ID 151505

"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 Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Estudio de la Redistribución de Agua en Masas Congeladas: Efecto en las Propiedades Fisicoquímicas y de Panificación

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

María Irene Silvas García

Hermosillo, Sonora **Febrero de 2015**

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON

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

APROBACIÓN

Estudio de la Redistribución de Agua en Masas Congeladas: Efecto en las Propiedades Fisicoquímicas y de Panificación

M.C. María Irene Silvas García

Dr. Benjamín Ramírez Wong

Director de Tesis

Dra. Patricia Isabel Torres Chávez

Miembro del Comité de Tesis

Dra. Elizabeth Carvajal Millán

Miembro del Comité de Tesis

Dr. Jesús Manuel Barrón Hoyos

Miembro del Comité de Tesis

Dr. Luis Arturo Bello Pérez

Miembro del Comité de Tesis

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2015

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

M.C. María Irene Silvas García

Dr. Enrique Márquez Ríos

Coordinador del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2015

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora a través del Departamento en Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por el apoyo para la realización de este proyecto de doctorado.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico por medio de la beca de manutención y a través del proyecto de investigación No. 154090 "Estudio de la re-distribución de agua en gluten de masa congelada y su efecto en la proteína y cambios viscoelásticos".

Al Doctor Benjamín Ramírez Wong por la acertada dirección de esta investigación, por las horas dedicadas a la planeación, revisión y corrección de este trabajo. Por la gestión de recursos de equipamiento, materia prima y materiales didácticos.

A los Sinodales, Dra. Patricia Isabel Torres Chávez, Dra. Elizabeth Carvajal Millán, Dr. Jesús Manuel Barón Hoyos, y Dr. Luis Arturo Bello Pérez por dedicar tiempo a la revisión de esta tesis y por sus cuestionamientos que me ayudaron como guía para cumplir con los objetivos planteados. A la Dra. Dalia Isabel Sánchez Machado, por su colaboración durante los exámenes predoctorales.

A MUNSA MOLINOS, por medio del M.C. Javier Delgado, por proveernos de materias primas (trigo y levadura), durante toda la investigación.

Al personal académico, administrativo, de mantenimiento y de intendencia del DIPA, Coty Favela, María del Refugio Calderón, Gloria Pavlovich, Consuelo, Luis Ortega, Gabriel y Marina. Por estar siempre dispuestos a servir y ayudar cuando se necesitara. A los coordinadores del Posgrado Dr. Armando Burgos, Dra. Maribel Robles, Dr. Enrique Márquez,

Al laboratorio de molinos del DIPA por las facilidades para el uso del equipo para la elaboración de la harina, M.C. Ignacio Morales, M.C. Rafael Morales y M.C. Rafael Canet.

A los Departamentos de Ciencias Químico Biológicas y Polímeros de la Universidad de Sonora por las facilidades para el uso de sus instalaciones y equipo. Q.B. César Otero León, M.C Lucila Rascón Durán y Dra. Lorena Armenta Villegas.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por medio del Dr. Jaime Lizardi Mendoza por la disposición del equipo y asesoría para los preliminares de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Centro de Investigación en Materiales Avanzados y a la Universidad Autónoma de Chihuahua, por medio de c. Dr. Daniel Lardizábal Gutiérrez y Dr. Armando Quintero Ramos respectivamente, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo una estancia de investigación, bajo su asesoría.

Al M.C. Jesús Enrique Gerardo Rodríguez por su asistencia técnica para la realización de una parte de la investigación.

DEDICATORIA

A Dios Creador por llenarme de Bendiciones día a día y escuchar mis oraciones.

A mi hijo Francisco Abraham Espinoza Silvas por venir a llenar mi vida de felicidad y por hacer que todo tenga sentido.

A mi Esposo Francisco Javier Espinoza por apoyarme incondicionalmente en este proyecto personal, por alentarme cuando las cosas no iban bien y por celebrar conmigo cuando daba un paso más hacia la meta.

A mis Padres Jesús Silvas Terán y Estela García Durán, por ser mis manos y pies cuando más necesité de su apoyo, por ayudarme a continuar con este sueño.

A mis hermanos y sobrinos, Sara Haydeé Silvas García, Jesús Silvas García, Luis Edgardo Rodríguez V., Luis Alejandro Rodríguez Silvas, Sarahí Rodríguez Silvas y Samara Estefanía Rodríguez Silvas †, por su apoyo, sonrisas y palabras de aliento.

A mis profesores del posgrado por compartir sus conocimientos conmigo y dirigirme siempre hacia mis objetivos. Especialmente a los Doctores Benjamín Ramírez Wong y Patricia Isabel Torres, por su apoyo, por animarme a cumplir mis objetivos, por sus consejos profesionales y personales, y por tantas veces que creyeron en mí, aún cuando yo misma dudaba.

A mis compañeros de generación, Miroslava Suárez Jiménez, Néstor Ponce García, Carmen López Saiz, José Luis Espinoza Acosta, Anayansi Escalante Aburto, Yaeel Isbeth Cornejo Ramírez, Nidia Estrellita Buitimea Cantúa y Joe Luis Arias Moscoso, con quienes compartí experiencias de vida, profesionales y tantas y tantas horas de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Jesús Enrique Gerardo, Dra. Concepción Lorenia Medina, M.C. Refugio Ortega, Dra. Guadalupe Amanda López y Dra. María Guadalupe Salazar que con su amistad, colaboración, consejo y apoyo hicieron más fáciles y amenas las horas de trabajo.

A mis amigos y compañeros del DIPA Gabriel A. Barco y Norma Julieta Salazar, por ser parte importante de esta etapa, por su compañerismo desinteresado, por las buenas pláticas, por compartir las risas, alegrías, enojos y desilusiones.

A mis familiares, amigos y conocidos, que de alguna manera estuvieron contribuyendo con su ánimo, compañerismo, sus sonrisas y consejos.

A todos, muchas gracias...

María Irene

RESUMEN

La velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento de la masa provocan una redistribución de agua y conduce a la disminución de la actividad de la levadura, dañan a la red de gluten y al almidón; que de alguna forma se verá reflejado en la calidad del pan. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre la redistribución de agua, los cambios fermentativos, proteicos, reológicos y del almidón de masas congeladas, y la calidad del pan. Se prepararon y congelaron masas a una velocidad lenta (-0.14°C/min) o rápida (-1.75°C/min). Las masas, se almacenaron a -20°C durante 56 días. Cada 14 días se tomaron muestras de masas, se descongelaron, fermentaron y con parte de ellas se realizaron las diferentes evaluaciones y con otra parte se elaboró pan. A la masa congelada se le determinó la cantidad de agua libre y unida mediante termogravimetría, la entalpía de fusión de los cristales de hielo con calorimetría de barrido diferencial, además se calculó la cantidad de agua congelable. A la masa descongelada se le determinó el potencial de fermentación, la solubilidad de las proteínas por cromatografía líquida de exclusión molecular, la extensibilidad por el método de Kieffer; y la viscoelasticidad por el método dinámico. En masas liofilizadas, se evaluó la cantidad de almidón dañado por métodos enzimáticos, las propiedades de la pasta de masa liofilizada en un viscoamilógrafo rápido (RVA, por sus siglas en inglés), las propiedades de gelatinización por calorimetría diferencial barrido, y la microestructura se observó con un microscopio electrónico. Además, al pan elaborado, se le evaluó el volumen específico y la textura mediante el análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés). Para todas las evaluaciones se utilizó un diseño de experimento factorial de 2x5, siendo los factores la velocidad de congelación con 2 niveles (lenta -0.14°C/min o rápida -1.75°C/min) y el tiempo de almacenamiento con 5 niveles (0, 14, 28, 42 o 56 días). A todos los datos obtenidos de las diferentes determinaciones se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de 95%. Independientemente de la velocidad de congelación, los resultados indicaron que durante el tiempo de almacenamiento de la masa incrementaron significativamente ($p<0.05$) la cantidad de agua libre, entalpía de fusión y cantidad de agua congelable. La velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento afectaron muy significativamente ($p<0.01$), las propiedades fermentativas, proteicas y viscoelásticas de la

