto en una revolución en los últimos 150 años. Las pequeñas panaderías artesanales, que estaban presentes en cada pueblo, dieron paso a la panadería de alta tecnología industrial. Esto dio como resultado que las panaderías tuvieran una alta variedad de panes, e hizo más eficiente la producción de ellos. La productividad se convirtió en la clave del éxito. Se desarrollaron diferentes tecnologías de cocción para responder mejor a las nuevas exigencias del mercado (Decock y Cappelle, 2005). Se introdujeron a las formulaciones y al proceso, nuevos materiales e ingredientes, mientras que se generó un gran interés en la investigación que diera lugar a notables progresos en la elaboración del pan. La mejora continua en la tecnología de cocción, elaborar productos de mejor calidad, un producto más nutritivo y una contraprestación económica, fueron y son los objetivos de los investigadores de este rubro.

Los productos de panadería se dan principalmente en función de tres métodos. El primer método es el directo, donde la mezcla de los ingredientes se realiza en un solo paso. Conforme a la elección del fabricante y el equipo disponible, los ingredientes de la masa pueden ser diferentes en cada industria. El segundo método es el de masa esponja, donde la mezcla de los ingredientes se realiza en dos pasos. La levadura se prepara durante la primera etapa. La harina, levadura y cierta cantidad de agua se mezclan juntas. La mezcla se deja reposar para su desarrollo, unas pocas horas y después se mezcla con el resto de los ingredientes. El tercer método es el de Chorleywood, en el que todos los ingredientes se mezclan a velocidades altas en una batidora por pocos minutos (Giannou y col., 2003).

La tecnología de la panificación ha evolucionado continuamente a lo largo de los años, nuevos materiales; ingredientes y equipo se han introducido para la producción de pan de mejor calidad (Anon y col., 2004). El uso de masas congeladas, se ha vuelto popular en panaderías y restaurantes, ya que permite que sea más fácil y más rentable para hornear. El producto fresco de masas congeladas está disponible las veinticuatro horas del día, se reducen los costos laborales, los costos de producción son más bajos y se facilita la trasportación (Panadero y col., 2005). Las masas congeladas para productos de panadería se usan cada vez más por la oferta de valor agregado en términos de conveniencia y almacenamiento (Pepe y col., 2005).

Masas Congeladas

La tecnología de la congelación es cada vez más utilizada en la industria panadera. Esto debido a que el pan fresco, tiene vida útil corta y sufre un gran número de cambios químicos y físicos comúnmente conocidos como envejecimiento. Se han estudiado técnicas como la congelación de la masa y empaques, entre otros; con el propósito de mejorar la conservación de productos de panadería (Giannou y col., 2003), manteniendo una funcionalidad similar al pan fresco (Selomulyo y Zhou, 2007).

El procedimiento general implica, la preparación de la masa (mezclado de los ingredientes), la congelación de la masa de pan o el moldeo de las piezas de pan, almacenamiento en estado congelado, descongelación y horneado (Baier y col., 2005; Giannou y col., 2003).

Principales parámetros de calidad del pan

La calidad del pan elaborado a partir de masas congeladas depende de la formulación de la masa y de los procesos de preparación, como es el tiempo de

mezclado (Rouille y col., 2000). En particular, la calidad de productos de masas congeladas depende de su formulación, la calidad y la cantidad de levadura, los compuestos liberados por la levadura, la fermentación antes de la congelación, y los rangos de congelación-descongelación y de las materias primas (Pepe y col., 2005).

Los productos de panificación de masas congeladas tienen menor calidad que los de masas no congeladas. En general, la estructura de la masa y actividad de la levadura se deteriora con el proceso de congelación. Para mejorar la calidad de las masas congeladas diversos aditivos como gomas, proteína anticongelante de pescado y enzimas han sido utilizados para aumentar el volumen del pan y obtener una estructura más abierta de la miga (Sharadanant y Khan, 2003; Panadero y col., 2005; Huang y col., 2008b; Matuda y col., 2008).

Sin embargo, las masas congeladas todavía tienen problemas para producir panes de buena calidad (Aibara y col., 2005; Varriano-Marston y col., 1980). De acuerdo a Sahlstrøm y col. (1999), son varios los factores que juegan un papel importante en la calidad de pan producido de masas congeladas, tales como, la formulación de la masa, la calidad de la materia, la fermentación antes de la congelación, y los rangos de congelación, el tiempo de almacenamiento en congelación, entre otros. Se ha buscado mejorar el proceso de congelación utilizando varios pre-tratamientos: Pre-enfriamiento, pre-fermentado y pre-cocido de la masa. Diversos investigadores han pre-fermentado a las masas antes de congelarse, con el fin de mejorar su calidad (Baier y col., 2005).

Se considera como la máxima calidad del pan, las primeras horas después de la cocción. Los cambios que ocurren después de este tiempo, representan las etapas iniciales del fenómeno de envejecimiento, el cual, es un proceso complejo que involucra una serie de cambios fisicoquímicos (distribución de la humedad, la firmeza, propiedades texturales y opacidad) en la miga. Este proceso no resulta de la acción de microorganismos, sino a cambios principalmente en el almidón (Abu-Ghoush y col., 2008).

En el transcurso de los años, se han utilizado muchos mejoradores, para optimizar y ampliar la calidad de los atributos de pan blanco entre los que se encuentran, gomas, oxidantes, enzimas y emulsificantes, entre otros. Estos han proporcionado la calidad necesaria de los atributos que desea el consumidor en "pan fresco". No es la excepción que se deseen esas características al elaborar un pan a partir de masas congeladas (Abu-Ghoush y col., 2008).

Se observa, que después de algunas horas de horneado, la corteza del pan se humedece, se desarrolla una textura de cuero y la miga se vuelve suave y seca (Panadero y col., 2005). Por lo anterior se presentan alternativas para evitar estos inconvenientes. Uno de ellos es el uso de aditivos, modificaciones en las formulaciones y tecnologías, que ayuden a evitar los cambios adversos (Asghar y col., 2005; Rosell y col., 2001).

Principales cambios durante la congelación de las masas

La influencia de la congelación y el almacenamiento en congelación de la masa y las propiedades de cocción sobre su rendimiento ha sido el sujeto de una serie de investigaciones (Sharadanant y Khan, 2003; Panadero y col., 2005; Huang y col., 2008b; Matuda y col., 2008). Una conclusión común es que la prolongación de almacenamiento congelado de la masa da lugar a una reducción del volumen del pan debido a una serie de cambios químicos y bioquímicos que ocurren en el sistema de la masa durante este proceso, tales como; cambios en la estructura del gluten, cambios en el potencial de fermentación de la levadura y cambios en la distribución del agua, entre otros (Baier y col., 2005).

La reducción de la capacidad de fermentación de la levadura y de la retención del gas en la masa del pan, han sido señaladas como los dos factores que influyen en la reducción del volumen del pan de la masa congelada. Incluso, si una de estas dos habilidades disminuye, el volumen de la hogaza de pan no se favorece. En

particular, la capacidad de retención de gas se asocia con las estructuras de la masa del pan, en otras palabras, la expansibilidad de la masa de pan es dependiente del equilibrio de la estructura de la red de las proteínas del gluten y de los lípidos como plastificantes (Aibara y col., 2005).

Cambios en la levadura. El deterioro de la levadura en el rendimiento de masas congeladas ha sido atribuido a la pérdida de viabilidad de la misma (Baier y col., 2005). La levadura es uno de los principales ingredientes de la formulación del pan, ya que produce la mayoría del gas reflejado en el volumen del pan. Para limitar los efectos perjudiciales de la congelación en el rendimiento de la masa y durante la panificación, algunos investigadores mencionan que concentraciones próximas a 5.0% de levadura (base harina) proporcionan mejor olor, sabor y mayor volumen al pan; considerándose en ese caso a la levadura extra como aditivo (Ribotta y col., 2001; Hui y col., 2006; Huang y col., 2008a). También se han desarrollado cepas de levaduras con cryoresistencia (Tanghe y col., 2000), debido a que el tiempo de fermentación de la masa con levadura regular, es prolongado progresivamente en función del período de almacenamiento en congelación (Aibara y col., 2005).

El uso de levaduras tolerantes a la congelación mejora estas propiedades, sin embargo, su uso es limitado debido a su alto costo, ya que son patentadas. Por otro lado, la masa congelada de pan no es capaz de recuperar su volumen completamente después de la congelación, sólo mediante el uso de levaduras tolerantes (Ando y col., 2005). Aunque las técnicas de ingeniería genética de la levadura del pan podrían mejorar las características de la fermentación, la falta de datos científicos sobre la supervivencia de estas cepas en ambientes naturales, así como los efectos sobre la salud humana impide su uso comercial (Ando y col. 2005).

Cambios en el gluten. En especial, la capacidad de retención de gas es asociado con la estructura de la masa de pan (red de gluten). En otras palabras, la expansibilidad de la masa del pan dependerá del equilibrio pertinente de la estructura

de red de las proteínas del gluten y de los lípidos como plastificantes (Aibara y col., 2001).

La proteína del gluten y los gránulos de almidón resultan muy dañados por el almacenamiento a largo plazo en congelación. Varriano-Marson y col., (1980) mencionan que el agua desempeña una función importante para mantener las estructuras de la masa de pan. La pérdida de la capacidad de las proteínas del gluten para retener el agua, resulta en la separación de los gránulos de almidón y provoca el deterioro de las estructuras de la masa. Desde el punto de vista de la microestructura de la masa del pan, los gránulos de almidón están integrados firmemente a la red de gluten intacto, pero una vez que la red de gluten se ha dañado, los gránulos de almidón exhiben un patrón reticular e independiente de la red de gluten (Berglund y col., 1990). Esto coincide con los resultados de Tipples (1969), quien encontró que los gránulos de almidón dañado que se han separado, actúan como una esponja en la presencia de agua, y posiblemente adquieran el agua, extrayéndola de la red de gluten y como consecuencia produciendo más daños.

Se han propuesto dos teorías para explicar el debilitamiento de masa. Por un lado, la liberación de compuestos reductores (principalmente glutatión) de las células de levadura, los cuales rompen los enlaces disulfuro y pueden causar debilitamiento en la red de gluten (Kline y Sugihara, 1968). Otra teoría alternativa es que la red de gluten se ha dañado debido a la interrupción por la acción mecánica de los cristales de hielo durante la congelación (Varriano-Marston y col., 1980, Berglund y col., 1990). La estabilidad de la masa congelada, también se ha relacionado con las temperaturas de congelación y descongelación, (El-Hady y col., 1996; Hsu y col., 1979).

Por otro lado, Autio y Sinda (1992), han sugerido que los cambios estructurales durante la congelación y descongelación de la masa, no están asociados con la liberación de sustancias reductoras a partir de células de la

levadura. Berglund y col., (1990) demostraron que la formación de cristales de hielo en la masa no fermentada almacenada durante 24 semanas dio lugar a una interrupción de la matriz de gluten con la presentación de una red separada de los gránulos de almidón (Casey y Foy, 1995). Berglund y col., (1990), estudiaron las características ultraestructurales de masas congeladas a baja temperatura utilizando microscopía electrónica de barrido (LT-SEM, por sus siglas en inglés). Estos autores encontraron que después de 24 semanas de almacenamiento en congelación, el agua se había separado en depósitos que causan mayor agua libre y menor agua disponible para ser distribuida en toda la masa. Además, la matriz de gluten apareció menos continua y más rota, lo que explicaría la pobre retención de gas y la disminución de volumen de la hogaza de pan resultante.

Se cree que los efectos de los mejoradores de la harina oxidantes son beneficiosos debidos a la oxidación de los residuos de cisteína de las proteínas en el gluten para formar puentes disulfuro, que entrecruzan y fortalecen a la proteína (Lillard y col., 1982). El resultado en el cambio de la estructura de la proteína es la hipótesis para explicar los cambios en las propiedades de la masa (por ejemplo, mejorar la retención de gas) y el aumento de la calidad del pan horneado (Kauffman, 1986). Es decir, que la oxidación es necesaria exclusivamente para la mejora de la harina, o si dichos refuerzos se deben directamente al entrecruzamiento de proteínas, lo cual todavía es incierto. La oxidación incrementa los entrecruzamientos, propiciando los enlaces disulfuro. Algunos investigadores se vieron en la necesidad de explorar métodos para la introducción de enlaces cruzados en las proteínas del gluten, sin utilizar métodos de oxidación y la evaluación de sus efectos. El uso de la enzima transglutaminasa (proteína-glutamina-glutamil transferasa, EC 2.3.2.13) la cual cataliza reacciones de transferencia de acilo, para dar enlaces covalentes cruzados en las proteínas (Nonaka y col., 1989). Dicho "entrecruzamiento", se forma entre los residuos de lisina y residuos de glutamina el cual forma un enlace sin afectar la calidad nutricional de los residuos de lisina.

Cambios en la distribución del agua. Durante la congelación, las proporciones de agua en el alimento se modifican, por lo tanto, en la descongelación, estas proporciones son distintas a las del alimento fresco. Además, debido a la distribución modificada de la fase no congelada líquida, el contenido de solutos aumenta en el medio no congelado, causando la interrupción de metabolismo de las células de levadura y reducción de actividad de estas durante el tratamiento de masa congelada (Dodić y col., 2007).

En masa de agua-harina, la viabilidad de la levadura de panadería después de la congelación y almacenamiento depende del estado físico del sistema, el estado vítreo da la proporción más alta de supervivencia. A temperaturas por encima de su temperatura de transición vítrea (T_g , por sus siglas en inglés), los factores osmótico y cinéticos parecen regir la supervivencia de la levadura, debido a que existe una movilidad de la fase líquida durante el período de almacenamiento (Stecchini, 2002). La producción de pan dulce de masas congeladas agrega más desafíos que los de una masa congelada sin azúcar. En un sistema de masas congeladas, la viabilidad de la levadura y la tasa de supervivencia disminuyen debido a la cristalización de hielo. Sin embargo, en masas dulces congeladas, la presión osmótica por un alto nivel (alrededor del 20%) de azúcar es otro factor que entra al sistema. A medida que la presión osmótica ejercida por el azúcar aumenta, las células de levadura, se deshidratan y reducen, por lo tanto, con el tiempo se pierde la capacidad de producción de gas (Oda y Tonomura, 1993).

Se considera que los hidrocoloides forman complejos hidrófilicos con proteínas del gluten, enlazan el agua, y la migración de humedad disminuye en la masa (Ribotta y col., 2003). Los hidrocoloides, como los alginatos, carrageninas, y gelatinas, pueden ser usados para inmovilizar células de levadura y las amilasas. El empleo de tales componentes inmovilizadores en formulaciones causa la fermentación lenta y la mejor duración del producto final (Dodić y col., 2007).

Cambios en las propiedades viscoelásticas de las masas y calidad de pan. La harina y los ingredientes determinan las características reológicas de las masas y del producto final. La cantidad y calidad de las proteínas presentes en la harina afecta su comportamiento reológico (Bohem y col., 2004). Estas propiedades se ven afectadas por los procesos de congelación y descongelación. Varios estudios han sugerido que la red de gluten se ve debilitada por la reducción química producida por sustancias como el glutatión, liberado por la levadura y la cristalización de moléculas de agua durante un período largo de congelación; consecuentemente, la masa pierde el poder para conservar el gas (Autio y Sinda, 1992; Hsu y col., 1979; Ribotta y col., 2001; Varriano-Marston y col., 1980). Masas con cantidades altas de proteína de buena calidad, tienen mayor cohesividad y extensibilidad (Saxena y col., 1997).

Singh y col. (1990), observaron una relación del volumen del pan con cantidades altas de glutenina. Con la congelación, la red de proteína se ve afectada, por lo tanto, se ven modificadas las propiedades viscoelásticas de las masas. La expansibilidad de la masa de pan dependerá del equilibrio pertinente, tanto de la estructura de la red de proteínas del gluten, como de los lípidos como plastificantes (Aibara y col., 2005).

Se han reportado los efectos de las grasas sobre pan elaborado a partir de masas congeladas y no congeladas (Silva, 2000); la composición de ácidos grasos de la grasa es importante para la extensibilidad de la masa congelada, durante el horneado (Aibara y col., 2001).

Trealosa como Alternativa para Mejorar la Calidad del Pan Elaborado a partir de Masas Congeladas

La adición de trealosa podría resolver el problema de la pérdida de volumen y textura del pan después del descongelamiento. En estudios recientes se ha observado que al incluir este aditivo se obtienen buenos resultados en cuanto a la

obtención de un volumen mayor del pan, debido probablemente a la acción de este en la protección de las levaduras frente a los factores ambientales extremos (Giannou y Tzia, 2008).

La trealosa es un disacárido estable, incoloro, sin olor y es un carbohidrato no reductor, formado por dos unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos en alfa 1-1 (Fig. 2). Tiene una amplia presencia en la naturaleza, ya que se encuentra en la supervivencia de muchas formas de los organismos, incluyendo: bacterias, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas (Elbein y col., 2003). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se considera a la trealosa como un carbohidrato principalmente de almacenamiento en la célula. Se ha encontrado también, que le sirve para protegerse contra diferentes tipos de estrés, tales como la deshidratación, la congelación, y el choque de etanol así como la autólisis (Kim y col., 2008).

Las propiedades fisicoquímicas de la trealosa explican por sí solas las amplias posibilidades de aplicación biotecnológica de este azúcar. Se ha demostrado que es capaz de proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas y la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y radiación (Crowe y col., 1984; Colaco y col., 1992). Las proteínas mantienen mejor su actividad bajo estrés abiótico en presencia de trealosa, ya que ésta reemplaza al agua formando una especie de cápsula alrededor de la proteína deshidratada protegiendo así su estructura terciaria y su actividad (Lins y col., 2004). La interacción por puentes de hidrógeno entre ambas moléculas es debida a los grupos polares de la proteína y los hidroxilos del azúcar (Elbein y col., 2003).