congelable. La velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento afectaron muy significativamente ($p<0.01$), las propiedades fermentativas, proteicas y viscoelásticas de la masa, además del volumen y la textura del pan. La interacción de la velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento afectó muy significativamente ($p< 0.01$) en la masa, la retención de CO_2, la proteína polimérica insoluble, su extensibilidad, el ángulo de fase en la viscoelasticidad, y en pan los parámetros de textura obtenidos con el TPA. La producción y retención de CO_2 en la masa disminuyó con el tiempo de almacenamiento, pero el efecto fue menor en masas congeladas obtenidas por velocidad de congelación rápida que con velocidad de congelación lenta. La extensibilidad de la masa disminuyó con el tiempo de almacenamiento, pero el efecto fue menor con la velocidad de congelación lenta. Las proteínas de gluten se solubilizaron con el tiempo de almacenamiento, pero el efecto fue menor para la velocidad de congelación rápida. El ángulo δ (viscoelasticidad) aumentó con el tiempo de almacenamiento, pero fue mayor con la velocidad de congelación lenta, lo que indica que aumentó la contribución de la parte viscosa de la masa. El volumen específico del pan disminuyó con el tiempo de almacenamiento, pero el efecto fue menor con la velocidad de congelación lenta. La textura del pan fue mejor con la velocidad de congelación lenta. El tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo sobre los cambios en el almidón. El almidón dañado tuvo un incremento significativo ($p<0.05$) mayor para la masa congelada a una velocidad lenta que para la masa congelada a una velocidad rápida. El pico máximo de viscosidad tuvo un descenso significativo ($p<0.05$) mayor para la velocidad de congelación lenta que para la velocidad de congelación rápida. La entalpía de gelatinización del almidón tuvo un incremento significativo ($p<0.05$), y fue menor para la velocidad de congelación lenta que para la velocidad de congelación rápida. Durante el tiempo de almacenamiento, los gránulos de almidón se separaron de la matriz de gluten. La redistribución de agua en masas congeladas para pan, durante el proceso de congelación y el almacenamiento, afectaron las propiedades fisicoquímicas y de panificación. Independientemente de la velocidad de congelación, el tiempo de almacenamiento fue principal factor que afectó la redistribución de agua y a las propiedades fisicoquímicas de la masa y la calidad d panificación. El aumento en la cantidad de agua libre, entalpía y agua congelable, es evidencia clara de que la migración de agua después de formarse los cristales independientemente de la velocidad de congelación, y esta continúa durante el almacenamiento. La redistribución de agua, provoca la caída en el pH,

disminución en la retención de CO_2, la depolimerización de las proteínas del gluten, aumenta la contribución viscosa en la masa y la disminución en la extensibilidad, además de modificación de las propiedades y microestructura del almidón. En el pan provoca una disminución del volumen y un aumento en la firmeza de la miga. Estos cambios son más pronunciados cuando la masa se congeló a una velocidad rápida. Por otro lado, la velocidad de congelación lenta y periodos cortos (28 días) de almacenamiento mantienen la mejor calidad de pan.

ABSTRACT

Freezing rate and storage time in frozen dough cause a redistribution of water and leads a decrease in yeast activity, causes a damage in gluten network and starch; all of these will be reflected in the quality of dough and bread. The aim of this research was to evaluate the effect of freezing rate and storage time on water redistribution, and changes in fermentation capacity, protein fractions, viscoelasticity and starch of frozen dough, and in bread quality. Dough was prepared and frozen at slow freezing rate (-0.14°C/min) or fast freezing rate (-1.75°C/min). Subsequently, dough was stored at -20°C for 56 days. Every 14 days, dough was sampled, thawed, and fermented. Dough evaluations were: amount of free and bound water and the enthalpy of fusion of the ice crystals, amount of freezable water, fermentation potential, protein solubility with size exclusion liquid chromatography, extensibility, and viscoelasticity with the dynamic method. In addition, the amount of starch damaged was determined with enzymatic methods, starch paste properties in a rapid viscoamylograph (RVA), gelatinization properties with differential scanning calorimetry and the microstructure of the dough was observed using an electron microscope. Bread quality evaluations were: specific volume and texture with the texture profile analysis (TPA) test. A factorial design experiment 2x5 was used for all evaluations, where the factors were the freezing rate with two levels (slow rate, -0.14°C/min or fast rate, -1.75°C/min) and storage time with 5 levels (0, 14, 28, 42 o 56 days). Results indicated that during the storage time, in dough the amount of free water, melting enthalpy of ice and amount of freezable water increased significantly ($p<0.05$). The freezing rate and storage time had a large significant effect ($p<0.01$) on retention of CO_2, insoluble polymeric protein, extensibility, viscoelasticity (phase angle) and bread volume and bread texture. Production and retention of CO_2 in dough decreased with storage time, but the effect was lower in frozen dough obtained at fast freezing rate than at slow freezing rate. Dough extensibility decreased with storage time, but the effect was significantly less at slow freezing rate than at fast freezing rate. Gluten proteins solubilized with storage time, but the effect was significantly less at slow freezing rate than with fast freezing rate. The angle δ (viscoelasticity) increased with storage time but was higher at slow freezing rate than at fast freezing rate; indicating an increase in dough viscosity. The specific bread volume decreased with storage

time, but the effect was significantly less at slow freezing rate than at fast freezing rate. Bread texture was significantly better when dough was frozen at slow freezing rate. Storage time had a significant effect on the changes produced in the starch fraction within dough structure. Damaged starch increase significantly ($p < 0.05$) for dough frozen at a slow freezing rate than at fast freezing rate. Peak viscosity decrease significantly ($p < 0.05$) for dried dough, being higher at slow freezing rate than at fast freezing rate. Gelatinization Enthalpy of starch increased significantly ($p < 0.05$), being lower for slow freezing rate than for fast freezing rate. During the storage, starch granules were separated from the gluten matrix. Redistribution of water in bread prepared from frozen dough affected physicochemical and baking properties during freezing and storage. Regardless of freezing rate, the storage time was the main factor affecting the redistribution of water, physicochemical properties of dough and bread quality. The increase in the amount of free water, melting ice enthalpy and freezable water clearly evidence that the migration of water after forming crystals for both freezing rates continues during storage. The redistribution of water caused a decrease in dough pH, a reduction of CO_2 retention, depolymerization of the gluten proteins, an increase viscous element and a decrease in extensibility and a modification of the properties and microstructure of starch. Redistribution of water also causes a reduction in bread volume of bread and an increase in crumb firmness. These changes are more pronounced when dough is frozen at a fast freezing rate. Furthermore, slow freezing and short storage periods (28 days) maintain the best quality of bread.

CONTENIDO

Página

DERECHOS DE AUTOR iii
GRADECIMIENTOS iv
DEDICATORIA v
RESUMEN vi
ABSTRACT ix
CONTENIDO xi
CAPITULO 1 1
INTRODUCCIÓN 1
CAPITULO 2 4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4
Importancia de la Tecnología de la Congelación en la Calidad y Conservación de la masa para pan 4
Procesos de congelación en masa para pan 5
Principales cambios durante la congelación de la masa 7
Cambios en la redistribución de agua 7
Cambios en las propiedades fermentativas 9
Cambios en las propiedades proteicas y viscoelásticas 10
Cambios en el almidón 11
Cambios en el pan 12
HIPÓTESIS 14
OBJETIVOS 15
General 15
Particulares 15
CAPÍTULO 3 16
DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN 16
CAPÍTULO 4 22
Revisión Bibliográfica publicada: Cambios Fisicoquímicos en Masa Congelada y su Efecto en la Calidad del Pan 22
Artículo de Revisión: Cambios fisicoquímicos en masa congelada y su efecto en la calidad del pan: una revisión 22
CAPÍTULO 5 30
Etapa 1: Cambios en la Redistribución de Agua en Masa Congelada 30
Artículo científico: Effect of freezing rate and storage time in the freezable water of bread dough using thermal analysis 32

CAPÍTULO 6 49
Etapa 2: Cambios en las Propiedades Fermentativas, Proteicas y Reológicas en Masa Congelada y Calidad del Pan 49
Artículo científico: Effect of freezing rate and storage time on gluten protein solubility, and dough and bread properties 53
CAPÍTULO 7 65
Etapa 3: Cambios en el Almidón de Masa Congelada 65
Artículo científico: Effect of freezing rate and storage on rheological, thermal and structural properties of wheat dough 67
CONSIDERACIONES FINALES 90
CONCLUSIONES 91
RECOMENDACIONES 93
REFERENCIAS 94
ANEXO 1 ..... A-1
Publicaciones A-1
ANEXO 2 ..... A-2
Producción científica A-2
ANEXO 3 ..... A-3
Estancias de Investigación A-3

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El pan es un alimento básico para muchas culturas y es muy consumido en casi todo el mundo (Anon et al., 2004). Por ser un producto de humedad intermedia, es susceptible al deterioro por hongos (Cauvain, 2003). Además, pierde rápidamente su frescura, el aroma característico y se endurece (Bárcenas et al., 2003). Los cambios en la calidad del producto y el envejecimiento del pan conllevan grandes pérdidas económicas para los productores, debido a que el pan es desechado (Yi y Kerr, 2009). Para evitar dichas pérdidas, se han propuesto alternativas para conservar tanto la masa como el pan, entre ellas la congelación (Madrid, 1999; Cox, 1987). La aplicación de esta tecnología en los procesos de panificación ofrece grandes ventajas como: optimiza la producción, y ayuda a crear un equilibrio entre la manufactura y la venta (Calaveras, 1996). Además, facilita el transporte y distribución de las masas hacia los puntos de venta (Casey y Foy, 1995). Sin embargo, la congelación tiene un efecto negativo sobre la calidad del pan, ya que ocurre una disminución de la calidad en general, como un menor volumen, textura más firme, pérdida del aroma y cambios en el color. Dichos cambios en la calidad del pan están relacionados con los principales componentes de la masa: agua, gluten y levadura (Hosomi et al., 1992).

Durante el proceso de elaboración de la masa congelada, la materia prima y la hidratación de la harina juegan un papel muy importante (Olivera, 2011; Inoue y Bushuk, 1992). La elaboración de la masa puede ser manual o mecanizada, pero los elementos básicos para formar una masa elástica son: harina, agua y energía (Veraverbeke y Delcour, 2002). La interacción entre los componentes de la harina y el agua con cierta energía, promueven enlaces que ayudan a la formación de la red de gluten con propiedades viscoelásticas (Bushuk y MacRitchie, 1989). Dentro de las interacciones químicas que ocurren en el amasado están los puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, interacciones hidrofóbicas, polares y no polares, enlaces iónicos, entre otros (Arpita y Datta, 2008; Aibara et al., 2005; Cauvain, 2003).

Después del amasado, el agua queda homogéneamente distribuida en la masa, interaccionando principalmente con las proteínas del gluten y componentes polares.

Durante la congelación el agua que se encontraba distribuida dentro de los poros de la masa, se disloca y migra para formar cristales de hielo (Cauvain y Young, 2008). La velocidad con que se lleve a cabo el enfriamiento determina el tamaño y la forma de los cristales (Singh y Heldman, 2001). El tamaño y la ubicación de estos modifican las propiedades de la masa, debido a que el agua queda acumulada en forma de cristales fuera de los poros (Kulp, 1995). Para la velocidad de congelación lenta (< 1°C/min) se forman depósitos de cristales grandes ubicados de forma heterogénea en la masa, mientras que en la velocidad de congelación rápida (>1°C/min), se forman cristales pequeños ubicados de forma homogénea en la masa (Laaksonen y Ross, 2000). De ahí que existan zonas en donde se concentra el agua libre y ocurren una serie de cambios químicos y bioquímicos durante el almacenamiento (Baier-Shenk et al., 2005; Esselink et al., 2003; Nicolas et al., 2003). Los cambios en el tamaño de los cristales de hielo en masas congeladas se pueden estudiar por varias técnicas entre ellas, la calorimetría diferencial de barrido, esto debido a que es un método ampliamente utilizado en los alimentos y ha sido aplicado también para cuantificar el contenido de cristales de hielo en masa de trigo, reportándose como la entalpía de fusión de dichos cristales (Baier-Shenk et al., 2005; Bot, 2003). Además, se cuenta con el análisis termogravimétrico que ayuda a conocer la cinética de pérdida de peso durante la desecación de las muestras, y se puede calcular la cantidad de agua libre y ligada, debido a que la resistencia a la remoción de agua será dada por la forma en que esté interaccionado el agua con los demás componentes (Roozendaal et al., 2012).

De acuerdo a lo anterior, al haber una redistribución de agua durante la migración para la formación de cristales de hielo ocurre un cambio en la proporción de agua libre con respecto a la que había en la masa sin congelar (Seguchi et al., 2003; Ribotta, 2002; Rasanen et al., 1998). Esto impacta las propiedades de la masa durante la descongelación, debido a que el agua sale de la matriz gluten-almidón y ya no vuelve a su ubicación original, lo que cambia las características de la masa (Bohem et al., 2004; Nicolas et al., 2003). El mayor impacto de la redistribución de agua se asocia con cambios en el gluten y levadura. Esto debido a que durante la congelación ocurre una deshidratación de estos componentes, y durante el

almacenamiento a temperaturas de congelación dichos cambios se acentúan (Baier-Shenk et al., 2005; Esselink et al., 2003; Nicolas et al., 2003). En el caso del gluten suceden cambios conformacionales, debido a la modificación del ambiente químico que lo rodea y se promueven reacciones de hidrólisis y por tanto ruptura de la red (Varriano-Marston et al., 1980; Berglung et al., 1991). En el caso de la levadura, cuando los cristales que la rodean son muy grandes, la célula sufre una deshidratación para mantener un equilibrio osmótico (Meryman, 1968). Cuando se forman cristales pequeños dentro del citoplasma de la levadura, estos pueden recristalizar y romper la membrana celular (Singh y Heldman, 2001; Kulp, 1998; Casey y Foy 1995).

Los cambios en la red de gluten y levadura durante la congelación y almacenamiento dan como resultado cambios muy significativos en las propiedades de la masa y en la calidad del pan (Matuda et al., 2008; Huang et al., 2008a; Panadero et al., 2005; Sharadanant y Khan, 2003). Entre esos cambios se incluyen: pérdida de la resistencia a la extensión y debilitamiento de la estructura de la masa, cambios en las propiedades reológicas de las masas, cambios en las propiedades fermentativas de la levadura, disminución del volumen del pan, endurecimiento del pan y pérdida del olor y sabor (Ribotta et al., 2005, Kenny et al., 1999; Lu y Grant 1999; Autio y Sinda 1992). Por lo anterior, es importante evaluar los cambios en la redistribución del agua en la masa congelada. El objetivo de esta investigación fue estudiar algunos factores que afectan la redistribución del agua en masas congeladas utilizadas para la elaboración de pan y su efecto sobre sus propiedades fisicoquímicas y de calidad de panificación.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Importancia de la Tecnología de la Congelación en la Calidad y Conservación de Masa para Pan

Los productos de panificación son muy importantes en la alimentación mundial, al igual que todos los alimentos, tienen una vida corta de anaquel desde que salen del horno hasta que el cliente los consume. Uno de los principales problemas de la duración corta del pan es el envejecimiento o endurecimiento, causado por la retrogradación del almidón, además del desarrollo de una corteza firme y una resequedad aparente durante el almacenamiento prolongado.