Adicionalmente, el hecho que la trealosa sea un azúcar no reductor, a diferencia de la sacarosa, previene la reacción de Maillard, en la cual los grupos aldehído de los azúcares reducen a los grupos amino de los residuos de las proteínas, produciendo así el típico color café asociado a la degradación de las

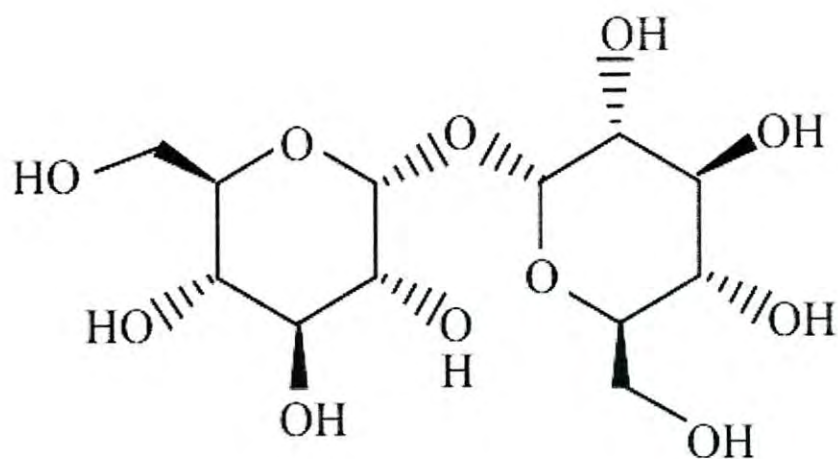


Fig. 2. Fórmula estructural de la trealosa

proteínas, reacción que se acelera a temperaturas altas (Elbein y col., 2003; Paiva y Panek, 1996). La capacidad de la trealosa de proteger a las membranas durante la deshidratación, radica en la interacción con éstas, favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando así la fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas (Crowe y col., 1984). Las evidencias sugieren que la trealosa retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las de trealosa, manteniendo a las membranas en forma de cristal líquido. La trealosa funciona en este sentido incluso mejor que la sacarosa ya que encaja entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que interactúa mediante sus hidroxilos (Crowe y col., 2001; Weisburd, 1988).

El grado de dulzura de la trealosa es de 45 comparado en una escala en la que sacarosa tiene 100 puntos, la fructosa 173 y la glucosa 74 (Richards y col., 2002). Desde 1995 en Japón se aprobó el uso de la trealosa como aditivo en alimentos de consumo humano, encontrándose actualmente presente en cientos de productos.

A continuación se enlistan los usos más comunes y prometedores del azúcar trealosa:

1. Protector de la actividad enzimática: se puede utilizar para mantener a temperatura ambiente enzimas termolábiles como ADN polimerasa, enzimas de restricción y ADN ligasa (Colaco y col., 1992).

2. Estabilizador y protector de moléculas complejas: moléculas biológicas inestables como los anticuerpos, pueden desecarse a temperatura ambiente o a 37 °C, manteniendo su actividad después de varios años de almacenamiento (Roser y Colaco, 1993). Sustitutos de sangre y hemoglobina se han conservado como liposomas y desecado en frío manteniendo gran parte de su actividad aún después de años de almacenamiento a temperatura ambiente, lo cual promete abaratar

enormemente los costos de almacenamiento en nitrógeno líquido y traslado (Weisburd, 1988; Brumfiel, 2004).

3. Aditivo de diversos alimentos: se puede emplear en alimentos desecados o procesados como frutos y legumbres que mantienen mucho mejor sus aromas y propiedades organolépticas. Recientemente la empresa Cargill ha promovido el uso de este azúcar en lugar de otros aditivos en cortes de carne y embutidos, para mantener por más tiempo sus propiedades y sabor (Kidd y Devorak, 1994).

4. Sustituto de azúcar: puede emplearse en panadería y en confitería, en combinación con la sacarosa, compensando la reducción en dulzor con la mejor conservación de las propiedades de la masa horneada, sobre todo en repostería que debe mantenerse en congelación. Se ha demostrado que el organismo humano tolera hasta 50 g diarios sin causar problemas digestivos (Richards y col., 2002).

5. Preservador de células, tejidos y órganos: células, tejidos e incluso órganos se pueden mantener desecados o congelados en presencia de trealosa, lo cual mejora su supervivencia en comparación con otras sustancias (Eroglu y col., 2000; Guo y col., 2000). El principal obstáculo para ampliar su uso con estos fines ha sido el de lograr introducir con mayor eficiencia al disacárido dentro de las células y tejidos (Crowe y col., 2001).

6. Osmoprotector de plantas ornamentales: de 50 a 100 mM de trealosa en solución acuosa en el florero prolonga la vida después del corte de tulipanes y gladiolas, ya que contribuye a retardar la senescencia debida a la pérdida de agua por transpiración (Iwaya-Inoue y Takata, 2001; Otusbo y Iwaya-Inoue, 2000). Es predecible que plantas ornamentales que acumulen trealosa endógena mostrarán una mayor duración después del corte que cuando se adiciona al florero, por lo cual será importante obtener plantas transgénicas con este fin.

7. Osmoprotector en plantas transgénicas: la producción de plantas transgénicas que acumulan trealosa ha permitido incrementar la tolerancia de las mismas a la sequía, la salinidad y el frío (Garg y col., 2002; Avonce y col., 2004).

8. Marcador de selección en la producción de plantas transgénicas: el gen *AtTPS1* de *A. thaliana* que codifica la enzima TPS1, cuando se sobreexpresa en esta planta, es capaz de conferir insensibilidad a la glucosa en semillas y tejidos bajo cultivo *in vitro* que de otra forma se ven inhibidos por este monosacárido para germinar, proliferar y diferenciarse (Avonce y col., 2004; Leyman y col., 2004). Esto abre las posibilidades de poder usar este gen como un gen de selección durante el proceso de transformación genética, utilizando como medio selectivo a la glucosa (Leyman y col., 2004).

9. Uso en industria de cosméticos: la trealosa atrapa y reduce la liberación de malos olores de la piel en humanos hasta en un 70 %, lo cual hace que sea factible adicionarla en cremas faciales, corporales o en desodorantes (Higashiyama, 2002).

10. Usos médicos y nutraceuticos: se está explorando el papel de la trealosa en la disminución de los síntomas de enfermedades como la Corea de Huntington y en la osteoporosis. En el primer caso, la trealosa evitaría la formación de agregados proteínicos poli glutamínicos en el cerebro (Katsuno y col., 2004), mientras que en el segundo estudio, el consumo de trealosa redujo la degeneración de los huesos en modelos de ratones hembra en los que se eliminaron los ovarios, aunque no se conoce con detalle el mecanismo implicado (Higashiyama, 2002).

La trealosa es utilizada en varios productos alimenticios, por su alta absorción de humedad, como aditivo para reducir la dulzura, evita reacciones de encafecimiento, además de ser un protector de macromoléculas. Es ampliamente utilizada en panadería, bebidas, confitería, o los cereales, para reducir la dulzura y la absorción de la humedad y evitar las reacciones de oscurecimiento y retardar la retrogradación del almidón (Bar, 2000). También se utiliza en las operaciones de

secado de huevos, verduras, frutas o productos marinos, ya que muestra un aumento de la eficiencia en la preservación de la estructura y función de las moléculas de los alimentos (Roser y Colaco, 1993). Aunque se ha obtenido la aprobación como aditivo de alimentos seguros, se considera un ingrediente alimentario y su papel crioprotector ha sido suficientemente estudiado en la elaboración de productos de pescado congelados (surimi), postres de gelatina, helados y tofu congelado. Sin embargo, poco se ha explorado en la industria de panadería (Fuchigami y col., 2002).

En estudios recientes sobre la inclusión de la trealosa en productos de panadería con masas congeladas, se considera un eficaz crioprotector, debido a que reduce el punto de congelación, ayudando a la protección contra lesiones por deshidratación y desnaturalización de las proteínas y levaduras (Gancedo y Flores, 2004). Además, puede mejorar la asimilación de la glucosa, fructosa, y sacarosa en células de levadura, con la resultante de la mejora en la capacidad de fermentación (Elbein y col., 2003; Gancedo y Flores 2004; Kim y col., 2008; Giannou y Tzia, 2008).

De acuerdo a Giannou y Tzia (2008), la trealosa puede mejorar el volumen del pan y las características de textura en proporción a su contenido en la masa; a una concentración de 200 mg/kg de trealosa adicionada a la masa, se observan los mejores resultados en cuanto a volumen y textura de pan. Huang y colaboradores (2008) encontraron que la adición de la trealosa exógena mejora la supervivencia de la levadura y la producción de CO₂ en masas congeladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción General de la Investigación

En la Fig. 3 se presenta un diagrama general del trabajo desarrollado en esta investigación, el cual será descrito en las siguientes secciones.

Materia Prima

Se utilizó harina comercial Marca Sansón (Molino La FAMA. S.A). El resto de los ingredientes fueron: sal (Mar de Cortés, Sales del Valle S.A. de C. V.), grasa vegetal (Inca, Alimentos Capullo, S. de R. L de C. V.), levadura instantánea (Nevada, SAFMEX S.A. de C.V./FERMEX S.A. de C.V.) y mejorante para pan blanco (Magimix 40, SAFMEX S.A. de C.V./FERMEX S.A. de C.V.), trealosa (D-(+)- trealosa deshidratada, 99% de pureza proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* purificada por cromatografía de intercambio iónico y de calidad alimentaria (marca Sigma).

Evaluación de la Calidad de la Harina

Análisis químico

Con el fin de predecir la vida útil debido a la humedad, la calidad de la harina por el contenido de cenizas y la funcionalidad de la calidad del producto debido a la proteína de la harina de los productos terminados. A la harina se le realizó un análisis químico proximal de acuerdo a las técnicas de la A.A.C.C (2000): contenido de humedad (método 44-40), contenido de cenizas (método 08-03) y contenido proteico (método 46-13), utilizando un determinador de nitrógeno (marca LECO, modelo FP-528, MI, USA) y el factor de conversión de nitrógeno a proteína fue 5.7.

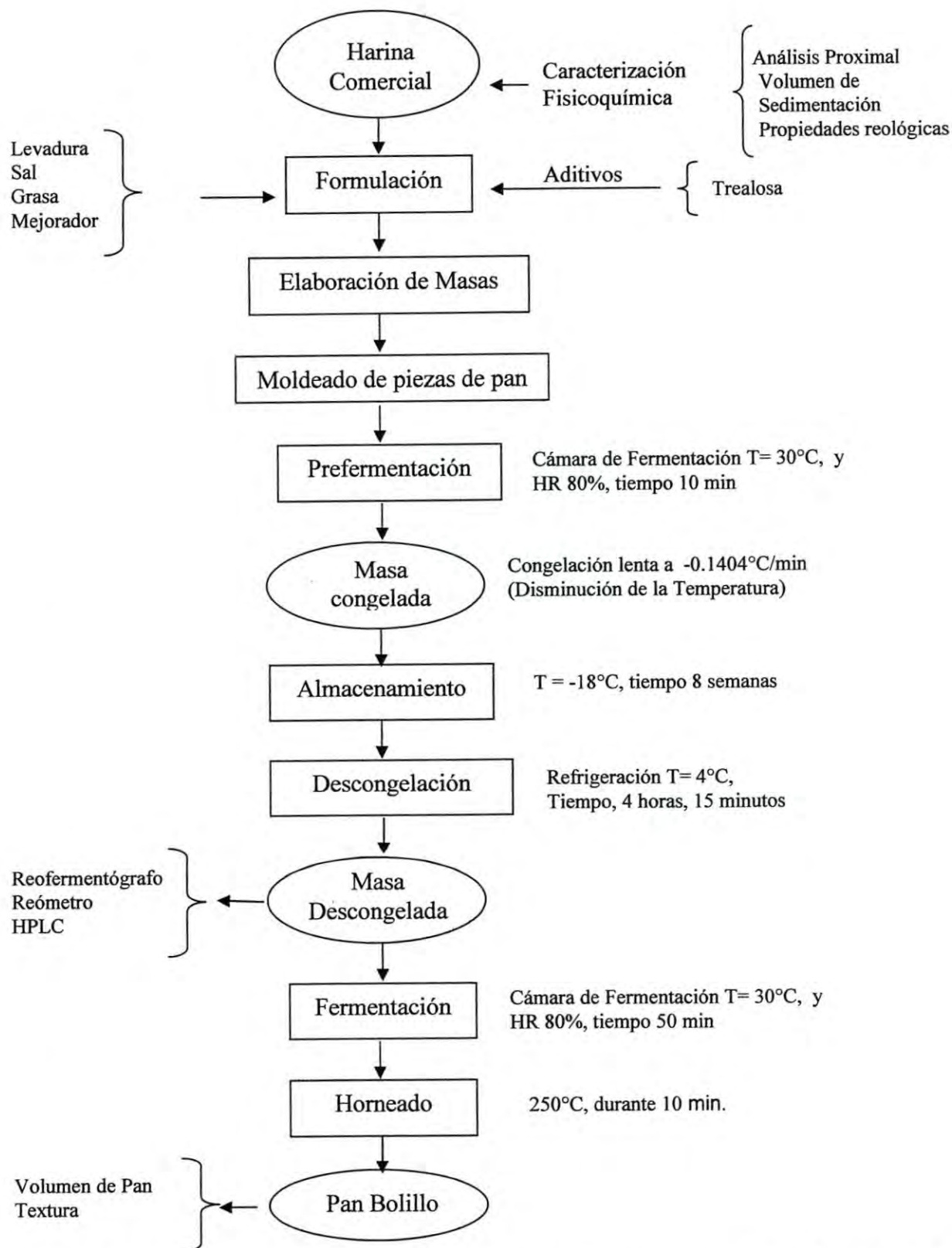


Fig. 3. Diagrama de flujo de la investigación para elaborar pan tipo bolillo a partir de masas congeladas, adicionándoles trehalosa

Volumen de sedimentación (Zeleny)

Esta prueba predice la funcionalidad de la harina, debido a que da idea del contenido proteico y calidad de gluten, adecuado para pan, de manera rápida y eficiente. Se utilizó el método 56-61A de la A.A.C.C. (2000).

Pruebas Reológicas

Farinogramas. Predetermina la cantidad de agua necesaria para obtener la consistencia ideal de la masa, el tiempo de amasado para una masa bien desarrollada y la estabilidad de la masa. Se utilizó el farinógrafo (marca Brabender Instruments, tipo 810143, South Hackensack, NJ) y de acuerdo al método farinográfico 54-21 de la A.A.C.C. (2000).

Alveogramas. Con la finalidad de simular y predecir los efectos de la fermentación, sobre la masa, se miden su extensibilidad y su tenacidad, mediante la inyección de aire a través de esta. Los alveogramas se realizaron con el alveógrafo (Chopin Instruments, Villeneuve-La-Garenne, France) y de acuerdo al método 54-30 A.A.C.C. (2000). El alveógrafo registró la fuerza general (W) y las relaciones de la elasticidad (P/L y P/G) de las harinas de trigo, donde: W es fuerza de panificación o trabajo de deformación de la masa; P es la tenacidad, presión máxima necesaria para la deformación; L o G es la extensibilidad (longitud de la curva).

Reofermentogramas. Para conocer los cambios durante la fermentación, se utilizó un reofermentómetro (marca Chopin, tipo Rheo F3) y el método propuesto en el manual del equipo. Los ingredientes se mezclaron en la mezcladora del Alveógrafo (Chopin Instruments, Villeneuve-La-Garenne, France) y se homogenizaron de acuerdo al método alveográfico 54-30A de la A.A.C.C. (2000). Se utilizaron 315 g de masa, con una pesa de 2 kg, durante 3 horas a temperatura constante (28.5°C). Se obtuvo la altura máxima de desarrollo de la masa (Hm, mL), así como la producción y retención de CO₂.

Formulación Estándar para Pan Tipo Bolillo

En la Tabla 3 se muestran las formulaciones utilizadas en esta investigación.

Elaboración de Masas Congeladas

A partir de la formulación descrita anteriormente, el proceso para elaborar las masas fue el siguiente: se mezclaron los ingredientes (mezcladora marca MFG, Lincoln, NE, USA), se pesaron las masas (empleando 50 g), se bolearon y reposaron (5 minutos), posteriormente se hizo una fermentación corta (10 minutos), para luego congelarlas (Magaña-Barajas, comunicación personal, 2010).

Congelación

Se utilizó un método de congelación lenta. Todas las muestras se introdujeron en charolas de plástico dentro de bolsas de polietileno con zipper, luego se colocaron en un congelador, disminuyendo la temperatura a una velocidad de $-0.1404^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, por debajo de 0°C (Ribotta y col., 2001; Ribotta y col., 2003; Karaoğlu y col., 2008).

Almacenamiento

Las masas congeladas y las formadas en panes, se almacenaron por períodos de tiempo de 0, 2, 4, 6 y 8 semanas (Kenny y col., 1999), bajo condiciones de congelación (-18°C) (Ribotta y col., 2001; Ribotta y col., 2003; Karaoğlu y col., 2008). Cada dos semanas se tomaron muestras de masas congeladas, para los diferentes análisis.

Tabla 3. Formulaciones para pan bolillo típico y de masas congeladas

Ingrediente	Masa de pan fresco	Masa congelada para pan tipo bolillo
Harina (%) ¹	100	100
Levadura (%)	2	3
Grasa (%)	0.5	5
Sal (%)	1.5	1.5
Mejorante (%)	2	2
Aditivo (mg/kg)	-	0, 200 y 400

¹Porcentaje en base harina

Fuente: Magaña- Barajas, comunicación personal.

Descongelación

Las muestras de masas congeladas y panes moldeados congelados se descongelaron cada dos semanas en dos etapas: Primero se colocaron las muestras a 4°C en un refrigerador (Marca Whirlpool, Modelo ETI8NKXANO3, Whirlpool Corporation, Benton Harbor Michigan, USA) durante 4 horas y 15 minutos, posteriormente se llevaron a la cámara de fermentación a una temperatura de 30°C y 85 % de humedad relativa (Kenny y col., 1999; Karaoğlu y col., 2008).

Fermentación

Las muestras descongeladas se colocaron en una cámara de fermentación (marca National Meg.Co. Lincoln, NE) a 30°C, 80% humedad relativa por 50 min (Kenny y col., 1999; Baier y col., 2005; Huang y col., 2008a).

Horneado

A partir de la masa congelada, descongelada y fermentada, se procedió al horneado en un horno eléctrico (Partlow marca National Meg.Co. Lincoln, NE), a 250°C durante 10 minutos, luego el pan se enfrió, a temperatura ambiente durante dos horas. Todas las formulaciones utilizadas siguieron el mismo procedimiento (Kenny y col., 1999).