Durante el almacenamiento, se pierde la frescura del pan, paralela a un incremento en la dureza de la miga, lo que provoca una menor aceptación del consumidor. Este es un proceso complejo que involucra varios cambios físico-químicos. Sin embargo, conociendo que el almidón es el constituyente mayoritario en la miga del pan, los cambios físicos que acompañan a la retrogradación del almidón han sido propuestos como la principal causa de endurecimiento del pan (Bárcenas et al., 2003). A pesar del gran consumo de pan, una gran cantidad es desechada como consecuencia del envejecimiento. Este 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 pérdida económica importante. 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. La congelación es una de las técnicas que se está imponiendo para la conservación y distribución en el mercado de

productos de panificación (Madrid, 1999). Este proceso proporciona un excelente método de conservar productos de panadería que, de otra manera, sólo permanecerían frescos y aceptables en un corto periodo. Algunas masas sin hornear o "crudas" se congelan bien y constituyen una buena alternativa si no se dispone de suficiente tiempo para hornear la producción (Cox, 1987).

En este sistema de elaboración, la producción de las piezas de masa es centralizada, en tanto que la etapa de horneado es descentralizada en pequeños comercios próximos al consumidor, lo que permite brindar pan fresco en todo momento. En los puntos de ventas, a medida que el producto se consume, se hace la descongelación, la fermentación en piezas y el horneado. La producción de masas congeladas, en la mayoría de los casos, se realiza a través de procesos altamente mecanizados, lo que reduce los costos de producción y permite obtener productos con calidad constante. La aplicación del frío a las masas empleadas en la producción de pan es una metodología que ayuda a resolver muchos de los problemas que tienen los panaderos con su comercialización (Calaveras, 1996).

La demanda de productos elaborados a partir de masas congeladas ha aumentado de acuerdo a los tipos de panes existentes, sin embargo, hay diversos problemas en la obtención de productos de buena calidad. Actualmente, en el proceso popular de elaboración de masas congeladas, la masa es descongelada, fermentada y horneada para servir al cliente como un pan recién elaborado. No obstante, las características atractivas sensoriales del pan fresco, el almacenamiento de las masas congeladas por varias semanas causa problemas en el producto final tal como un decremento de la producción de gas y debilidad de la masa, lo cual se ve reflejado en el volumen final de la hogaza (Hosomi et al., 1992).

Procesos de congelación en masa para pan

El nombre de "masa congelada" se refiere a la habilidad del producto para ser congelado por largos períodos y sin variaciones de calidad en el producto después del horneado (Sultan, 1990). La congelación está basada en el principio físico de la separación del agua de la masa, y como resultado da la formación de cristales a temperaturas por debajo de los 0°C. La formación de hielo provoca microestructuras en los alimentos. En general, grandes cristales de hielo son formados por un proceso de velocidad de congelamiento lento, mientras que uno

de velocidad de congelamiento rápido, forma gran cantidad de pequeños cristales de hielo. Por lo tanto, una rápida velocidad de congelado promueve una cristalización de hielo más uniforme por todo el material, lo cual induce una alta calidad del producto congelado en la mayoría de los alimentos (Laaksonen y Ross, 2000).

En el ámbito industrial, en este proceso se realiza el amasado de los ingredientes de la misma manera que se hace para la elaboración de productos frescos, luego se forman las piezas y se congelan hasta que el centro alcanza una temperatura de –18°C, y se distribuyen en estado congelado. El proceso para la producción de masas congeladas tiene como objetivo dañar lo menos posible las células de levadura o mantenerlas viables y en dormancia (Serna-Saldivar, 2001). La masa puede congelarse en cantidades adecuadas después del mezclado y amasado, transferirla inmediatamente a una bolsa de polietileno grueso y guardar en el congelador. Esta masa, sin fermentar, puede conservarse satisfactoriamente hasta un mes (Cox, 1987). El proceso industrial de preparación de masas congeladas es un poco más exigente en requerimientos de materia prima e ingredientes mejoradores, por lo que requiere de determinados ajustes a las formulaciones (Serna-Saldivar, 2001). La estabilidad de vida de anaquel en la masa congelada es definida como la habilidad de descongelar la masa a prueba en un periodo de tiempo aceptable y hornear la hogaza con un volumen y características del pan fresco (Wolt y D'Appolonia, 1984).

Los productos alimenticios a congelarse son sometidos de forma rápida a temperaturas muy bajas. El enfriamiento del producto puede ser: Enfriamiento lento en cámaras sin circulación de aire. Es el proceso menos adecuado ya que se producen pérdidas de peso por evaporación del agua. Además, daña la estructura del producto y se pierden sabores y aromas típicos del pan. El enfriamiento rápido en túneles de congelación o cámaras con circulación de productos frigorígenos (nitrógeno líquido o dióxido de carbono) evitan pérdidas de humedad y así se mantiene mejor estructura del producto, el aroma y sabor típicos (Madrid, 1999). Para poder entender como ocurre el proceso de congelación y de qué manera llevarlo a cabo para obtener un producto mejor al finalizar el proceso, se debe considerar en un principio la composición de la masa y el comportamiento de sus diversos componentes durante el proceso de enfriamiento.

Principales cambios durante la congelación de la masa

El efecto de la congelación y el almacenamiento en congelación de la masa y las propiedades de cocción sobre su rendimiento ha sido sujeto de una serie de investigaciones (Sharadanant y Khan, 2003; Panadero et al., 2005; Huang et al., 2008b; Matuda et al., 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 las estructura del gluten, cambios en el potencial de fermentación de la levadura, cambios en la distribución del agua, entre otros (Baier-Shenk et al., 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 (Aibara et al., 2005).

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 (Dodi'c et al., 2007).

El agua que estaba distribuida dentro de los poros de la masa, se disloca y migra para formar cristales de hielo (Cauvain y Young, 2008). La velocidad con que se lleve a cabo el enfriamiento determina el tamaño y la forma de los cristales (Singh y Heldman, 2001). El tamaño y la ubicación de estos modifican las propiedades de la masa, debido a que el agua queda acumulada en forma de cristales fuera de los poros (Kulp, 1995). Para la velocidad de congelación lenta (<1 °C/min) se forman depósitos de cristales grandes ubicados de forma heterogénea en la masa (Grout et al., 1991), mientras que en la velocidad de congelación rápida (>1 °C/min), se forman cristales pequeños ubicados de forma homogénea en la masa (Laaksonen y Ross, 2000). De ahí que existan zonas en donde se concentra el agua libre y que ocurren una serie de cambios químicos y bioquímicos durante el almacenamiento (Baier-Shenk et al., 2005; Esselink et al., 2003; Nicolas et al., 2003). Los cambios en el tamaño de

los cristales de hielo en masas congeladas se pueden estudiar por varias técnicas entre ellas, la calorimetría diferencial de barrido debido a que es un método ampliamente utilizado en los alimentos y ha sido aplicado también para cuantificar el contenido de cristales de hielo en masa de trigo, reportándose como la entalpía de fusión de dichos cristales (Baier-Shenk et al., 2005; Bot, 2003). Además, el análisis termogravimétrico ayuda a conocer la cinética de pérdida de peso durante la desecación de las muestras y se puede calcular la cantidad de agua libre y ligada, debido a que la resistencia a la remoción de agua será dada por la forma en que esté interaccionado el agua con los demás componentes (Roozendaal et al., 2012).

De acuerdo a lo anterior, al haber una redistribución de agua durante la migración para la formación de cristales de hielo ocurre un cambio en la proporción de agua libre con respecto a la que había en la masa sin congelar (Seguchi et al., 2003; Ribotta, 2002; Rasanen et al., 1998). Esto impacta las propiedades de la masa durante la descongelación, debido a que el agua sale de la matriz gluten-almidón y ya no vuelve a su ubicación original, lo que cambia las características de la masa (Bohem et al., 2004; Nicolas et al., 2003). El mayor impacto de la redistribución de agua se asocia con cambios en el gluten y levadura. Esto debido a que durante la congelación ocurre una deshidratación de estos componentes y durante el almacenamiento dichos cambios se acentúan (Baier-Shenk et al., 2005; Esselink et al., 2003; Nicolas et al., 2003). En el caso del gluten acontecen cambios conformacionales, debido a la modificación del ambiente químico que lo rodea y se promueven reacciones de hidrólisis y por tanto ruptura de la red (Varriano-Marston et al., 1980; Berglung et al., 1991). En el caso de la levadura, cuando los cristales que la rodean son muy grandes, la célula sufre una deshidratación para mantener un equilibrio osmótico (Meryman, 1968). Cuando se forman cristales pequeños dentro del citoplasma, estos pueden recristalizar y romper la membrana celular (Singh y Heldman, 2001; Kulp, 1998; Casey y Foy 1995).