Evaluaciones en Masas Congeladas

Reofermentogramas

Las masas descongeladas, se llevaron a un reofermentómetro, por el método descrito anteriormente en la sección de calidad de harina, con la finalidad de observar si hubo o no cambios en la fermentación después del congelamiento y descongelamiento.

Cromatografía líquida de exclusión molecular

Se utilizó un sistema de HPLC para estudiar los cambios en las proteínas. Esta prueba se realizó según la metodología propuesta por Bean y col., en 1998 para proteína polimérica soluble. Para la preparación de la muestra, se pesaron 250 mg de harina o 300 mg de masa. La proteína polimérica soluble se extrajo con propanol al 50%, (la fracción insoluble se reservó para cuantificarla por determinación de nitrógeno en un equipo marca LECO, como se describió anteriormente, en la sección calidad de harina). Para la técnica cromatográfica de HPLC de exclusión molecular, se utilizó un equipo Varian ProStar (Modelo 410), con un detector de ultravioleta (uv) de arreglo de diodos a una longitud de onda de 210nm y una columna, (Biosep-SEC-S-S4000). Las condiciones del análisis fueron: Fase móvil acetonitrilo, con ácido trifluoroacético 0.1%, y una solución de agua con ácido trifluoroacético al 0.1%. A una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y temperatura de 40°C. Se obtuvieron cromatogramas donde los picos obtenidos representan, las fracciones de proteína polimérica soluble, gliadinas y albúminas y globulinas.

Características viscoelásticas

Método dinámico. Las muestras de masa descongelada y fermentadas, se colocaron en una bolsa de polietileno y sellada para evitar la deshidratación, a temperatura ambiente, durante 10 min, para su medición en el reómetro, (Magaña-Barajas, 2007). Se utilizó un reómetro (marca Rheometrics Scientific, modelo RSF III, Piscataway, NJ, USA) de deformación controlada, equipado con platos paralelos de 25 mm de diámetro y un peltier para mantener la temperatura de la muestra a 25°C. Los barridos oscilatorios fueron medidos a 0.1% de deformación bajo el régimen lineal de viscoelasticidad, en un rango de frecuencia de 0.1 a 100 rad/seg y una separación entre platos de 2mm. Se midieron, el módulo de almacenamiento (G' , Pa), módulo de pérdida (G'' , Pa) y la tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$). Estos parámetros fueron obtenidos usando el software de control (RSI Orchestrator, Rheometrics Scientific) (Magaña-Barajas, 2007).

Evaluación de la Calidad del Pan Tipo Bolillo

Una vez que el pan tipo bolillo de masas congeladas, se descongeló, fermentó y horneó; se enfrió durante 2 horas, luego se le hicieron las siguientes determinaciones (como se describió en la sección de materiales y métodos).

Pesa

Después de enfriarse, los panes tipo bolillo, se pesaron en una balanza granataria, (Marca Ohaus, Triple Beam 700/800 series, Poland), para posteriormente calcular su volumen específico.

Volumen del pan

Se determinó el volumen del pan tipo bolillo, con un medidor de volumen (marca National MFG Company, modelo PUP) calibrado a un volumen de 400 cm³ de semilla de nabo.

Volumen específico

El volumen específico del pan se obtuvo de la relación volumen/peso.

Textura del pan

Se evaluó la textura del pan, a las 2 horas de haberse horneado de acuerdo al método 74-09 (A.A.C.C., 2000) y utilizando la máquina de prueba universal (Instron Corp, modelo 4465, U.S.A.). La característica del pan a medir fue la firmeza, como máxima fuerza.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño de experimentos factorial con dos variables: concentración de trealosa (0, 200 y 400 ppm) y tiempo de almacenamiento (0, 2, 4, 6 y 8 semanas). Con el fin de determinar el efecto de estos factores sobre las diferentes

determinaciones, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de confiabilidad del 95.0%. Para ver la diferencia entre tratamientos específicos se utilizó la prueba de Tukey. Además, se llevaron a cabo correlaciones simples (r) entre las distintas determinaciones. El análisis estadístico se realizó en el software Statistical Analytical System Software (SAS Institute, Inc. Cary, NC, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad de la Harina

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica y reológicas de la harina utilizada en esta investigación. De acuerdo a Zanoni y col., (1993), una harina de buena calidad para panificación, presenta características fisicoquímicas de 14.5% de humedad, 13% de proteína, 0.55% de cenizas y pH entre 5.7- 6.1. En el caso del contenido de humedad, la harina evaluada presentó valores más bajos (11%) que lo que muestra la literatura (14%) (Zanoni y col., 1993; Kenny y col., 1999; Inoue y col., 1994). Esto posiblemente puede deberse a la diferencia en la temperatura del medio ambiente y humedad relativa de la región donde se hizo cada estudio. En el caso de los valores para el contenido de cenizas, los obtenidos en este estudio (0.89%), estuvieron por encima de los consultados en la literatura 0.55% (Zanoni, 1993) y (0.52%) (Inoue y col., 1994). Esto posiblemente se debió a que la harina comercial utilizada, estaba fortificada con minerales.

El contenido de proteína obtenido en esta harina (13.85%) fue muy similar a los reportados en la literatura (13%) (Zanoni y col., 1993; Kenny y col., 1999). Esto podría indicar que la harina utilizada en este estudio, fue de buena calidad, ya que se obtuvieron parámetros fisicoquímicos muy similares. El contenido de proteína se correlaciona con casi todas las propiedades de la harina, como requerimiento de agua para el amasado, tolerancia al amasado, características de manejo, requerimiento de oxidación, volumen de pan, y aún las características de la miga (Pomeranz, 1987).

Tabla 4. Características fisicoquímicas y reológicas de la harina

Característica	Promedio
Análisis Químico	
Humedad (%)	11.40 ± 0.07 ²
Cenizas ¹ (%)	0.89 ± 0.05 ²
Proteína ¹ (%)	13.85 ± 0.23 ²
Sedimentación (mL)	24.25 ± 0.38 ²
Farinogramas	
Absorción de agua (%)	64.07 ± 0.11 ²
Estabilidad (min)	3.75 ± 0.35 ²
Tiempo de desarrollo (min)	9.5 ± 0 ²
Alveogramas	
Trabajo (W) (J)	340.5 10 E -4 ± 0.71 ²
Extensibilidad (P/L) (mm)	1.49 ± 0.01 ²
Índice de hinchamiento(P/G) (mmH ₂ O)	5.91 ± 0.20 ²

¹Base seca²Desviación estándar

En cuanto a las propiedades reológicas de la harina utilizada, se obtuvo una absorción de agua de 64%. Kenny y colaboradores (1999) obtuvieron un 62% y una estabilidad al mezclado de 7 min. Mientras que en este estudio se obtuvieron 3.7 min. Esto puede deberse a que la harina comercial utilizada, no era de una variedad determinada de trigo, si no mezclas. Se observa que la harina utilizada en este estudio, fue ligeramente tenaz, debido a que la razón P/L fue mayor que uno.

Propiedades Fermentativas (Producción de CO₂)

En la Tabla 5 se presenta el ANDEVA del efecto de la concentración de trealosa (CT) y tiempo de almacenamiento (TA) sobre la producción total de CO₂, retención de CO₂ y desprendimiento de CO₂ de las masas congeladas. El TA afectó muy significativamente ($p < 0.01$) a la retención de CO₂; mientras que para el desprendimiento de CO₂, la CT, TA y la interacción de CT*TA también afectó muy significativamente ($p < 0.01$).

En la Fig. 4 se muestra el efecto del TA sobre la producción total de CO₂. Se observó una disminución de la producción de gas conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento. Después de los 42 días de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas. En la Fig. 5 se observa el efecto del TA sobre la retención de CO₂. Se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, la retención de CO₂ disminuye.

En la Fig. 6, se muestra el efecto de la interacción de TA y CT sobre el desprendimiento de CO₂. Se puede observar que durante el TA hay un aumento en el desprendimiento de CO₂, sin embargo, en muestras donde se añadió trealosa este efecto negativo es menor, ya que hay una tendencia a disminuir el desprendimiento en masas con 400 mg/kg de este aditivo. De acuerdo a lo reportado por El-hady y colaboradores, (1996), la depresión en la producción total de gas incrementa durante el tiempo de almacenamiento en congelación.

Tabla 5. Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre producción total, retención y desprendimiento de CO₂ en masas congeladas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Valor de F		
		Producción total de CO ₂	Retención de CO ₂	Desprendimiento de CO ₂
Concentración de Trealosa (CT)	2	0.79NS	0.83 NS ¹	56.06 ^{**2}
Tiempo de Almacenamiento (TA)	4	441.27 ^{**}	441.81 ^{**}	123.46 ^{**}
CT*TA	8	1.59NS	1.57 NS	22.09 ^{**}
Error	15			
Total	29			

¹NS = No significativo a un nivel de p= 0.05 (p>0.05)

^{2**}= Significativo a un nivel de p=0.01 (p < 0.01)

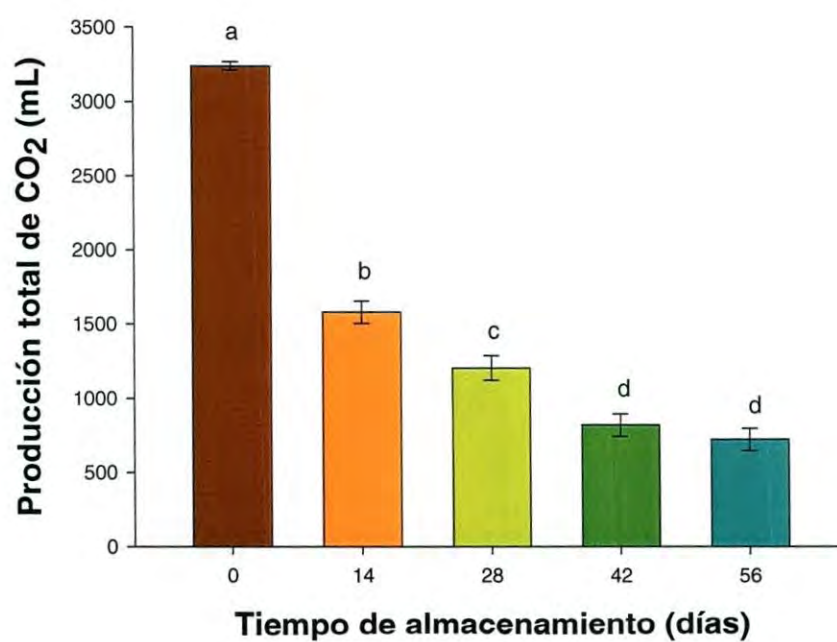


Fig. 4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la producción total de CO₂ de masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Resultados marcados con la misma letra, no representan diferencias estadísticas significativas a $p=0.05$ ($p<0.05$).

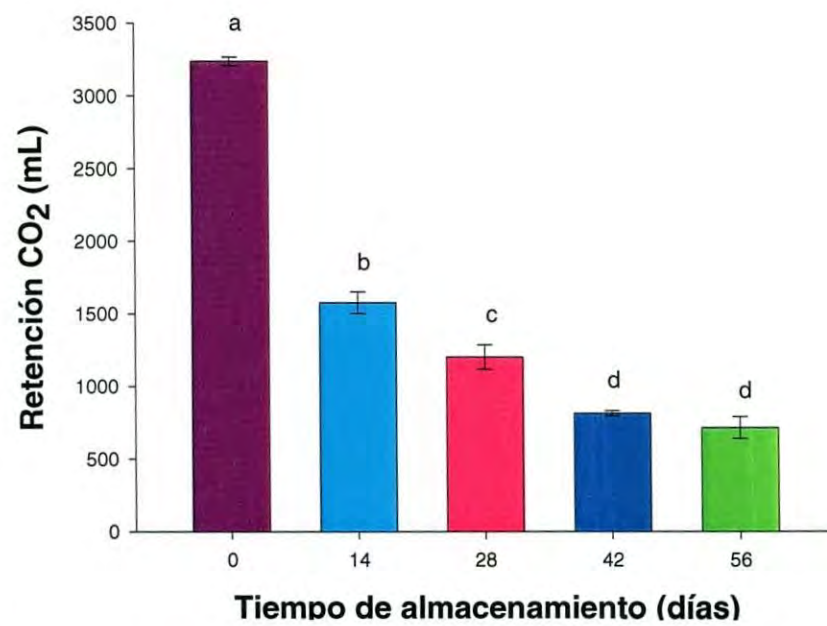


Fig. 5. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el volumen de retención de CO₂ de masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Resultados marcados con la misma letra, no representan diferencias estadísticas significativas a $p=0.05$ ($p<0.05$).

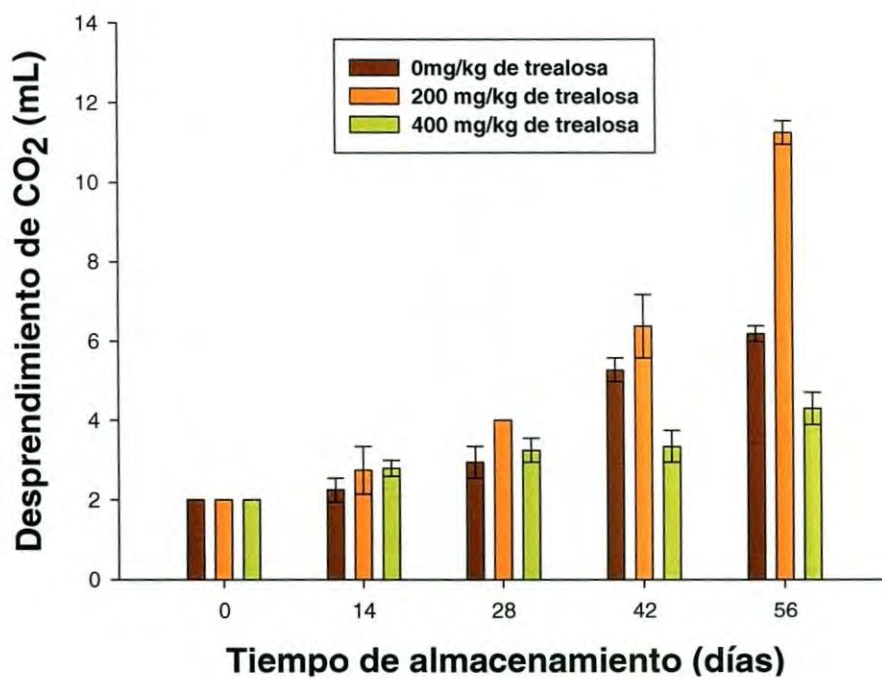


Fig. 6. Efecto de la concentración de trealosa y el tiempo de almacenamiento sobre el desprendimiento de CO₂ en masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Sin embargo, al hacer una comparación de medias, para la retención de CO₂, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre todos los tratamientos. Por otro lado, si hubo diferencias con el tiempo de almacenamiento, excepto entre los 42 y 56.

Para el desprendimiento de CO₂, en los valores promedios obtenidos, se observó una diferencia estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre todos los tratamientos. Durante el tiempo de almacenamiento se presentaron diferencias a partir de los 42 días.

El-hady y col., (1996), también reportaron que la producción total de gas disminuye de 1700 a 780 mL cuando aumenta el período de almacenamiento, siendo mayor el efecto después de cuatro semanas de almacenamiento. Esto concuerda con la disminución en la producción de gas en este estudio que fue de (3235-713 mL), durante 8 semanas de almacenamiento. Sin embargo, la producción total, fue mayor que la reportada en la literatura. Esto pudiera deberse al efecto de la trealosa, debido a que hubo un efecto significativo en la retención de CO₂.

La disminución de producción de CO₂, pudo deberse a que ocurrió un daño a la levadura durante el proceso de congelación, o durante el almacenamiento bajo esas condiciones, por lo tanto, hubo una cantidad limitada de levaduras disponibles para la producción de gas (Lu y Gran, 1999). También posiblemente pudo deberse a una disminución de la fuerza de la red de gluten que limitaría la expansión de la masa, o pudo deberse a una ruptura en la red de gluten provocando una fuga de CO₂. Sin embargo, hubo una disminución en el desprendimiento de gas, estadísticamente muy significativo ($p < 0.001$), principalmente a una concentración de 400 mg/kg. Esto coincide con Huang y col., (2008a), quienes reportaron que la trealosa tiene una influencia positiva sobre la producción de CO₂.

Es bien conocido que la trealosa intracelular protege a la levadura del daño por congelamiento (Crow y col., 1996; Diniz-Mendes y col., 1999). Se ha sugerido

que la trealosa exógena también protege a la levadura del daño por congelación en un sistema de masa congelada. El mecanismo de la protección podría ser en parte, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre la pared celular de la levadura y la trealosa exógena (Salas-Mellano y Chang, 2003). Crow y col., (1996), sugirieron que la capa de trealosa que interacciona con la levadura podría reducir la formación de hielo intracelular, durante la congelación de la masa y por lo tanto aumentar la tolerancia de la levadura durante la congelación.

Se considera, que la crioprotección de la trealosa, se debe a la prevención de la agregación de proteínas y rompimiento de la membrana durante la congelación y desecación. Esto se ha relacionado con el hecho que la trealosa presenta una temperatura de transición vítrea más alta que otros disacáridos, lo que implica un mayor contenido de agua en la transición (Angell, 1991; Ding y col., 1996; Lerbret y col., 2007). Se ha reportado la evidencia de que la trealosa es más eficaz que la maltosa y sacarosa en la obstrucción del proceso de formación de hielo, ya que reduce la cantidad de agua congelable por medio de un efecto mayor de la desestructuración de la red tetraédrica de los puentes de hidrogeno del agua (Branca y col., 1999).

A una concentración mayor de 9% de trealosa, la producción de CO_2 decrece. Esto sugiere que hay un efecto perjudicial de la trealosa más allá de este porcentaje, lo que podría deberse a menor cantidad de agua disponible para la levadura (presión osmótica elevada, así como una menor actividad de agua), después de la descongelación. Las investigaciones futuras en este sentido son necesarias e interesantes. Esto puede tener un impacto significativo en la industria panadera moderna, donde producen panes a partir de masas congeladas.