Cambios en las propiedades fermentativas. La congelación de la masa reduce considerablemente la actividad de las levaduras, las enzimas, los microorganismos y los procesos exudativos. Para lograr estos efectos, la temperatura del centro de la masa deberá estar por debajo de -15° a -18 °C. Este proceso trae a la par un gran número de problemas durante la elaboración de masas. Varios autores mostraron que el congelamiento rápido reduce la capacidad de producción de gas y el número de células viables (Wolt y D'Appolonia 1984; Autio y Sinda, 1992; Inoue et al., 1994; El-Hady et al., 1996). Si bien, gran parte del daño a las células se produce durante el proceso de congelación, las condiciones y el tiempo de almacenamiento en estado congelado afectan también a las levaduras. Ribotta et al., (2003) encontraron que la pérdida de células de levaduras aumentó con el tiempo de almacenamiento a -18 °C, llegando a un 52.4% del número inicial después de 90 días de almacenamiento en congelación.

Para comprender los efectos de la congelación y la descongelación sobre la viabilidad y actividad de las levaduras es necesario revisar la respuesta de los sistemas biológicos en el proceso de congelación. Pese a que la temperatura de congelación del citoplasma es aproximadamente -1 °C, la célula permanece sin congelar y en consecuencia sub enfriada, hasta -10 o -15 °C, aun cuando el hielo está presente en el medio externo. El agua sub enfriada dentro del citoplasma tiene una presión de vapor más alta que el hielo que rodea la membrana, y la célula comienza a equilibrar esta diferencia de presión perdiendo agua a través de la membrana celular. Esta deshidratación produce la concentración de los solutos en el interior de las células y disminuye la presión de vapor del agua intracelular. El movimiento de agua establece un equilibrio entre el interior de la célula y sus alrededores. Sólo si la temperatura es reducida por debajo de -15°C puede comenzar la formación de cristales de hielo dentro del citoplasma. La cantidad de agua removida de la célula es dependiente del tiempo en que la célula se mantiene entre -1 y -15°C (período que dura el equilibrio mencionado). Si la velocidad de enfriamiento es demasiado rápida y la célula contiene agua sub enfriada, cuando la temperatura cae por debajo de los -15°C, el equilibrio se completa por la congelación intracelular. Los eventos producidos durante el proceso de congelación de las células dependen de la velocidad de enfriamiento y de la permeabilidad de la membrana (Casey y Foy 1995).

Las investigaciones realizadas hasta el presente sugieren que el efecto letal en un enfriamiento rápido de las células de levadura es el crecimiento de los cristales intracelulares en lugar de la formación inicial de cristales grandes. Se especula que el daño ocurre porque la re cristalización produce suficiente fuerza para romper la membrana plasmática o las membranas de organelos como la mitocondria (Casey y Foy 1995). Los efectos de solución son responsables del daño celular cuando la velocidad de enfriamiento es más baja que la optima. En cambio, la congelación intracelular es responsable cuando el enfriamiento es demasiado rápido. La velocidad de enfriamiento óptima debería ser lo suficientemente baja para prevenir la formación de hielo intracelular, pero lo suficientemente alta para minimizar el tiempo de exposición de la célula a los efectos de solución (Mazur, 1965; Mazur, 1970; Hsu et al., 1979; Casey y Foy 1995). La formación de cristales y la re cristalización de hielo pueden, además, inducir daño en la red tridimensional de proteínas de la masa y afectar las propiedades de retención de gas y la fuerza. La estabilidad de los productos congelados también puede ser afectada por los metabolitos de la fermentación de las levaduras.

Hsu et al. (1979), mostraron que las levaduras en masas congeladas pueden sufrir pérdida parcial en su capacidad de fermentación por los efectos fisiológicos sobre las células, que son mejorados por la fermentación previa a la congelación y por los efectos de ciertos metanolitos de la fermentación. Aunque no identificaron estos metanolitos, el agregado de 2.5% de etanol causa pérdidas significativas en la capacidad de producción de gas de las levaduras. Además, es posible que estos metanolitos sean un importante factor en la estabilidad de las levaduras congeladas y produzcan efectos concomitantes en las propiedades de las masas (Kulp, 1995).

Cambios en las propiedades proteicas y viscoelásticas. 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 et al., 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 et

al., 1979; Ribotta et al., 2001; Varriano-Marston et al., 1980). Masas con cantidades altas de proteína de buena calidad, tienen mayor cohesividad y extensibilidad (Saxena et al., 1997).

Singh et al. (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 modifican 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 et al., 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 et al., 2001).

Cambios en el almidón. Las alteraciones producidas por el proceso de congelación de la masa sobre el almidón de la misma también han recibido cierta atención. Wolt y D'Appolonia (1984) aislaron almidón soluble de miga de pan elaborado con masa congelada y no congelada. El contenido de amilosa y amilopectina y la proporción amilosa/amilopectina disminuyeron con el incremento del tiempo en estado congelado. Estos investigadores sugirieron que los cambios registrados se debieron probablemente al aumento del tiempo de fermentación y no estuvieron directamente relacionados con la congelación de la masa, esto debido a que los cambios descritos fueron similares a los que acompañan al envejecimiento del pan convencional.

Autio y Sinda (1992), encontraron que la congelación y la descongelación aumentaron la temperatura de inicio de la gelatinización del almidón, medida por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Este cambio pudo deberse a una demora en la velocidad de difusión del agua o a un aumento de la cristalinidad en los gránulos de almidón. Por otro lado, otros trabajos (Lu y Grant 1999; Ribotta et al., 2003) discutieron que la temperatura de inicio de la gelatinización del almidón disminuyó como consecuencia del almacenamiento de la masa a -18 °C. Con respecto a la energía involucrada en el proceso de gelatinización y de fusión de los cristales de almidón, los resultados obtenidos mostraron que el almacenamiento congelado de la masa produjo un aumento de la entalpía involucrada en estos procesos. Cuando a una muestra que contiene almidón previamente gelatinizado (como

ocurre en el proceso de horneado del pan) se le permite enfriar, se forma un gel. Con el tiempo, las moléculas de almidón pueden reasociarse y desarrollar una estructura semi-cristalina. Al mismo tiempo se produce un incremento en la rigidez de la matriz, y una separación del solvente del polímero. Este fenómeno es conocido como retrogradación. Ribotta et al. (2003), estudiaron el efecto de la congelación y el almacenamiento congelado sobre la retrogradación de la amilopectina. Los resultados obtenidos muestran que mientras mayor es el tiempo que la masa es mantenida a -18 °C, más extensa es la retrogradación de la amilopectina en la miga de pan. La misma tendencia fue observada previamente en masa congelada durante un mes a -18 °C, cocida y envejecida a temperatura ambiente (León et al., 1997).

Generalmente se acepta que la retrogradación del almidón, medida por DSC, es afectada por diferentes factores, tales como el contenido de agua, de lípidos y otros ingredientes (Biliaderis y Galloway, 1990). Zeleznak y Hoseney (1986) mostraron que la entalpía de retrogradación en geles de almidón (con 50% de agua) y en panes (con 30 a 40% de agua) depende del contenido de agua de la muestra durante el almacenamiento. La magnitud del pico de fusión de la amilopectina fue controlada por la disponibilidad de agua durante el proceso de retrogradación, mientras que el contenido de agua durante la gelatinización tuvo poco efecto. Lu y Grant (1999) discutieron que la cantidad de agua no congelable (medida por DSC) en masas congeladas aumenta con el tiempo de almacenamiento a temperaturas bajo cero. Los procesos de separación del agua (por formación de hielo) y re cristalización del hielo podrían inducir cambios en la estructura y la disposición de la amilosa y la amilopectina, además de afectar la estructura del gluten. Tales cambios parecen reflejarse durante la gelatinización y la retrogradación del almidón.

Cambios en el 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 et al., 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 et al., 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 et al., 2005; Huang et al., 2008b; Matuda et al., 2008).

Sin embargo, las masas congeladas todavía tienen problemas para producir panes de buena calidad (Aibara et al., 2005; Varriano-Marston et al., 1980). De acuerdo a Sahlstrøm et al. (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-shenk et al., 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 endurecimiento, 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 et al., 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, 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 et al., 2008).

HIPÓTESIS

Las propiedades fisicoquímicas y de panificación en masas congeladas están afectadas por la redistribución del agua durante el proceso de congelación y el almacenamiento.

OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre la redistribución del agua en masas congeladas utilizadas para la elaboración de pan, así como el efecto sobre sus propiedades fisicoquímicas y de panificación.

Específicos

1. Evaluar los cambios en la redistribución del agua congelable a diferentes velocidades de congelación y tiempos de almacenamiento en masas congeladas.

2. Evaluar el efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento en los cambios fermentativos, estructurales del almidón, proteínas del gluten, y propiedades viscoelásticas en masas congeladas.

3. Evaluar los efectos de la redistribución del agua en el volumen y textura del pan elaborado de masas congeladas.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se dividió en 4 secciones (Figura 1), que corresponden a la revisión bibliográfica y a las 3 etapas experimentales, para el desarrollo de cada uno de los objetivos planteados. En la Figura 2 se describen las etapas experimentales. El trabajo realizado en cada una de ellas derivó en la escritura y publicación de artículos científicos. Los artículos fueron publicados (o en vías de publicarse) en revistas indizadas.

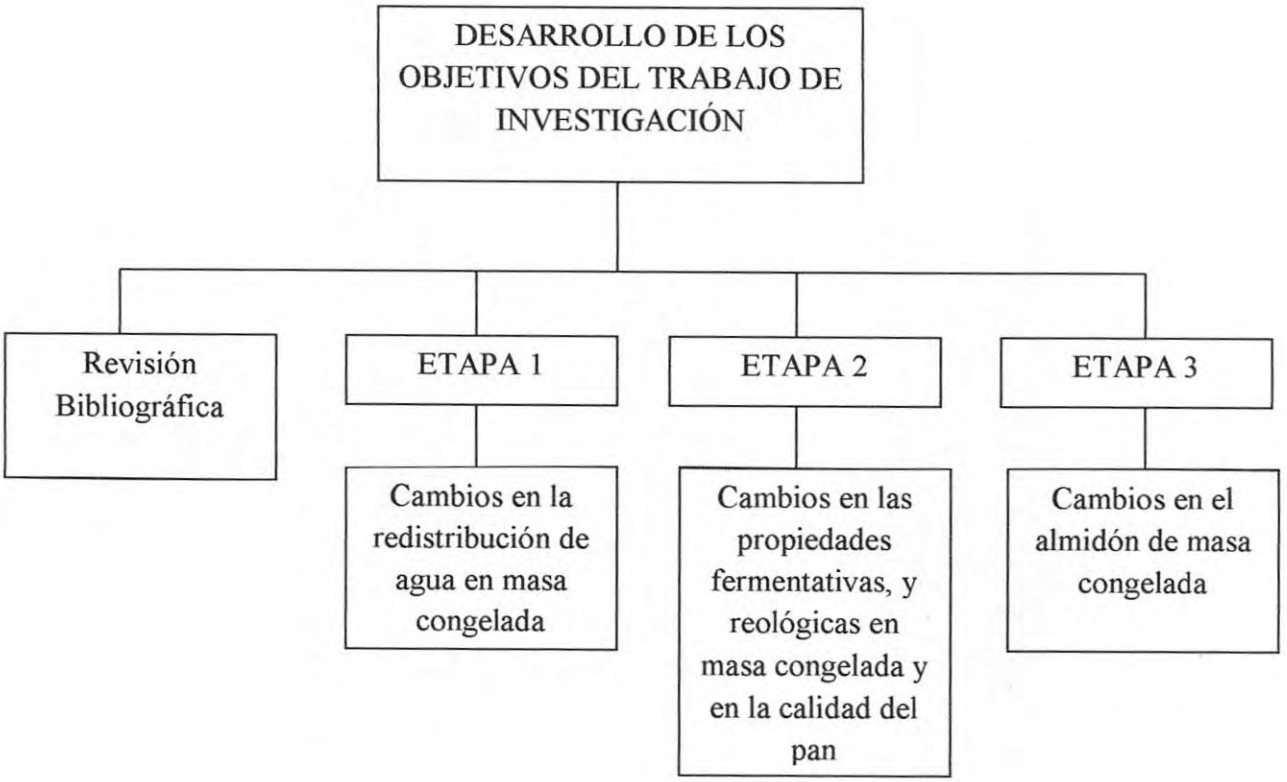


Fig. 1. Representación esquemática del desarrollo del trabajo de investigación.