Propiedades Viscoelásticas

En la Fig.7 se presenta el efecto del tiempo de almacenamiento y concentración de trealosa sobre el módulo de elasticidad G' , a una frecuencia de 5

rad/seg. A esta frecuencia se considera la parte de la grafica de deformación del material que es lineal (en el Anexo A, se encuentran los barridos de frecuencia entre 0.1 y 100 rad/seg para las masas a diferentes concentraciones de trealosa y tiempo de almacenamiento, para G'). Se muestra una tendencia de la masa a perder elasticidad por efecto del tiempo de almacenamiento en congelación, sin embargo, por el efecto de la trealosa este es menor. En la Fig. 8 se presenta el efecto del tiempo de almacenamiento y concentración de trealosa sobre el módulo de viscosidad G'' , a una frecuencia de 5 rad/seg (en el Anexo A, se encuentran los barridos de frecuencia entre 0.1 y 100 rad/seg para las masas a diferentes concentraciones de trealosa y tiempo de almacenamiento, para G''). Se observa una tendencia a disminuir el módulo de viscosidad, esto indicaría que la masa está siendo más viscosa por efecto del tiempo de almacenamiento, sin embargo, por la concentración de trealosa se hace un efecto menor.

En la Fig. 9 se presenta el efecto del TA sobre el ángulo $\text{Tan } \delta$. A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, hay una tendencia a aumentar el ángulo, es decir, la masa se está haciendo más viscosa, por efecto de la congelación y descongelación. El ángulo de fase representa una medida simple de las naturalezas elástica y viscosa del material. Esta propiedad se expresa como la tangente de pérdida ($\text{Tan } \delta$), es decir, la relación entre los módulos de pérdida y almacenamiento (G''/G'). Cuando el ángulo de fase se aproxima a cero, el material se comporta más como un sólido elástico (en el Anexo A, los barridos de frecuencia entre 0.1 y 100 rad/seg para las masas a diferentes concentraciones de trealosa y tiempo de almacenamiento, para $\text{Tan } \delta$). Por el contrario, si δ se aproxima a 1.57 rad (90°), el material se comporta similar a un líquido newtoniano (Faubion y col., 1985 Goodwin y Hughes, 2000). Una disminución en el $\text{Tan } \delta$ indica que la masa se está haciendo más elástica. Autio y Sinda (1992), reportaron que una disminución de la elasticidad en la masa está relacionada con la red de gluten, esto puede ser atribuido a una pérdida de los enlaces que forman el polímero.

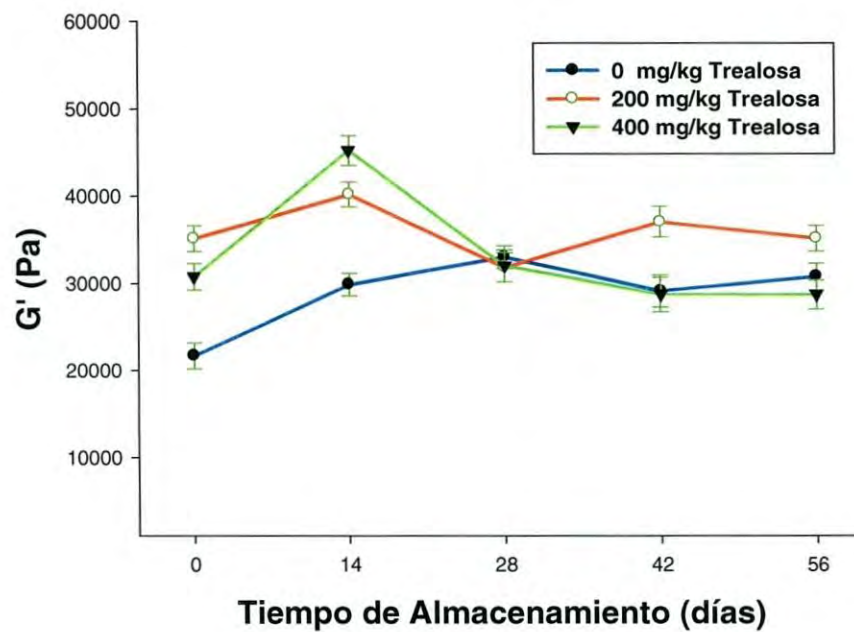


Fig. 7. Efecto del tiempo de almacenamiento y la concentración de trealosa sobre el módulo de elasticidad (G') (Las barras indican la desviación estándar).

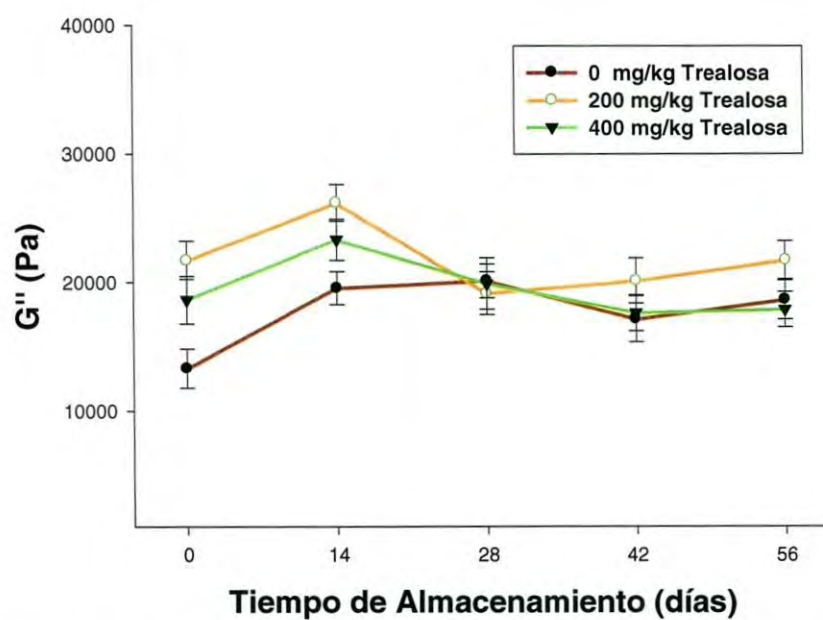


Fig. 8. Efecto del tiempo de almacenamiento y la concentración de trealosa sobre el módulo de viscosidad (G'') (Las barras indican la desviación estándar).

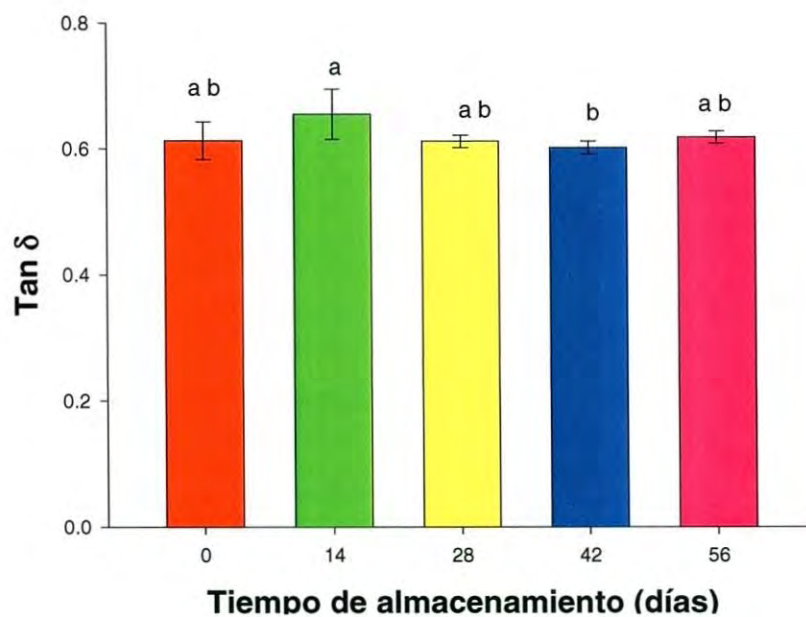


Fig. 9. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el ángulo de fase de masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Resultados marcados con la misma letra, no representan diferencias estadísticas significativas a $p=0.05$ ($p<0.05$).

En la Fig. 10 se presenta el efecto de la trealosa sobre el ángulo de fase. A medida que aumenta la CT hay una tendencia a mantenerse el $\text{Tan } \delta$. Esto posiblemente podría atribuirse a que la trealosa está interviniendo en los enlaces que forma la red de gluten. Sin embargo, los valores obtenidos no fueron significativos estadísticamente. Se necesitan hacer pruebas con concentraciones mayores de trealosa, para ver efectos significativos.

Cambios en las Proteínas

En la Tabla 6 se presenta el ANDEVA del efecto de la Trealosa (CT) y tiempo de almacenamiento (TA) sobre la proteína polimérica soluble, gliadinas y albuminas-globulinas de masas congeladas.

El TA afectó estadísticamente muy significativamente ($p < 0.01$), para la proporción de la proteína polimérica soluble (PPS); mientras que para las gliadinas (GLI), la CT afectó significativamente ($p < 0.05$) y TA afectó muy significativamente ($p < 0.01$). En el caso de las albúminas y globulinas (AYG) la CT, TA y la interacción de CT*TA afectaron muy significativamente ($p < 0.01$). Los Cromatogramas obtenidos se presentan en el Anexo B.

En la Fig.11 se presenta el efecto del TA sobre la PPS. A medida que incrementa el tiempo de almacenamiento, la concentración de PPS aumenta. Se observó también una tendencia a disminuir la PPS cuando aumenta la concentración de trealosa. Los Cromatogramas obtenidos se presentan en el Anexo B.

En la Fig. 12 se presenta el efecto del TA sobre las GLI. A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, la concentración de GLI disminuye.

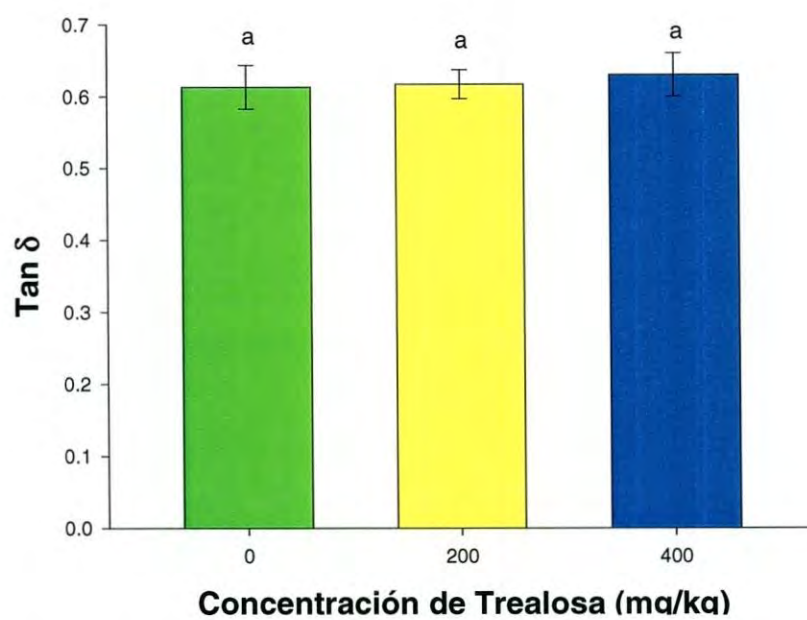


Fig. 10. Efecto de la concentración de trealosa sobre el ángulo de fase de masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Resultados marcados con la misma letra, no representan diferencias estadísticas significativas a $p=0.05$ ($p<0.05$).

Tabla 6. Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre la proporciones de proteína polimérica soluble, gliadinas y albuminas-globulinas de masas congeladas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Valor de F		
		PPS ¹	GLI ²	AYG ³
Concentración de Trealosa (CT)	2	0.84NS ⁴	9.05 ^{*5}	30.51 ^{**6}
Tiempo de Almacenamiento (TA)	4	8.73 ^{**}	26.32 ^{**}	48.58 ^{**}
CT*TA	8	1.36NS	0.66NS	11.02 ^{**}
Error	45			
Total	59			

¹ PPS= Proteína polimérica soluble

² GLI= Gliadinas

³ AYG= Albúminas y globulinas

⁴ NS = No significativo a un nivel de $p=0.05$ ($p < 0.05$)

^{5*} = Significativo a un nivel de $p=0.05$ ($p < 0.05$)

^{6**} = Significativo a un nivel de $p=0.01$ ($p < 0.01$)

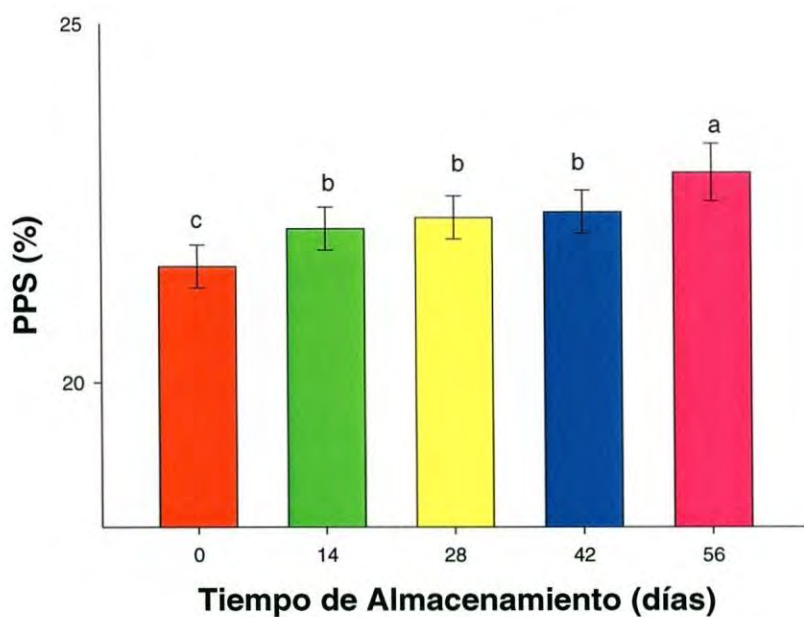


Fig. 11. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el porcentaje de proteína polimérica soluble de masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Resultados marcados con la misma letra, no representan diferencias estadísticas significativas a $p=0.05$ ($p<0.05$).

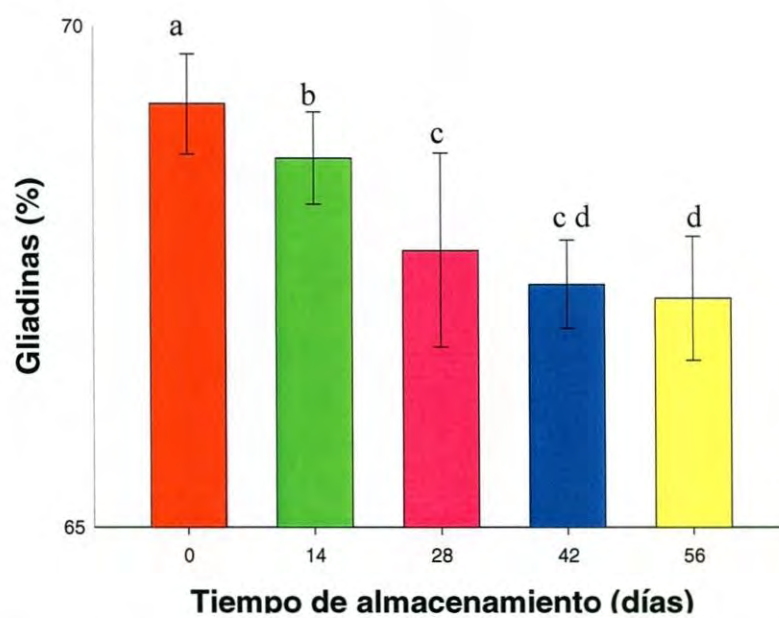


Fig. 12. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las gliadinas de masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Resultados marcados con la misma letra, no representan diferencias estadísticas significativas a $p=0.05$ ($p<0.05$).

En la Fig. 13 se presenta el efecto de la trealosa sobre las GLI. A medida que aumenta la CT aumenta la concentración de GLI. Los Cromatogramas obtenidos se presentan en el Anexo B.

En la Fig. 14 se observa el efecto del TA y CT sobre las AYG. Se puede observar que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, la concentración de AYG incrementa. Además se observa que a medida que aumenta la CT disminuye la concentración de AYG.

Los valores promedio obtenidos fueron: proteína polimérica soluble de 22.27%, de gliadinas 68.07%, albúminas y globulinas 9.64%. Estos valores difieren con los valores encontrados por Bean y colaboradores (1998), los cuales fueron: 12.05% proteína polimérica soluble y 34.75% gliadinas. Esto posiblemente se debió a la diferencia entre variedades de trigo, pues la harina utilizada en el presente estudio estaba compuesta por mezclas de variedades de trigo (comercial).

Para la PPS no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre tratamientos. Tampoco hubo diferencias entre los tiempos de almacenamiento 14, 28 y 42 días, pero si hubo diferencias a los 0 y 56 días. Para las GLI no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre los tratamientos con 200 y 400 mg/kg de trealosa, pero si hubo diferencias con el tratamiento de 0 mg/kg. No se presentaron diferencias entre 28 y 42 días de almacenamiento, pero si entre estos y 0, 14 y 56 días. Para A y G, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre todos los tratamientos. A los 0 y 14 días de almacenamiento, no hubo diferencias, ni entre 28 y 56, pero si entre todos los anteriores y a los 42 días.

En este estudio se observó que no hubo un aumento en la concentración de PPS, como se esperaba. Se ha encontrado evidencia de que el debilitamiento de la

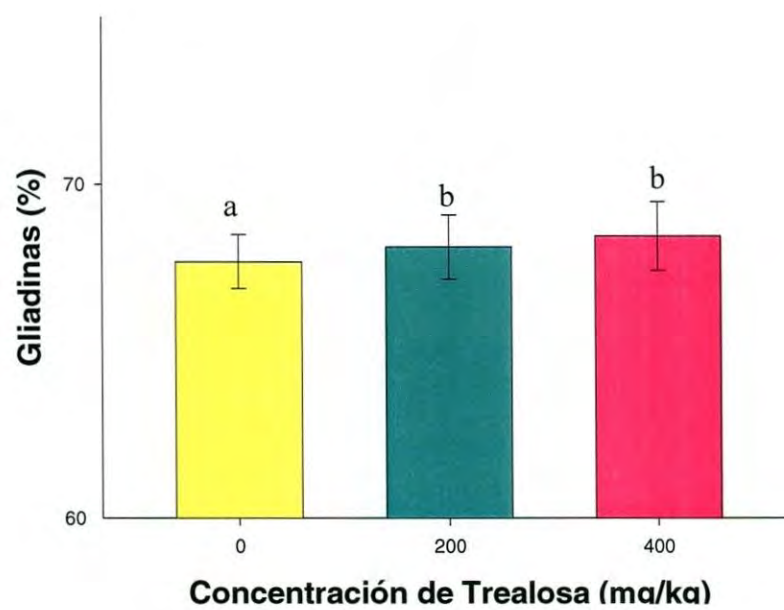


Fig. 13. Efecto de la concentración de trealosa sobre el porcentaje de gliadinas en masas congeladas (Las barras indican la desviación estándar).

Resultados marcados con la misma letra, no representan diferencias estadísticas significativas a $p=0.05$ ($p<0.05$).

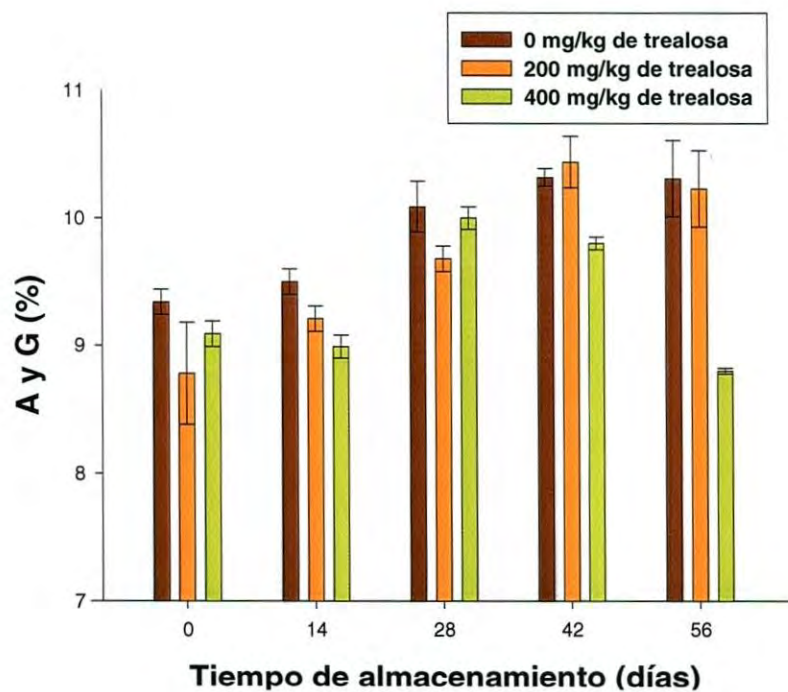


Fig. 14. Efecto del tiempo de almacenamiento y concentración de trealosa sobre el porcentaje de albúminas y globulinas de masas congeladas. (Las barras indican la desviación estándar).

estructura proteica se debe a la despolimerización de grandes agregados de subunidades de gluteninas, y que este fue mayor al aumentar el periodo de almacenamiento en estado congelado. Esto no concuerda con lo encontrado por Ribotta y col., (2001), quienes encontraron una disminución de subunidades de gluteninas de alta masa molecular en los agregados proteicos solubles en SDS (Dodecil sulfato de sodio, por sus siglas en inglés), obtenidos a partir de masas congeladas, en geles de poliacrilamida, mientras que Sharadanant y Khan (2006) describieron un aumento de la cantidad de proteínas solubles en SDS con el incremento del tiempo de almacenamiento. Además, se observó una disminución en la concentración de GLI durante el tiempo de almacenamiento y esto dependió de la concentración de trealosa. También hubo una disminución de albuminas y globulinas durante el tiempo de almacenamiento, dependiente de la concentración de trealosa.

Se han propuesto tres hipótesis para explicar los efectos e interacción de la trealosa sobre las proteínas:

La primera hipótesis de agua de reemplazo, la cual menciona que la trealosa se adhiere a la proteína por puentes de hidrógeno, sustituyendo así la primera capa de hidratación. La segunda hipótesis sugiere una hidratación preferencial (o atrapamiento de agua) según la cual en el estado seco, la trealosa no se une directamente a las proteínas, sino que atrapa el agua residual, formando una interfaz entre el disacárido y las biomoléculas. La tercera hipótesis sugiere una alta viscosidad, según la cual el efecto de la viscosidad causa una inhibición del movimiento, impidiendo los procesos que conducen a la pérdida de la estructura y desnaturalización de las proteínas, ya que las encapsula (Bellavia y col., 2009).

La hipótesis mencionadas, no son mutuamente excluyentes. Varios resultados de simulación y experimentales sugieren que la hidratación preferencial describe mejor la interacción entre las proteínas globulares y azúcares, mientras que el reemplazo del agua parece ser verdad en la película de agua en sistemas de carbohidratos. Por otra parte, la peculiaridad de la trealosa puede estar relacionada

con el aumento de la viscosidad y la formación de puentes de hidrógeno. Varios trabajos experimentales de simulación, señalan que la trealosa, modifica en forma importante los puentes de hidrógeno y la dinámica del agua en el sistemas de azúcar en soluciones acuosas (Bellavia y col., 2009).

Evaluación de la Calidad del Pan

Volumen específico

En la Tabla 7 se presenta el ANDEVA del efecto de la concentración de trealosa (CT) y tiempo de almacenamiento (TA) sobre el volumen específico del pan elaborado a partir de masas congeladas. El TA, CT y CT*TA afectaron estadísticamente muy significativamente ($p < 0.01$), al volumen específico de pan elaborado a partir de masas congeladas.

En la Fig.15 se presenta el efecto del tiempo de almacenamiento y de la trealosa sobre el volumen específico de pan. Se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, el volumen específico disminuye. Además, se observa que a medida que aumenta la CT aumenta el volumen específico del pan.

Los valores promedios obtenidos para volumen específico fueron 5, 5.65 y 6.21 cm^3/g , para 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa, respectivamente. Se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre todos los tratamientos. También hubo diferencias entre todos los días almacenamiento.

Hubo una disminución del volumen del pan, conforme transcurre el tiempo de almacenamiento en congelado, lo cual coincide con lo obtenido por Kenny y colaboradores en 1999. Sin embargo, ocurre un aumento en el volumen específico del pan relacionado con la concentración de trealosa, lo cual coincide con Giannou y Tzia (2007), quienes encontraron que hay una relación proporcional entre el volumen específico de pan y el contenido de trealosa. Ellos encontraron un valor

Tabla 7. Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre el volumen específico del pan elaborado a partir de masas congeladas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Valor de F
		Peso Específico del Pan
Concentración de Trealosa (CT)	2	962.12 ^{**1}
Tiempo de Almacenamiento (TA)	4	5235.33 ^{**}
CT*TA	8	46.91 ^{**}
Error	15	
Total	29	

^{1**}= Significativo a un nivel de $p=0.01$ ($p < 0.01$)

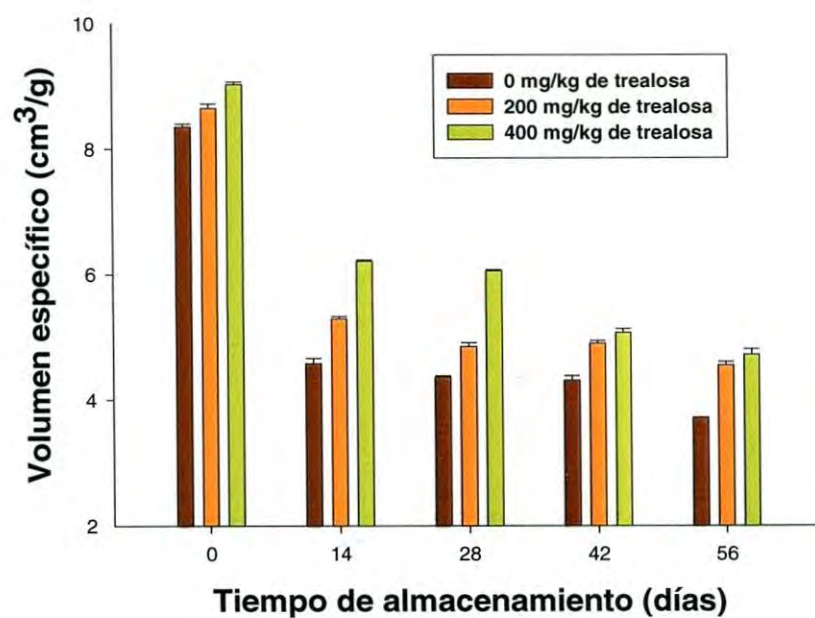


Fig. 15. Efecto del tiempo de almacenamiento y concentración de trealosa sobre el volumen específico de pan elaborado de masas congeladas. (Las barras indican la desviación estándar).

promedio de volumen de pan de 1.85 mL/g con 200 mg/kg de trealosa, mientras que en este estudio se encontró un valor promedio de 5.64 cm³/g.

Por otro lado, Salas-Mellado y Chang (2003) encontraron que la trealosa exógena no mejoró el volumen específico de pan. A pesar de que la trealosa es un factor importante en la de tolerancia al estrés de la levadura, la mejora de la actividad de la levadura sola en un sistema de masa dulce congelada puede no ser suficiente para mejorar el volumen específico del pan sin la mejora de la retención de gas de la masa. Ellos sugieren que esto se debió a que una buena retención de gas por parte de la red de gluten. En este estudio se observó un efecto benéfico sobre el volumen específico del pan, en un sistema de masa no dulce. Sin embargo, la trealosa sola, sin la restauración de los daños a la red de gluten no fue suficiente para mejorar el volumen específico óptimo (fresco) y la calidad general de pan de un sistema de masa congelada.

Textura

En la Tabla 8 se presenta el ANDEVA del efecto de la concentración de trealosa (CT) y tiempo de almacenamiento (TA) sobre la textura del pan elaborado a partir de masas congeladas. La CT afectó significativamente ($p < 0.05$). Mientras que, TA, y CT*TA afectaron muy significativamente ($p < 0.01$), para textura de pan elaborado a partir de masas congeladas.

En la Fig.16 se muestra el efecto del TA a diferentes concentraciones de trealosa sobre la textura del pan elaborado a partir de masas congeladas. Se puede observar una tendencia general a aumentar la firmeza durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo el efecto es ligeramente menor cuando se añadió la trealosa. Se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), entre los tratamientos de 0 y 200 mg/kg de trealosa, pero si hubo diferencias significativas con el tratamiento de 400 mg/kg. También hubo diferencias entre 0, 14 días.

Tabla 8. Análisis de Varianza, valor de F, del efecto de la concentración de trealosa y tiempo de almacenamiento sobre la textura del pan elaborado a partir de masas congeladas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Valor de F
		Textura del Pan
Concentración de Trealosa (CT)	2	10.02 ^{*1}
Tiempo de Almacenamiento (TA)	4	100.18 ^{**2}
CT*TA	8	21.03 ^{**}
Error	30	
Total	44	

^{1*} = Significativo a un nivel de $p=0.05$ ($p<0.05$)

^{2**} = Significativo a un nivel de $p=0.01$ ($p<0.01$)

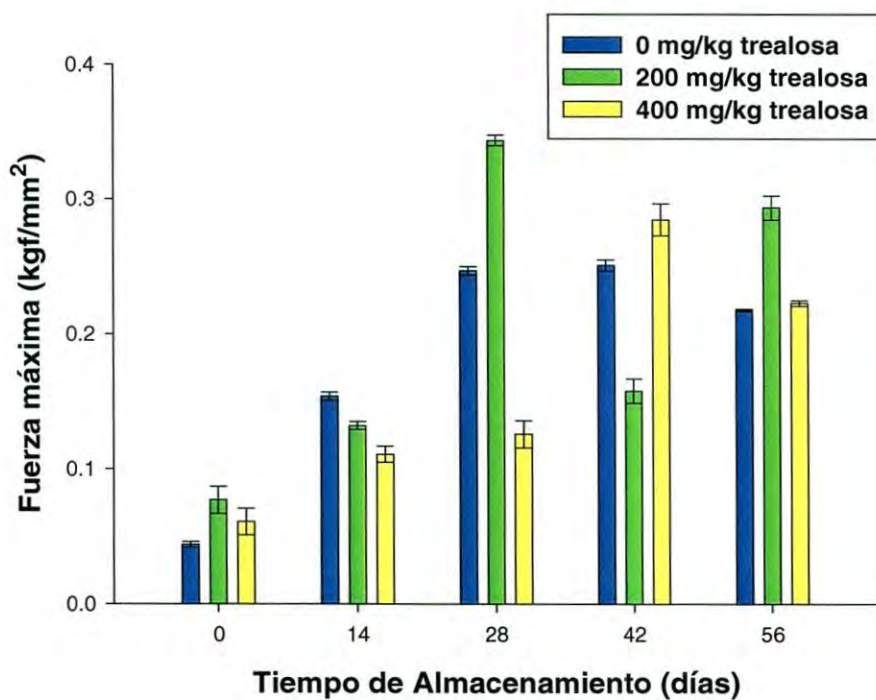


Fig.16. Efecto de la concentración de trealosa y el tiempo de almacenamiento sobre la textura de pan elaborado de masas congeladas. (Las barras indican la desviación estándar).

y 28 días de almacenamiento, pero no hubo diferencias entre los días 28, 42 y 56 días de almacenamiento.

En este estudio se encontró que la trealosa mejora la textura de pan a una concentración de 400 mg/kg, hasta los 28 días de almacenamiento en congelamiento. Similares resultados fueron obtenidos por Guiannou y Tizia (2007), quienes encontraron que la adición de trealosa en las muestras de masa congelada mejoraron proporcionalmente las características de textura, ofreciendo un pan con la miga suave y tersa.

Correlaciones entre las diferentes determinaciones

En la Tabla 9, se muestran las correlaciones simples (r) entre parámetros viscoelásticos, fisicoquímicos de masas congeladas y parámetros de calidad de pan tipo bolillo. Se encontró que, la retención de CO_2 , está correlacionada muy significativa ($p < 0.01$), de una forma positiva, con el contenido de proteína polimérica insoluble ($r = 0.76$), en la masa. Asimismo esta se correlacionó significativamente con el contenido de gliadinas ($r = 0.84$), mientras que se relacionó de una forma negativa, significativamente ($p < 0.5$), con las proteínas poliméricas solubles ($r = -0.74$) y con el contenido de albúminas y globulinas en la masa ($r = -0.83$). También está correlacionada de una forma positiva estadísticamente muy significativa ($p < 0.01$) con el volumen específico del pan ($r = 0.94$).

En el caso del desprendimiento de CO_2 , este se correlacionó de una forma negativa, a ($p < 0.05$), con el contenido de gliadinas ($r = -0.77$). Por otro lado, hubo una correlación positiva, estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con el contenido de albúminas y globulinas en la masa ($r = 0.84$). También se encontró que el desprendimiento de CO_2 , está correlacionada negativamente estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con el volumen específico de pan ($r = -0.70$).

Para el volumen del pan, se encontró una correlación positiva, estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con el contenido de gliadinas en la masa ($r = 0.85$). Mientras que, hubo una correlación negativa, significativa, con el contenido de proteína polimérica soluble ($r = -0.85$) y albúminas y globulinas ($r = -0.76$), presentes en la masa. Esto coincide con lo encontrado por Singh y col. (1990), quienes obtuvieron una correlación alta del volumen del pan con alta cantidad de glutenina.

Tabla 9. Correlaciones simples (r) entre parámetros viscoelásticos, fisicoquímicos de masas congeladas y parámetros de calidad de pan tipo bolillo.

Determinación	FMAX	TAN δ	GBP	GPR	VES	VOP	PES	DCO	RCO	AAG	AGI	APP	AYG	GLI	PPS	PRI
PRI ¹	-0.061	0.199	-0.077	-0.554	0.598	0.579	-0.718	-0.820*	0.762*	0.507	0.690	0.640	-0.631	0.532	-0.331	1
PPS	-0.157	-0.204	0.336	0.026	-0.851*	-0.852*	0.810*	0.585	-0.744*	-0.260	-0.790*	-0.659	0.780*	-0.925**	1	
GLI	0.274	0.050	-0.283	-0.127	0.850*	0.846*	-0.837*	-0.774*	0.844*	0.344	0.835**	0.657	-0.959**	1		
AYG	-0.335	0.070	0.215	0.190	-0.767*	-0.760*	0.776*	0.840*	-0.837*	-0.373	-0.788*	-0.592	1			
APP	-0.412	0.606	-0.427	-0.167	0.684*	0.691*	-0.685*	-0.800*	0.605	0.362	0.936**	1				
AGI	-0.068	0.315	-0.298	-0.329	0.869*	0.875*	-0.805*	-0.894**	0.815*	0.334	1					
AAG	-0.154	0.310	0.325	0.214	0.141	0.136	-0.201	-0.558	0.226	1						
RCO	0.362	-0.083	-0.122	-0.617	0.949**	0.937**	-0.924**	-0.769*	1							
DCO	-0.048	-0.134	0.043	0.332	-0.708*	-0.710*	0.661*	1								
PES	-0.087	-0.222	0.426	0.425	-0.900**	-0.882**	1									
VOP	0.293	0.006	-0.157	-0.535	0.998**	1										
VES	0.293	0.010	-0.170	-0.542	1											
GPR	-0.377	0.368	-0.212	1												
GBP	0.500	-0.573	1													
TAN δ	-0.924**	1														
FMAX	1															

¹PRI = Proteína polimérica insoluble; ²PPS = Proteína polimérica soluble; ³GLI = Gliadinas; ⁴AYG = Albúminas y globulinas; ⁵APP = Área proteína polimérica soluble; ⁶AGI = Área gliadinas; ⁷AAG = Área Albúminas y globulinas; ⁸RCO = Retención de CO₂; ⁹DCO = Desprendimiento de CO₂; ¹⁰PES = Peso de pan; ¹¹VOP = Volumen de pan; ¹²VES = Volumen específico de pan; ¹³GPR = módulo de almacenamiento G; ¹⁴GBP = módulo de pérdida G; ¹⁵TAN = ángulo de fase; ¹⁶FMAX = Firmeza máxima.