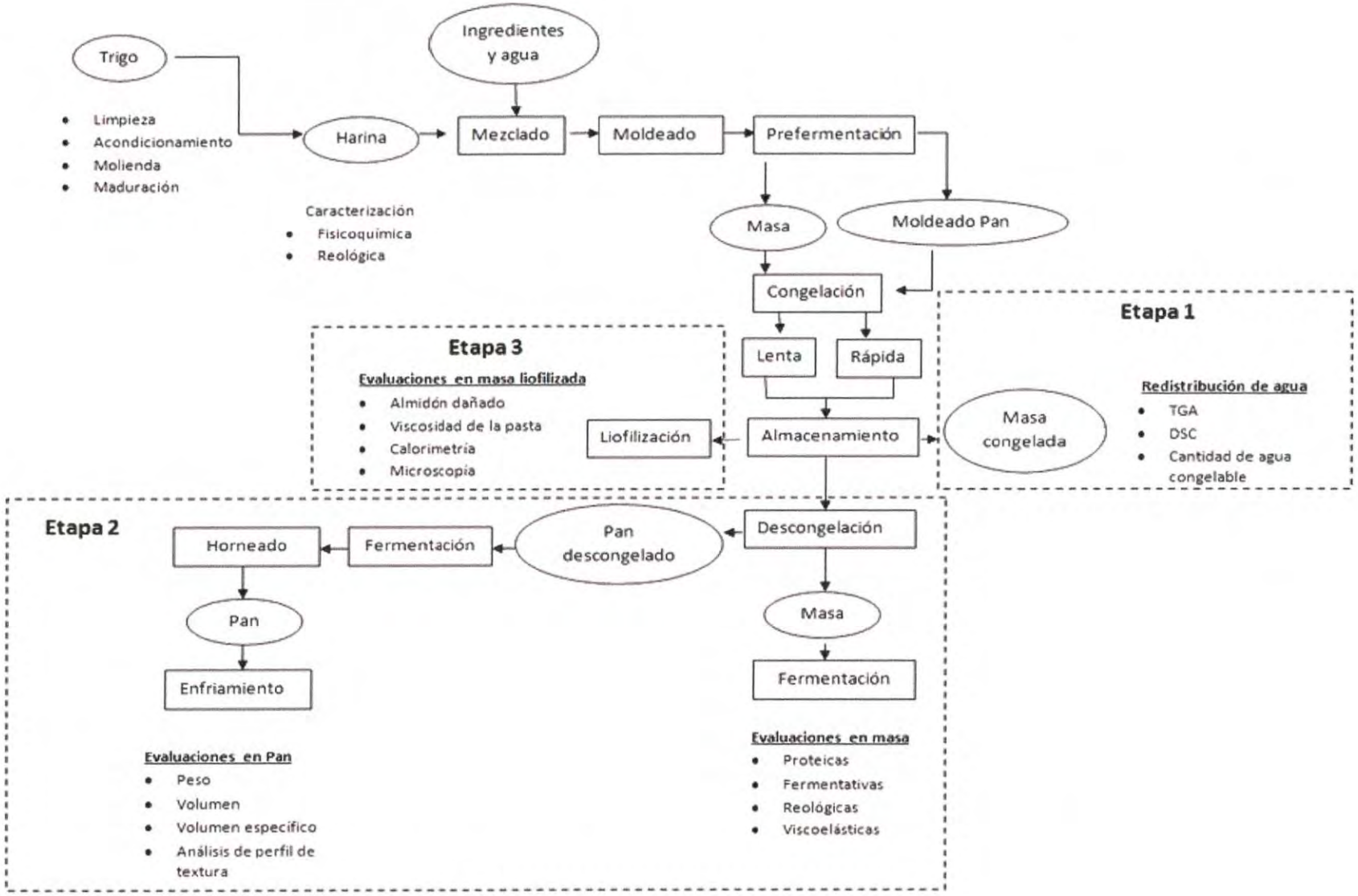


Fig. 2 Diagrama General de la investigación

Materia Prima

Se utilizó harina elaborada a partir de trigo Kronstand. El trigo y la levadura húmeda comprimida, (Levadura Azteca, AZTECA S.A. de C.V., proporcionada por MUNSA molinos S.A de C.V.), fueron proporcionados por MUNSA (Ciudad Obregón, Sonora, México). Otros 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.), los cuales se obtuvieron del mercado local y se almacenaron en condiciones de refrigeración.

Elaboración de la Harina

Se utilizó trigo de la variedad Kronstand cosecha 2011, del Valle del Yaqui, proporcionado por MUNSA molinos S.A. de C.V. El trigo se limpió con un equipo de criba (marca Clipper, modelo M2BC), para eliminar el material extraño al trigo. Luego se terminó de limpiar de forma manual con ayuda de zarandas y se colocó en bolsas de polietileno para su posterior acondicionamiento y molienda. Una vez que se determinó la humedad del grano, se adicionó agua para llevar su contenido a un 15%, en un acondicionador (marca Chopin Instruments, Villeneuve-La-Garenne, France), posteriormente el grano con agua se dejó reposar durante 24 h, siguiendo el método 29-95 de la AACC (2000). Para la molienda se utilizó un molino experimental (marca Brabender, modelo Senior Quadramat) para obtener la harina blanca de acuerdo al método 26-10 de la AACC (2000). Después de la molienda, se pesaron las fracciones de harina para obtener el porcentaje de rendimiento harinero, posteriormente la harina se almacenó para su reposo durante dos semanas.

Evaluación de la Calidad de la Harina

A la harina se le realizó un análisis químico de acuerdo a las técnicas de la A.A.C.C (2000): contenido de humedad (método 44-40), contenido de ceniza (método 08-03) y contenido de proteína (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 N x 5.7. Volumen de

sedimentación Zeleny, (método 56-61 A), contenido de Gluten (método 38-11) y actividad del ion Hidrógeno (pH) (método 02-52). El contenido de almidón total se llevó a cabo con el Kit enzimático Megazyme (2011) método de la amiloglucosidasa/α-amilasa (K-TSTA 07/11). El almidón dañado se determinó con el Kit enzimático Megazyme (2011) (K-SDAM 07/11). Además se llevaron a cabo pruebas reológicas de acuerdo al de la A.A.C.C. (2000), método farinográfico 54-21, se utilizó un farinógrafo (marca Brabender Instruments, tipo 810143, South Hackensack, NJ). Los alveogramas se realizaron con un alveográfo (Chopin Instruments, Villeneuve-La-Garenne, France), 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).

Una vez caracterizada la harina se elaboraron las muestras de masa y pan con una formulación de pan tipo francés.

Formulación del Pan

El tipo de pan utilizado fue el pan francés, por su gran consumo en México y formulación sencilla. La formulación típica de pan francés consistió en 100% harina, 2% de levadura comprimida, 0.5% de grasa, 1.5 de sal, 2% de mejorante y 66.6% de agua. Para la presente investigación se utilizó la siguiente formulación: 100% harina, 3% de levadura, 5% de grasa, 1.5% de sal, 2 % de mejorante. El porcentaje de agua 59.6, fue el obtenido de los farinogramas, (Silvas-García, 2010, modificada de Magaña- Barajas, comunicación personal). Los valores se ajustaron en base a los obtenidos en la literatura y preliminares. Luego se procedió a la elaboración de las masas y el moldeo del pan para su posterior congelación y almacenamiento.

Elaboración de Masa

A partir de la formulación descrita anteriormente, el proceso para elaborar las masas fue el siguiente: Se mezclaron los ingredientes en una mezcladora (marca MFG, Lincoln, NE, USA), durante 4 minutos en dos fases: primero durante 1 minuto los ingredientes secos y luego se

añadió el agua junto con la levadura, para seguir mezclando durante 3 minutos más, hasta obtener una masa con consistencia óptima. Para las pruebas en masas y pan, se pesaron piezas de 50 g de masa, las primeras se bolearon y las segundas se moldearon en pan típico francés. Además, para las pruebas de fermentación se pesaron 315 g y se bolearon. Luego se reposaron 5 minutos, y posteriormente se llevaron a pre fermentación. Para todas las muestras de masa se llevó a cabo una prefermentación de 10 minutos, en una cámara de fermentación (marca National Meg.Co. Lincoln, NE) a 30°C y 80% humedad relativa, para posteriormente congelarlas.

Congelación de Masas

Las masas se dividieron en dos partes y se congelaron con dos métodos de congelación: La primera parte de las masas se congeló a velocidad lenta (-0.14°C/min) en un congelador convencional (Frigidaire, GLFC1526FW1, Aug. Canadá), mientras que la segunda parte se congeló a una velocidad rápida (-1.75°C/min) en un ultra congelador (Thermo Scientific, ULT21866A). El procedimiento consistió en tomar las masas prefermentadas introducirlas en charolas de plástico dentro de bolsas de polietileno con cerradura, para evitar pérdida de humedad. Luego se colocaron en un congelador de velocidad lenta o rápida y se almacenaron (Ribotta et al., 2001; Ribotta et al., 2003; Silvas-García, 2011). Las condiciones se tomaron de estudios preliminares para establecer la temperatura y el tiempo de congelación ideales para la masa de pan.

Almacenamiento de Masas Congeladas

Las masas congeladas a velocidades lenta ó rápida, se almacenaron por un período de 56 días, (Kenny et al., 1999, Silvas-García, 2011), a -20°C (Ribotta et al, 2001; Ribotta et al., 2003).

Descongelación

Cada 14 días se tomaron muestras de masas congeladas, para descongelarlas y llevarlas a los diferentes análisis empezando por el día 0 seguido de los 14, 28, 42 o 56 días. Las muestras se descongelaron en dos etapas: primero se colocaron a 4°C en un refrigerador (marca Whirlpool, Modelo ETI8NKXANO3, Whirlpool Corporation, Benton Harbor Michigan, USA) durante 4 horas y 15 minutos hasta alcanzar una temperatura de 4°C. Posteriormente se llevaron a la

cámara de fermentación hasta alcanzar 30°C. Por otro lado, parte de masa congelada se procedió a liofilizarla en un equipo (marca Labconco, Freeze Dry Systems, USA) a temperatura de -50 °C, y un tiempo de 24 horas. La masa liofilizada se utilizó para algunas determinaciones como propiedades proteicas y caracterización del almidón.

Fermentación

Las muestras descongeladas a una temperatura de 4°C se colocaron en una cámara de fermentación (marca National Meg.Co. Lincoln, NE) a 30°C y 80% humedad relativa por 50 min. Una parte de la masa se utilizó para realizar las diferentes determinaciones, y otra parte de la masa (en forma de pan) se horneó para obtener pan (Kenny et al., 1999; Baier-Shenk et al., 2005; Huang et al., 2008a).