**Valores estadísticamente muy significativos p < 0.01

*Valores estadísticamente significativos p < 0.05

^{ns}Valores no significativos a p > 0.05

CONCLUSIONES

1. La trealosa y el tiempo de almacenamiento afectaron significativamente a las características fermentativas, así como a las características de panificación y la textura del pan.
2. La trealosa no tuvo un efecto significativo sobre las propiedades viscoelásticas. Sin embargo, sí evita la pérdida de CO₂, después de la congelación de las masas. Esto da como resultado un pan tipo bolillo con mayor volumen.
3. La trealosa evitó la depolimerización de las gluteninas de alto peso molecular. El porcentaje de gliadinas disminuyó con respecto al tiempo de almacenamiento y la concentración de trealosa hizo que estas mantuvieran su proporción en la masa durante el almacenamiento en congelación.
4. La trealosa aumentó el volumen de pan en masas congeladas y fue proporcional a la concentración de esta durante 56 días de almacenamiento. La trealosa mejoró la textura del pan de masas congeladas a 400 mg/kg hasta los 28 días de almacenamiento.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar mayores concentraciones de trealosa, en estudios similares, para encontrar la cantidad óptima de este aditivo, sobre las propiedades viscoelásticas de masas congeladas y calidad de pan tipo bolillo.
2. Hacer pruebas donde se mida la cantidad de agua disponible, en relación con la concentración de trealosa en sistemas de masa congelada.
3. Evaluar a detalle el efecto de la trealosa sobre las proteínas de gluten, en masas congeladas e identificar, que tipos de proteínas son en las que se tiene un mayor impacto en la interacción trealosa-proteína y su relación con las propiedades de las masas congeladas y la calidad del pan.
4. Esta información es relevante y se recomienda para la industria panadera, como prueba de los efectos de los aditivos que se utilizan en productos de masas congeladas.

REFERENCIAS

- Abu-Ghoush, M., Herald, T. J., Dowell, F., Feng, X., Aramouni, F. M., Walker, C. 2008. Effect of antimicrobial agents and dough conditioners on the shelf-life extension and quality of flat bread, as determined by near-infrared spectroscopy. *International J. Food Sci. Technol.* 43(2):365-372.
- Aibara, S., Nishimura, K., Esaki, K. 2001. Effects of shortening on the loaf volumen of frozen dough bread. *Food Sci. Biotechnol.* 10:521-528.
- Aibara, S., Ogawa, N., Hirose, M. 2005. Microstructures of bread dough and the effects of shortening on frozen dough. *Biosci. Biotech. Biochem.* 69 (2):397-402
- American Association of Cereal Chemists. 2000. *Approved Methods of the AACC*, 10th ed. Method (08-03, 44-40, 46-13, 54-21, 54-30, 54-30A, 56-61, 74-09). The Association: St. Paul, MN.
- Angell, C.A., 1991. *Hydrogen-bonded liquids*. NATO-ASI Series B 329, 59.
- Ando, A., Susuki, C., Shima, J. 2005. Survival of genetically modified and self-cloned strains of commercial baker's yeast in simulated natural environments: environmental. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (11):7075-7082.
- Anon, M. C., LeBail, A., Leon, A. E. 2004. Effect of freezing on dough ingredients. In Hui, Cornillon, Legarreta, Lim, Murrell, Nip (Eds.), *Handbook of frozen foods*. New York, USA: Marcel Dekker.
- Arpita, M., Datta, A.K. 2008. Bread baking - A review. *J. Food Eng.* 86:465-474

- Asghar, A., Anjum, F. M., Tariq, M. W., and Hussain, S. 2005. Effect of carboxy methyl cellulose and gum arabic on the stability of frozen dough for bakery products. *Turkish J. Biol.* 29(4): 237-241.
- Autio, K., Sinda, E. 1992. Frozen doughs: rheological changes and yeast viability. *Cereal chem.* 69 (4):409-413
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., Iturriaga, G. 2004. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136: 3649-3659.
- Baier, A., Handschin, S., Conde, B. 2005. Ice in prefermented frozen bread dough- an investigation based on calorimetry and microscopy. *Cereal Chem.* 82(3): 251-255.
- Bar, A. 2000. Trehalose produced by a novel enzymatic process. Dossier prepared and submitted on behalf of Hayashibara Co., Ltd., for evaluation pursuant to the EU Novel Foods Regulation (258/97) by the UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes, Japan.
- Bean, S., Lyne, R., Tilley, K., Chung, O., Lookhart, G. 1998. A rapid method for quantification of insoluble polymeric proteins in flour. *Cereal Chem.* 75(3): 374-379.
- Belton, P. S. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 29:103-107
- Bellavia, G., Cordone, L., Cupane, L. 2009. Calorimetric study of myoglobin embedded in trehalose-water matrixes. *J. Ther. Analysis Calorim.* 95(3): 699-702.
- Berglung, P., Shelton, D., Freeman, T. 1990. Composition of two sample preparation procedure for low-temperature scanning electron microscopy for frozen bread dough. *Cereal Chem.* 67:139-140.

- Bloksma, A. K. 1990. Dough structure, dough rheology and baking quality. *Cer. Foods World*. 35:237-244.
- Bloksma A. 1971. Rheology and chemistry of dough. En: Pomeranz Y, editor. *Wheat: chemistry and technology*. 2a ed. St. Paul: American Association of Cereal Chem. pag. 523–584.
- Bohem, D. J., Berzonsky, W. A., Bhattacharya, M. 2004. Influence of nitrogen fertilizer treatments on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) flour characteristics and effect on fresh and frozen dough quality. *Cereal Chem*. 81(1): 51-54.
- Branca, C., Magazu, S., Maisano, G., Migliardo, P. 1999. Anomalous cryoprotective effectiveness of trehalose: Raman scattering evidences. *J. Cereal Chem. Physics*. 111: 281–287.
- Brumfiel, G. 2004. Just add water. *Nature*. 428:14-15.
- Bushuk, W., MacRitchie, F. 1989. Wheat proteins: aspects of structure that determine breadmaking quality. En: Phillips RD, Finley JW, editores. *Protein quality and the effects of processing*. New York: Marcel Dekker. pag. 357–361.
- Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo, CANIMOLT. 2009
- Cámara Nacional de la Industria Panificadora, CANAIPA. 2009
- Casey, G. P., Foy, J. J. 1995. Yeast performance in frozen doughs and strategies for improvement. In K. Lorenz & Brummer (Eds.), *Frozen and refrigerated doughs and batters*. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists.
- Cauvain, S.P., 2003. *Bread Making-Improving Quality*. CRC Press, New York.

- Ciaffi, M., Tozzi, L., Lfiandra, D. 1996. Relationships between flour protein composition determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography and dough rheological parameters. *Cereal Chem.* 73:346-351.
- Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S., Roser, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/Technol.* 10: 1007-1111.
- Crow, L.M., Reid, D.S., Crow, J.H., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials?. *Biophysical J.* 71: 2087–2093.
- Crowe, J., Crowe, L., Chapman, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Sci.* 223: 209-217.
- Crowe, J., Hoekstra, F. A., Crowe, L. M. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolkers, W., Tablin, F. 2001. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiol.* 43: 89-105.
- Dachkevitch, T., Autran J. 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* 66:448-456.
- Decock, P., Cappelle, S., 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci. Technol.* 16 (1–3), 113–120.
- Ding, S.P., Fan, J., Green, J.L., Lu, Q., Sanchez, E., Angell, C.A., 1996. Vitrification of trehalose by water loss from its crystalline dehydrate. *J. Ther. Analysis.* 47:1391–1405.

- Diniz-Mendes, L., Bernardes, E., de Araujo, P.S., Panek, A.D., Paschoalin, V.M.F. 1999. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. *Biotechnol/Bioeng.* 65: 572–578.
- Dodić, D., Pejin, S. Dodić, S., Popov, J. Mastilović, J., Popov-Raljić, S. Zivanovic. 2007. Effects of hydrophilic hydrocolloids on dough and bread performance of samples made from frozen doughs. *J. Food Sci.* 72(4): 235-241
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiol.* 13(4): 17–27.
- El-Hady, E. A., El-Samahy, S. K., Seibel, W., and Brummer, J. M. 1996. Changes in gas production and retention in non-fermented frozen wheat doughs. *Cereal Chem.* 73:472-477.
- Eroglu, A., Russo, M. J., Biegansky, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H., Toner, M. 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnol.* 18:163-167.
- Faubion, J.M., Dreese, P.C., Diehl, K.C. 1985. Dynamic rheological testing on wheat flour doughs. In *reology of wheat products*. H. Faridi. St. Paul Minnesota. Am. Assoc. Cereal Chem. P.p. 9116.
- Fuchigami, M., Ogawa, N., Teramoto, A. 2002. Trehalose and hydrostatic pressure effects on the structure and sensory properties of frozen tofu soybean curd. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 3:139–147.
- Gancedo, C., Flores, C.L. 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research.* 4: 351–359.

- Garg, A. K., Kim, J. K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Choi, Y. D., Kochian, L. V., Wu, R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*. 99:15898-15903.
- Giannou, V., Kessoglou, V., Tzia, C., 2003. Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends Food Sci. Technol.* 14 (3):99–108.
- Giannou, V., Tzia, C., LeBail, A. 2005. Quality and safety of frozen bakery products. In Sun (Ed.), *Handbook of frozen food processing and packaging*. New York, USA: Marcel Dekker.
- Giannou V. and Tzia C. 2008. Cryoprotective role of exogenous trehalose in frozen dough products. *Food Bioproc. Technol.* 1:276–284.
- Goodwin, J. W., Hughes, R. W. 2000. *Rheology for chemists: an introduction*. Cambridge. The royal soc. chem. P.p. 121-125.
- Guo, N.; Puhlev, I., Brown, D. R., Mansbridge, J., Levine, F. 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnol.* 18:168-171.
- Gupta, R., Khan, K., MacRitchie, F. 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *J. Cereal Sci.* 18:23-41.
- Higashiyama, T. 2002. Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* 74:1263-1269.
- Huang, W., Kim, Y., Li, X., Rayas-Duarte, P. 2008a. Rheofermentometer parameters and bread specific volume of frozen sweet dough influenced by ingredients and dough mixing temperature. *J. Cereal Sci.* 48: 639-646.

- Huang, W. N., Yuan, Y. L., Kim, Y. S., Chung, O. K. 2008b. Effects of transglutaminase on rheology, microstructure, and, baking properties of frozen dough. *Cereal Chem.* 85(3):301-306.
- Hui, K. H., Hosney, R. C., Seib, P. A. 2006. Frozen dough I. Factors affecting stability of yeasted doughs. *Cereal Chem.* 56: 419-424.
- Hsu, K., Hosney, R., Seib, S. 1979. Frozen dough. I. Factor affecting the stability of yeasted doughs. *Cereal Chem.* 54: 419-424.
- Inoue, Y., Sapirstein, H. D., Takayanagi, S., Bushuk, W. 1994. Studies on frozen doughs. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. *Cereal Chem.* 71(2):118-121.
- Islas, M., MacRitchie, F., Gandikota, S., Hou, G. 2005. Relaciones de la composición proteínica y mediciones reológicas en masa con la calidad panadera de harinas de trigo. *Fitotec Méx.* 28(3):243-251.
- Iwaya-Inoue, M., Takata, M. 2001. Trehalose plus chloramphenicol prolong the vase life of tulip flowers. *Hort. Sci.* 36: 946-950.
- Karaoğlu, M., Kotancilar, H., Gerçekaslam, K. E. 2008. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43:1778-1785.
- Katsuno, M., Adachi, H., Sobue, G. 2004. Sweet relief for Huntington disease. *Nature Med.* 10:123-124.
- Kauffman SP. 1986. Dough rheology - a review of structural models and the role of disulfide interchange reactions. *Cer. Foods World.* 31:820-824.

- Kenny, S., Wehrle, K., Dennehy, T., Arendt, E.K. 1999. Correlations between empirical and fundamental rheology measurements and baking performance of frozen bread dough. *Cereal Chem.* 76(3):421-425.
- Kidd, G., Devorak, J. 1994. Trehalose is a sweet target for agbiotech. *Bio/technology.* 12:1328-1329.
- Kim, Y., Huang, W., Du, G., Pan Z., Chung, O. 2008. Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. *Food Research Int.* 41:903–908.
- Kline, L., Sugihara, T. 1968. Factors affecting the stability of the frozen bread dough. I. Prepared by straight dough method. *Beaker's Dig.* 42: 44–50.
- Lerbret, A., Bordat, P., Affouard, F., Hedoux, A., Guinet, Y., Descamps, M. 2007. How do trehalose, maltose, and sucrose influence some structural and dynamical properties of lysozyme? Insight from molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem.* 111: 9410–9420.
- Leyman, B., Avonce, N., Ramon, M., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., Iturriaga, G. 2004. New selection marker for plant transformation, *In: Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc. Totowa, N. J. USA. Vol. 267 pp. 385-396.
- Lillard, DW, Seib PA, Hosney RC. 1982: Isomeric ascorbic acids and derivatives of L – ascorbic acid: their effect on the flow of dough. *Cereal Chem.* 59:291-296.
- Lindsay M, Skerritt J. 1999. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure–function perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 10:247–253.

- Lins, R. D., Pereira, C. S., Hunenberger, P. H. 2004. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins*. 55:177-186.
- Magaña-Barajas Elisa. 2007. Tesis de Maestría: "Evaluación de las características viscoelásticas de masas de trigos suaves mexicanos utilizando la prueba de relajación del esfuerzo". Hermosillo, Sonora: Editorial Universidad de Sonora. Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Matuda, T. G., Chevallier, S., Pessôa Filho, P., LeBail, A., Tadini, C. C. 2008. Impact of guar and xantan gums on proofing and calorimetric parameters of frozen bread dough. *J. Cereal Sci.* 48:741-746.
- Marston, P.E. 1978. Frozen dough for breadmaking. *Baker's Dig.* 52:18–20. 37–40.
- Mondal, A., Datta, A. K. 2008. Bread baking – A review. *J. Food Eng.* 86: 465–474.
- Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Motoki M, Ando H, Urneda K, Matsura A. 1989. Polymerisation of several proteins by Ca²⁺-independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53:2619-2623.
- Octaviani V., Zhou W. 2007. Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers. *J. Cereal Sci.* 45:1-17.
- Oda, Y., Tonomura, K. 1993. Sodium chloride enhances the potential leavening ability of yeast in dough. *Food Microbiol.* 10:249–254.
- Otsubo, M., Iwaya-Inoue, M. 2000. Trehalose delays senescence in cut gladiolus spikes. *Hort. Sci.* 35:1107-1110.

- Paiva, C. L. A., Panek, A. D. 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2:293-314.
- Panadero, J., Ranz-Gil, F., Prieto, J. A. 2005. Heterologous expression of type I antifreeze peptide GS-5 in baker's yeast increases freeze tolerance and provides enhanced gas production in frozen dough. *J. Agric. Food Chem.* 53(26):9966-9970.
- Pepe, O., Anastasio, M., Villani, F. 2005. Improvement of frozen dough stability cryoresistant yeast strain and refreshment. *Cereal Chem.* 82(3):239-241.
- Pomeranz, Y. 1987. *Modern cereal science and technology*. VCH Publishers. New York. 486 p.
- Razmi-Rad, E., Ghanbarzadeh, B., Mousavi, S.M., Emam-Djomeh, Z., Khazaei, J. 2007. Prediction of rheological properties of Iranian bread dough from chemical composition of wheat flour by using artificial neural networks. *J. Food Eng.* 81(4):728-734.
- Ribotta, P. D., León, A. E., Añón, M. C. 2001. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality. *J. Agric. Food Chem.* 49:913-918.
- Ribotta, P.D., Leon, A.E., Anon, M.C. 2003a. Effects of yeast freezing in frozen dough. *Cereal Chem.* 80:454-458.
- Ribotta, P. D., León, A. E., Añón, M. C. 2005. Effects of freezing in frozen dough. *Cereal Chem.* 80(4):454-458.
- Richards, A. B., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P. M., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A., Kurimoto, M. 2002. Trehalose: A review of properties, history of use and human

tolerance, and results of multiple safety studies. *Food. Chem. Toxicol.* 40: 871-898.

Rosell, C. M., Rojas, J. A., Benedicto de Barber, C. 2001. Influence of Hydrocolloids on Dough Rheology and Bread Quality. *Food Hydroc.* 15: 75-81.

Rosell, C. M., Gómez, M. 2007. Frozen dough and partially baked bread: An update. *Food Rev. Int.* 23(3):303-319.

Roser, B., Colaco, C. 1993. A sweeter way to fresher food. *New Sci.* 138:25-28.

Rouille, J., Le Bail, A., Coucoux, P. 2000. Influence of formulation and mixing conditions on bread making qualities of french frozen dough. *J. Food Eng.* 43:197-203.

Salas-Mellado, M.M., Chang, Y.K. 2003. Effect of formulation on the quality of frozen bread dough. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 46:461-468.

Saxena, D. C., Prasada Rao, U. J. S. y Harida Rao, P. 1997. Indian wheat cultivars: correlation between quality of gluten proteins, rheological characteristics of dough and tandoori roti quality. *J. Sci. Food Agric.* 74:265-272.

Scanlon, M.G., Zghal, M.C., 2001. Bread properties and crumb structure. *Food Res. Int.* 34(10):841-864.

Sahlstrom S, Nielsen A, Faergestad E, Lea P, Park W, Ellekjaer M. 1999. Effect of dough processing conditions and DATEM on Norwegian hearth bread prepared from frozen dough. *Cereal Chem.* 76:38-44.

Seguchi, M., Nikaidoo, S., Morimoto, N. 2003. Centrifuged liquid and breadmaking properties of frozen-and-thawed bread dough. *Cereal Chem.* 80:264-268.

- Selomulyo, V. O., Zhou, W. 2007. Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers. *J. Cereal Sci.* 45:1-17.
- Silva, R. F. 2000. Uses of alpha-crystalline emulsifiers in the sweet goods industry. *Cer. Foods World.* 45:405-411.
- Singh, N. K., Donovan, R. y MacRitchie, F. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. II. Relative Quantity of Glutenin as a Measure of Breadmaking Quality. *Cereal Chem.* 67(2):161-170.
- Sharadanant, R., Khan, K. 2003. Effect of hydrophilic gums on the quality of frozen dough: II. Bread characteristics. *Cereal Chem.* 80(6):773-780.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Tatham, A. S. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 15:105-120.
- Schiraldi, C., Di Lernia, I., De Rosa, M. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* 20:420-425.
- Stampfli, L., Nersten, B. 1995. Emulsifiers in bread making. *Food Chem.* 52(4): 353-360.
- Stecchini, M.L., Maltini, E., Venir, E., Del Torre, M., Prospero, L. 2002. Properties of wheat dough at sub-zero temperatures and freeze tolerance of a baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *J. Food Sci.* 67:2196-2201.
- Steffolani, M.G., Perez, G.T., Ribotta, R.D., Puppo, M.C., Leon, A.E. 2008. Effect of transglutaminase on the properties of glutenin macro polymer and dough rheology. *Cereal Chem.* 85:39-43.

- Tanghe, A., Teunissen, A., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. 2000. Identification of genes responsible for improved cryoresistance in fermenting yeast cells. *Int. J. Food Microbiol.* 55:259–262.
- Tripples, K. 1969. The relation of starch damage to the baking performance of flour. *Bakers´Dig.* 43:28.
- Variano-Marston, E., Hsu, K., Mahdi, J. 1980. Rheological and structural changes in frozen dough. *Bakers´Dig.* 54: 32
- Weegels, P., Harmer, R., Schofield, J. 1997. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. II Changes in composition. *J. Cereal Sci.* 25:155–163.
- Weegels, P., Van der Pijpekamp, A., Graveland, A., Harmer, R., Schofield, J. 1996. Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *J. Cereal Sci.* 23: 103–111.
- Weipert, D. 1992. Descriptive and fundamental rheology in a new light. *Cer. Foods World.* 37:15-24.
- Weisburd, S. 1988. Death-defying dehydration. *Sci. News.* 133: 107-110.
- Zanoni, B., Peri, C., 1993. A study of the bread-baking process. I: a phenomenological model. *J. Food Eng.* 19(4): 389–398.

ANEXO A

Graficas del método dinámico, barrido de frecuencia, G' , G'' y $\text{Tan } \delta$

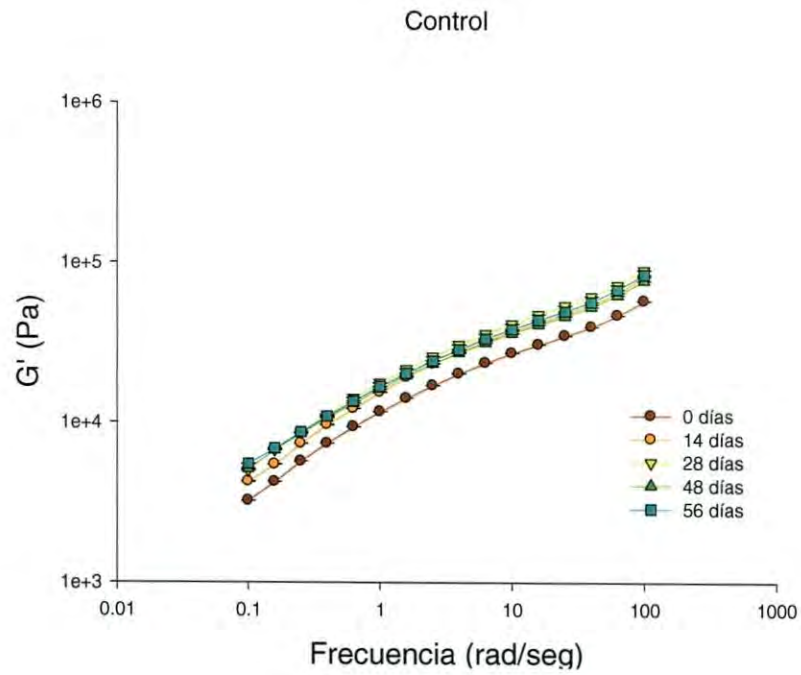


Fig. A-1. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de almacenamiento G' en masas congeladas.

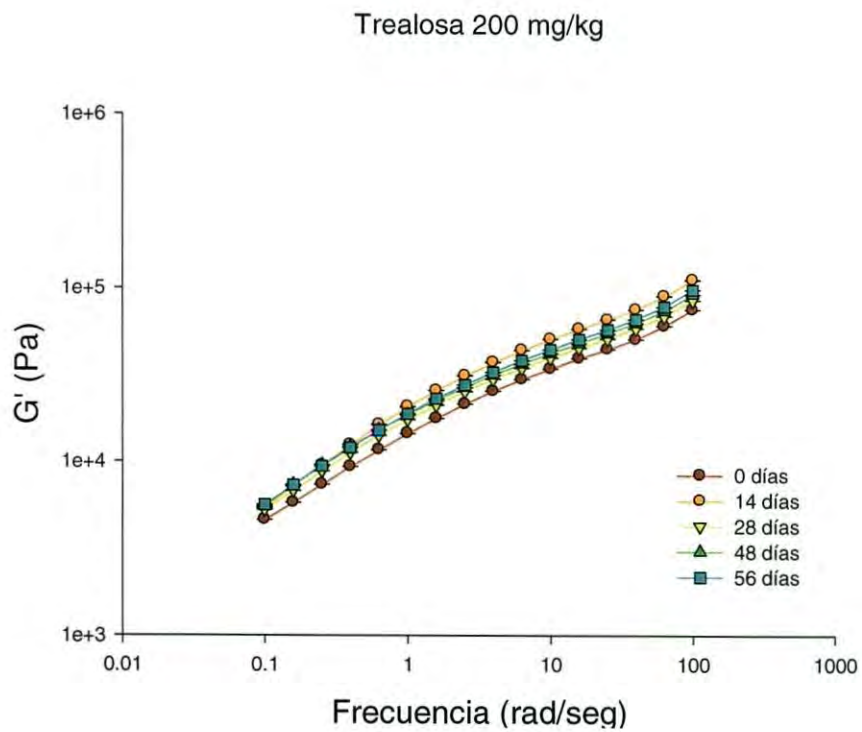


Fig. A-2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de almacenamiento G' en masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa.

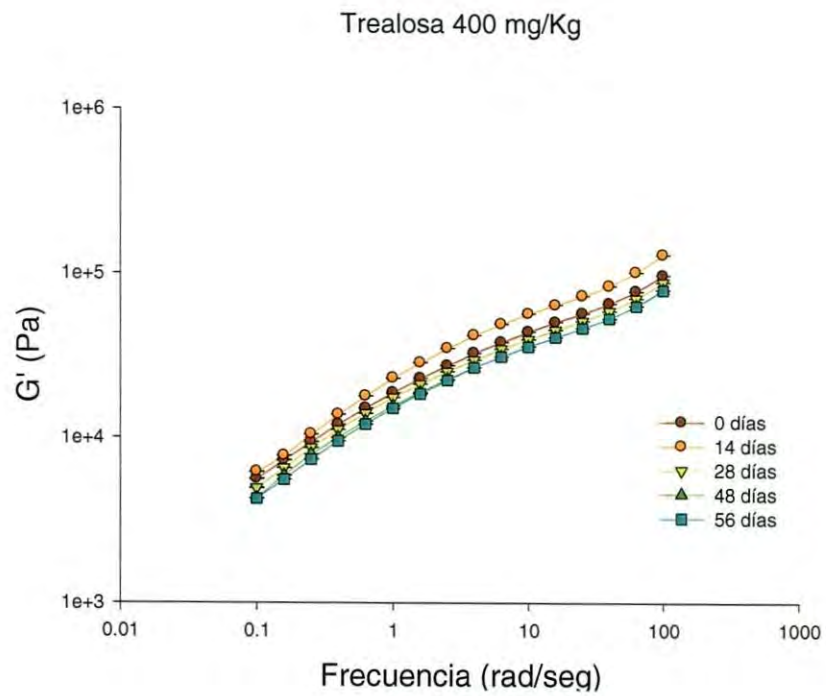


Fig. A-3. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de almacenamiento G' en masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa.

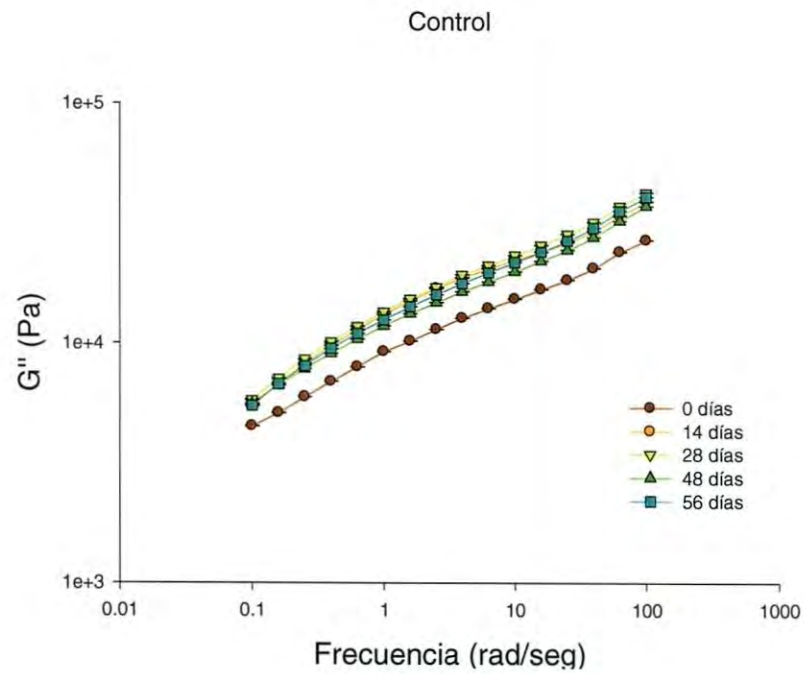


Fig. A-4. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de pérdida G'' en masas congeladas.

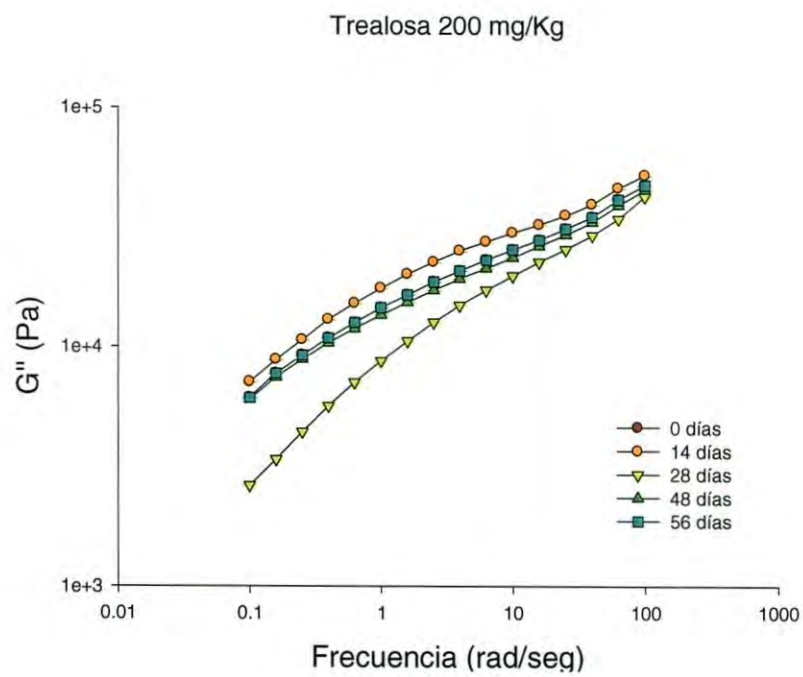


Fig. A-5. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de pérdida G'' en masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa.

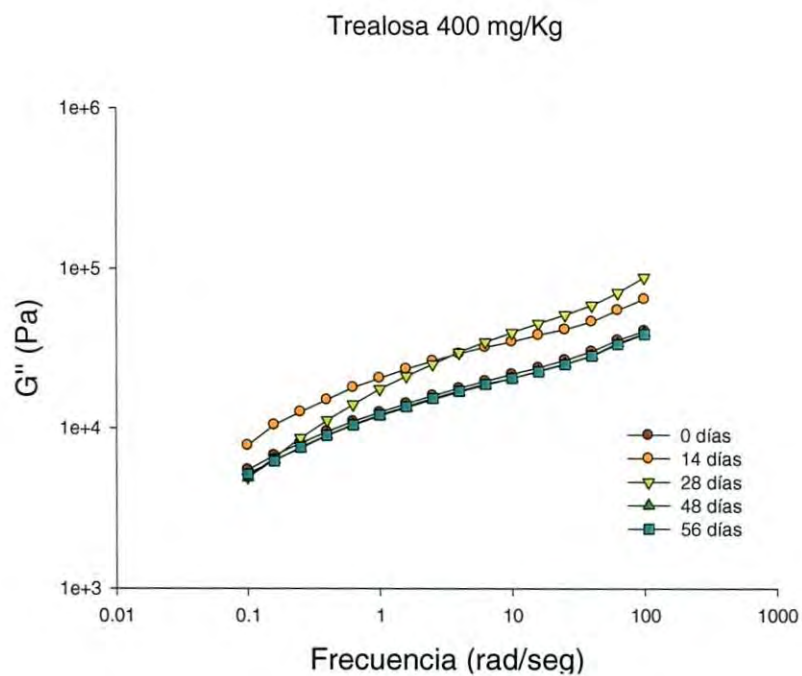


Fig. A-6. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el módulo de pérdida G'' en masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa.

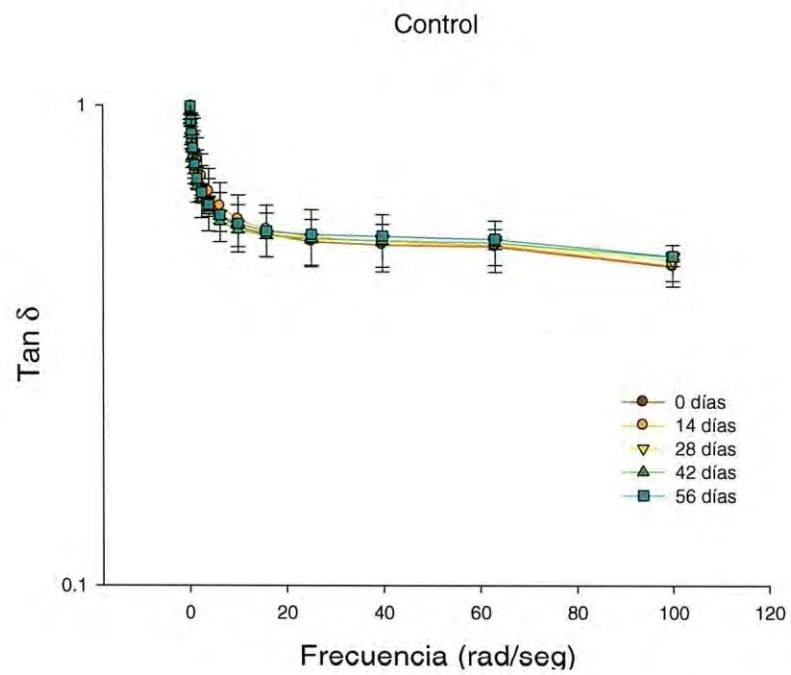


Fig. A-7. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el Angulo $\tan \delta$ en masas congeladas.

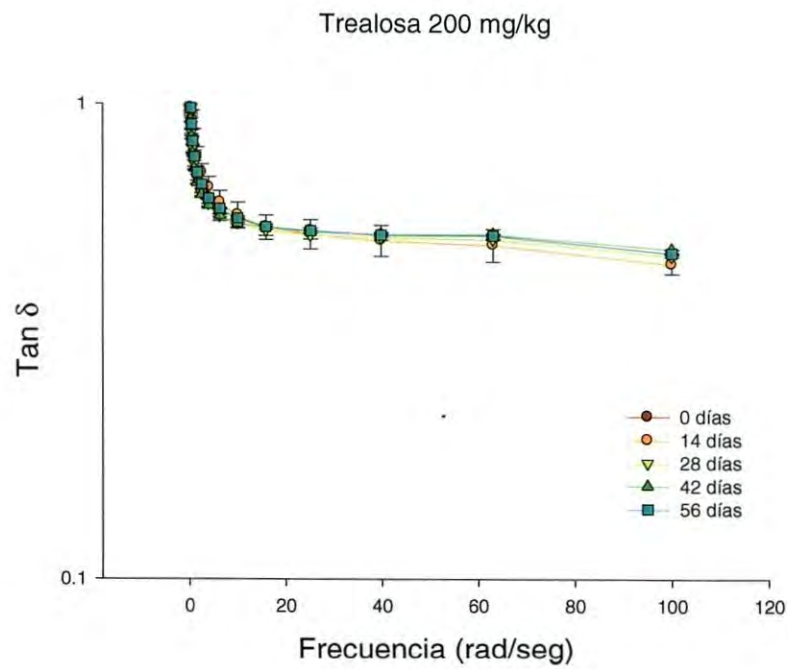


Fig. A-8. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el Angulo $\text{Tan } \delta$ en masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa.

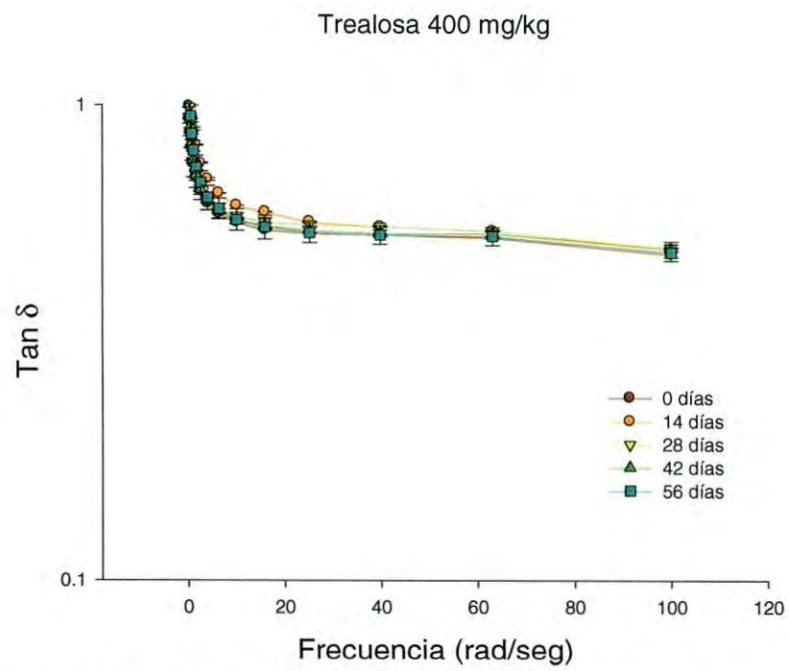


Fig. A-9. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el Angulo $\text{Tan } \delta$ en masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa.

ANEXO B

Cromatogramas SE-HPLC

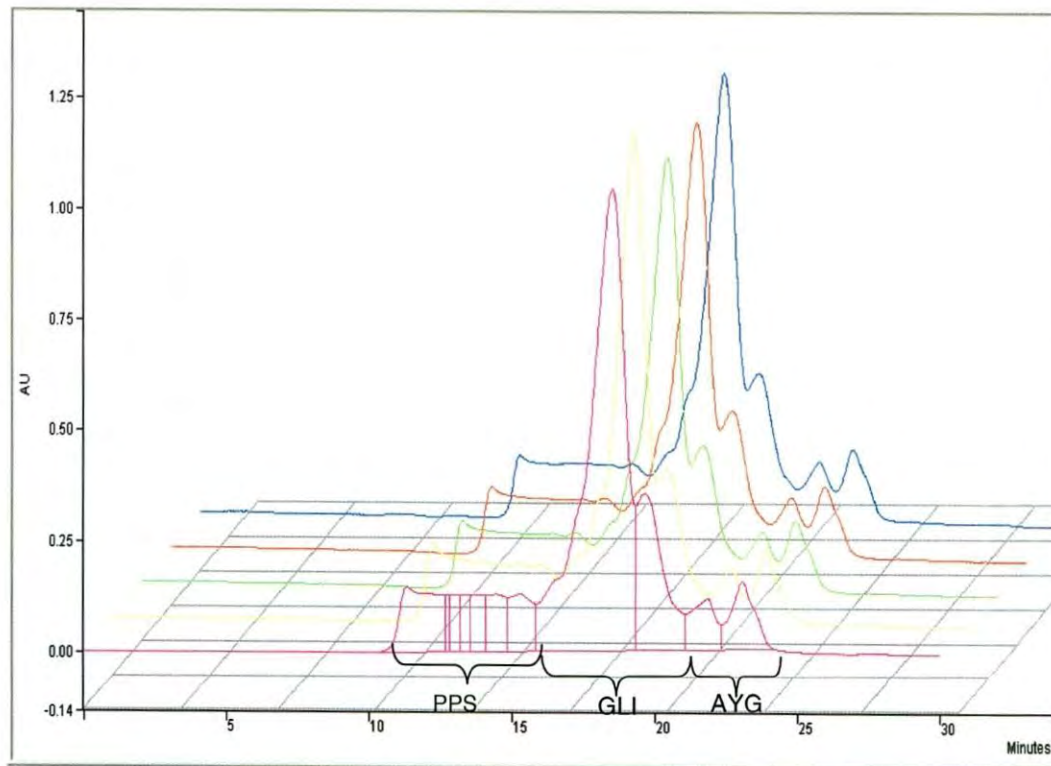


Fig. B-1. Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0 mg/kg de trealosa y el tiempo de almacenamiento.

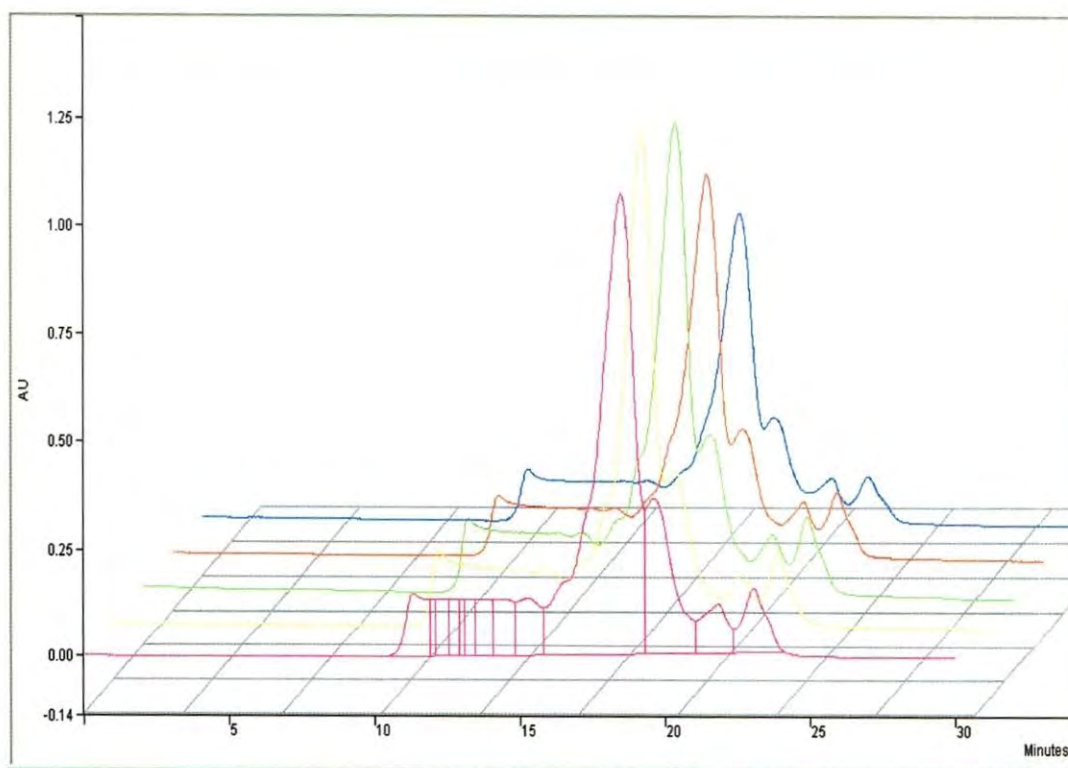


Fig. B-2. Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 200 mg/kg de trealosa y el tiempo de almacenamiento.

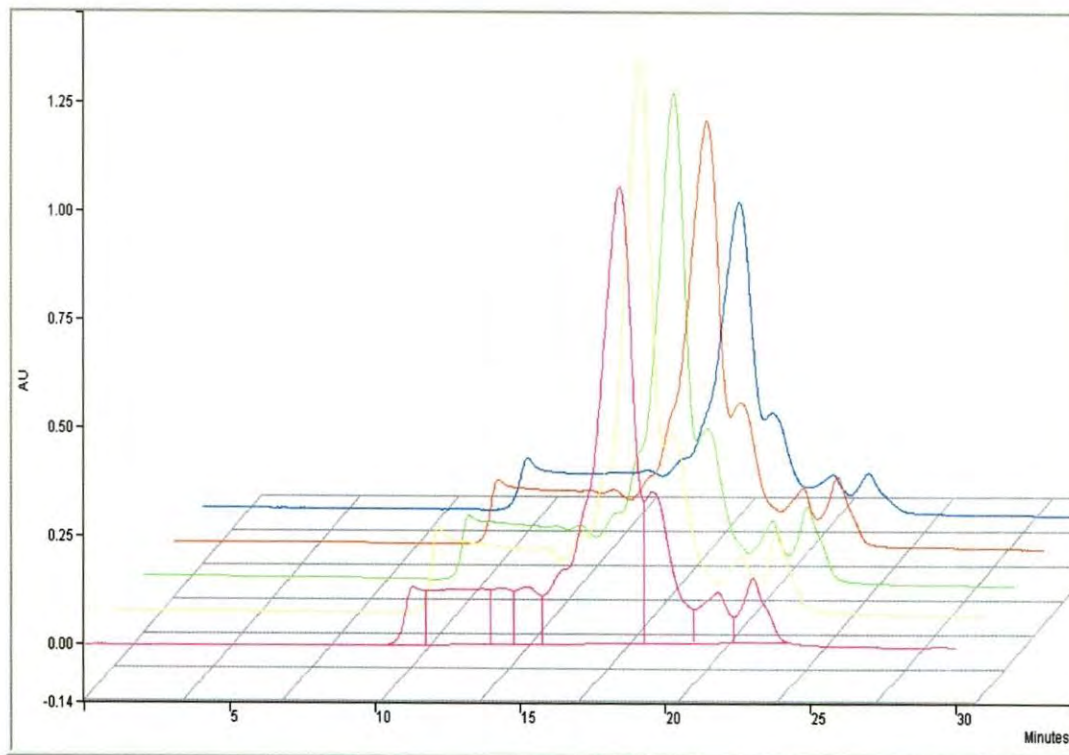


Fig. B-3. Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 400 mg/kg de trealosa y el tiempo de almacenamiento.

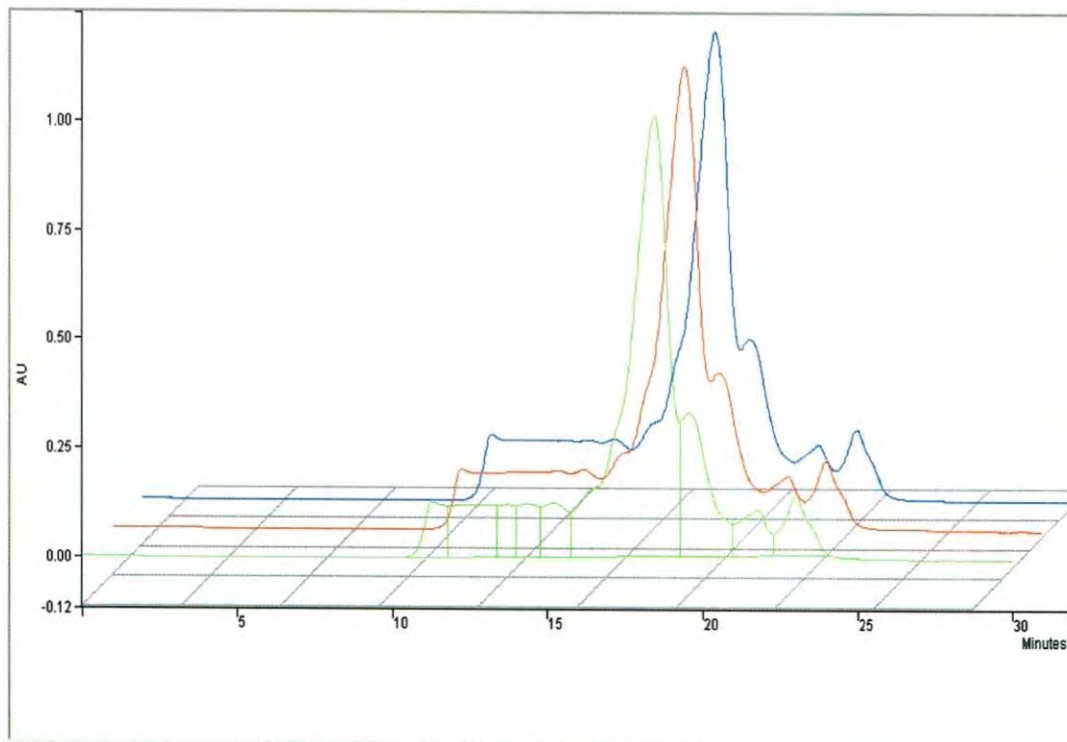


Fig. B-4. Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 0 días de almacenamiento.

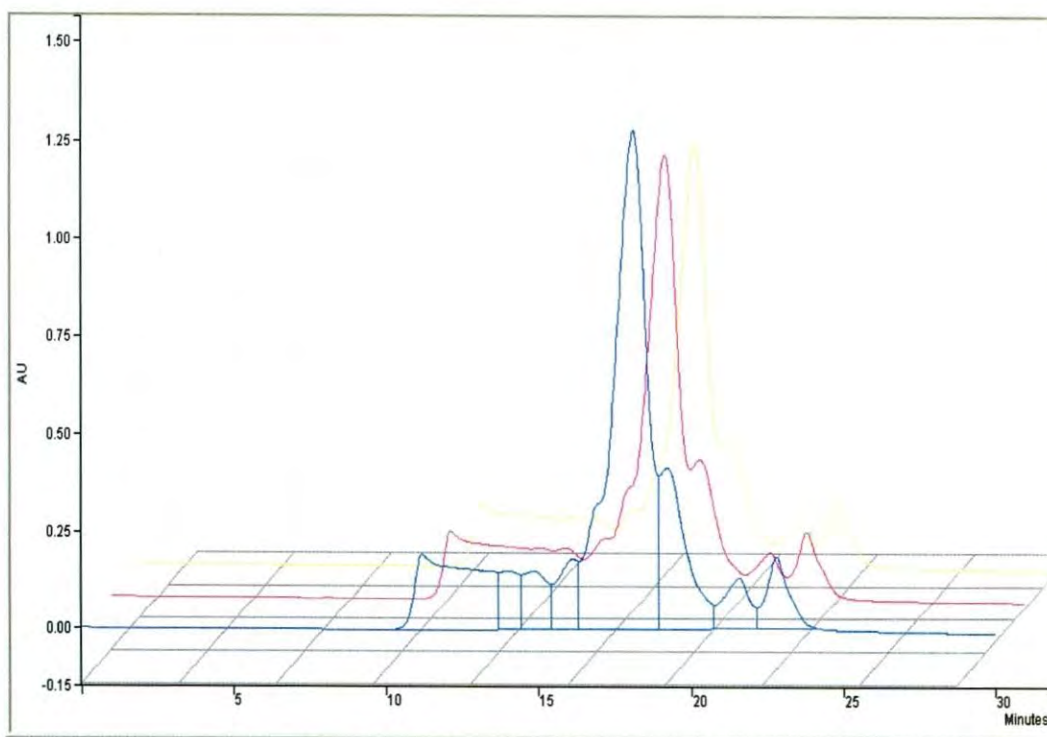


Fig. B-5. Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 14 días de almacenamiento.

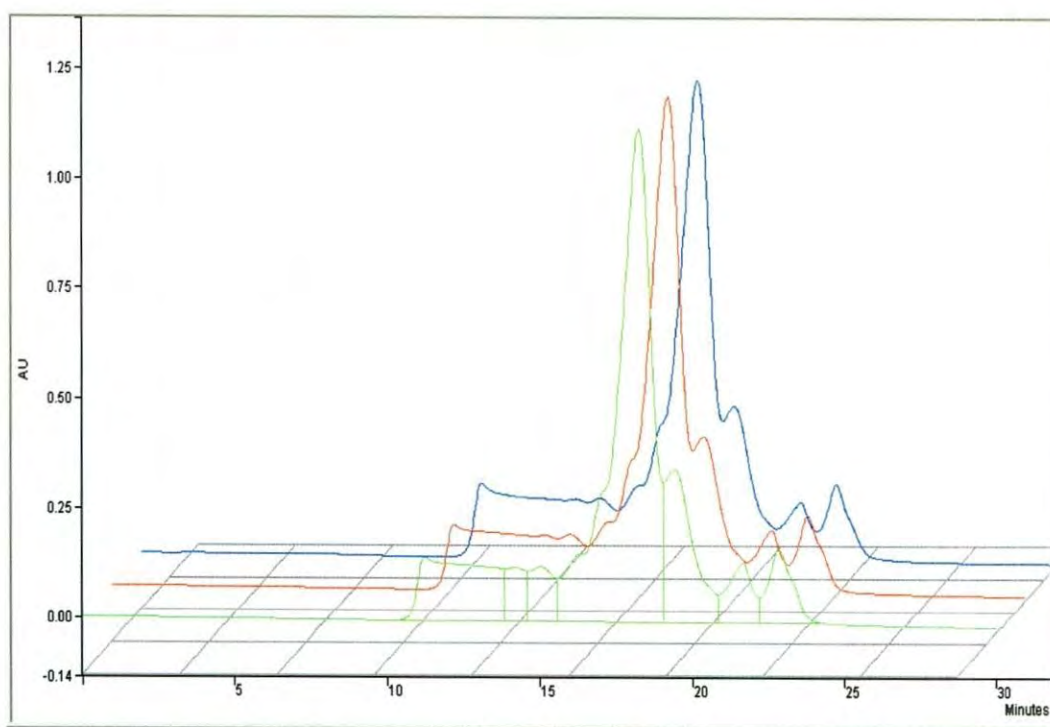


Fig. B-6. Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 28 días de almacenamiento.

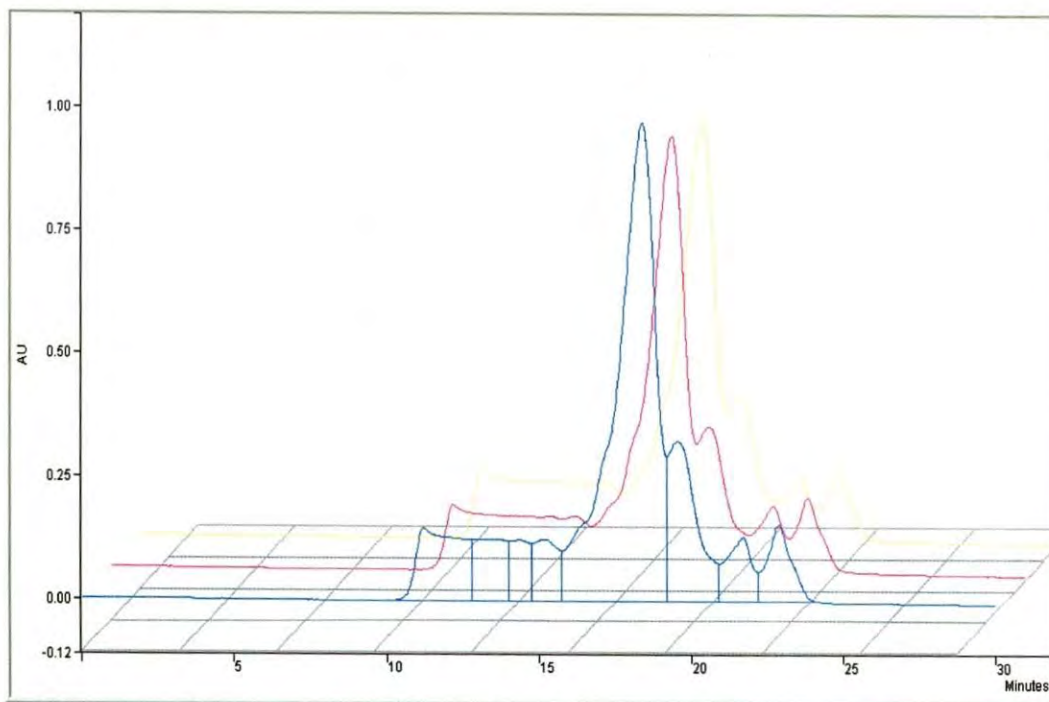


Fig. B-7. Cromatogramas SE-HPLC de proteínas solubles en propanol al 50%, de masas congeladas con 0, 200 y 400 mg/kg de trealosa a 42 días de almacenamiento.