Esta parte se realizó igual para cada una de las etapas, en ellas se describe la metodología particular.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño de experimentos factorial 2x5, donde los factores fueron: velocidad de congelación, con dos niveles (congelación lenta -0.14°C/min o congelación rápida – 1.75°C/min) y tiempo de almacenamiento con cinco niveles (0, 14, 28, 42 o 56 días). Con el fin de determinar el efecto de los factores sobre las diferentes determinaciones, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) con un grado de confiabilidad del 95%. Para ver diferencias entre tratamientos específicos se utilizó la prueba de Tukey. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico Statistical Analytical System Software (SAS Institute, Inc. Cary, NC, 2002).

CAPÍTULO 4

Revisión Bibliográfica Publicada: Cambios Fisicoquímicos en Masa Congelada y su Efecto en la Calidad del Pan

Artículo científico: Cambios fisicoquímicos en masa congelada y su efecto en la calidad del pan: una revisión

Este artículo fue enviado, revisado y evaluado por pares y publicado en la revista Interciencia (Servicios Redalyc: Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica). Para esta publicación se llevó a cabo una revisión bibliográfica de algunos de los tópicos más relevantes y actuales enfocados al estudio de masa congelada para pan. El objetivo fue realizar una búsqueda profunda de antecedentes sobre las investigaciones llevadas a cabo en masa congelada para pan. Después de una intensa revisión de la información reunida, se elaboró un resumen donde se abordó una panorámica general sobre la producción de masa congelada, así como la situación actual de la industria de masa congelada. Se revisaron artículos buscando cual era el efecto que tiene la velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento sobre la masa y los cambios que ocurren en ella; especialmente se enfatizó en cambios fermentativos y aditivos crioprotectores, cambios en la proteína del gluten, propiedades viscoelásticos de la masa y cambios en la calidad del pan elaborado a partir de masas congeladas. El pan elaborado de masa congelada generalmente tiene menor calidad que el de masa no congelada o fresca, ya que la masa se debilita y se obtiene un menor volumen. La calidad de los productos de masa congelada es afectada por factores tales como la formulación de la masa, el tiempo de almacenamiento y las condiciones de congelación y descongelación. Además, cuando el sistema de la masa se modifica en su formulación, mediante la adición de crioprotectores, de fibras y eliminación del gluten, la masa se torna completamente diferente. Es importante estudiar los mecanismos por los que la masa pierde su calidad así de como evaluarlos, esto con la finalidad de entender los cambios y así poder evitarlos o modificarlos para obtener un producto de la mejor calidad.

CAMBIOS FISICOQUÍMICOS EN MASA CONGELADA Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DEL PAN: UNA REVISIÓN

MARÍA IRENE SILVAS GARCÍA, BENJAMÍN RAMÍREZ WONG, PATRICIA ISABEL TORRES CHÁVEZ, ELIZABETH CARVAJAL MILLAN, LUIS ARTURO BELLO-PÉREZ Y JESÚS MANUEL BARRÓN HOYOS

RESUMEN

Se revisaron los principales cambios fisicoquímicos que ocurren en la masa congelada y que afectan la calidad del pan. El pan elaborado de masa congelada generalmente tiene menor calidad que el de masa no congelada o fresca, ya que la masa se debilita y se obtiene un menor volumen. La calidad de los productos de masa congelada es afectada por factores tales como la formulación de la masa, el tiempo de almacenamiento, y las condiciones de congelación y descongelación. Además, cuando el sistema de la masa se modifica en su formulación, mediante la adición de crioprotectores, de fibras y eliminación del gluten, la masa se torna completamente diferente. Es importante estudiar los mecanismos por los que la masa pierde su calidad y cómo evaluarlos, con la finalidad de entender los cambios y así poder evitarlos o modificarlos para obtener un producto de la mejor calidad.

A partir de la década de los años 50 los productores de pan han incluido el uso de la masa congelada con el fin de diversificar y modernizar su tecnología (Madrid, 1999; Rosell y Gómez, 2007). Asimismo, con la finalidad de congelar y almacenar las masas sin hornear o 'crudas', cuando no se dispone de suficiente tiempo para hornearlas (Cox, 1987). El proceso general de la elaboración de masa congelada consiste en el mezclado de los ingredientes, moldeo y almacenamiento en congelación; después del almacenamiento se procede a fermentar y a hornear la pieza de pan (Wolt y D'Appolonia, 1984; Phimolsiripol, 2009). Este proceso permite ofrecer al consumidor un producto recién elaborado en cualquier momento. Estos productos han alcanzado popularidad debido a la conveniencia de estar 'listos para hornear' (Mondal y Datta, 2007), lo que permite a personas no entrenadas la elaboración final del pan, además de su fácil distribución. Incluso, la descongelación, fermentación en piezas y el horneado se pueden llevar a cabo en los hogares o en puntos de venta, en la medida que el producto vaya a ser consumido (Giannou *et al.*, 2003; Rosell y Gómez, 2007).

Todas esas conveniencias y ventajas han permitido que la masa congelada y los panes prehorneados congelados se hagan cada día más populares (Li *et al.*, 2011). De acuerdo a datos reportados por *Euromonitor International*, ha habido un incremento de la venta de productos de panadería congelados a nivel mundial de $3{,}16\times10^{9}$ USD en el año 2004 a $3{,}71\times10^{9}$ USD en 2008 (tomado de Matuda *et al.*, 2011). Esto nos da un panorama de la importancia de dichos

PALABRAS CLAVE / Fermentación / Masa Congelada / Panificación / Reología /

Recibido: 27/03/2012. Modificado: 17/05/2013. Aceptado: 22/05/2013.

María Irene Silvas García. Alumna del Doctorado en Ciencias de los Alimentos, Universidad de Sonora (UNISON), México.

Benjamín Ramírez Wong. Ph.D. en Ingeniería Agrícola, Texas A&M University, EEUU. Profesor-Investigador, UNISON, México. Dirección: Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro C.P. 83000. Sonora, México. e-mail: bramirez@guaymas.uson.mx

Patricia Isabel Torres Chávez. Doctora en Ciencias de los Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), México. Profesora-Investigadora, UNISON, México.

Elizabeth Carvajal Millan. Ph.D. en Ciencia de los Alimentos, École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (ENSAM), Francia. Investigadora, CIAD, México.

Luis Arturo Bello Pérez. Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas, CINVESTAV-IPN, México. Profesor-Investigador, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN, México.

Jesús Manuel Barrón Hoyos. Ph.D., Queen Elizabeth College of London, RU. Profesor-Investigador, UNISON, México.

productos para la economía mundial, la industria panadera y por lo tanto de los consumidores.

A pesar de su aceptación, los productos de masa congelada, generalmente tienen menor volumen que los de masas frescas, debido principalmente a un deterioro de la levadura y la estructura de la masa (Sharadanant y Khan, 2003; Panadero *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008; Matuda *et al.*, 2008). El proceso de producción de masa congelada tiene como objetivo preservar la integridad de la masa y de las células de levadura (Serna, 2001). Sin embargo, en este proceso sigue habiendo diversos problemas para la obtención de productos de buena calidad. El almacenamiento de la masa en congelación por varias semanas causa problemas en el producto final, como lo son un decremento de la producción de gas y debilidad de la masa. Esto se ve reflejado en el volumen final del pan (Varriano-Marston *et al.*, 1980; Hosomi *et al.*, 1992; Aibara *et al.*, 2005). De acuerdo a Sahlstrom *et al.*, (1999), son varios los factores que juegan un papel importante en la calidad de pan producido de masa congelada, entre los que se encuentran la calidad de la materia prima, la formulación de la masa, la prefermentación, la velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento en congelación. Todos estos factores afectan directamente los cambios que ocurren en el sistema relacionados con la producción de gas por la levadura, las proteínas del gluten, la viscoelasticidad de la masa y la calidad del pan. Con el fin de mejorar dicha calidad, se han buscado formas de mejorar el proceso de panificación en masa congelada a través de modificar las formulaciones, cambiar los procesos y añadir aditivos (Baier *et al.*, 2005).

Selomulyo y Zhou (2007) elaboraron un compendio de los efectos del almacenamiento en congelación sobre la estructura de la masa y la calidad del pan; además, abordaron el tema de aditivos que ayudan a la masa a mejorar su calidad, principalmente usando polisacáridos como gomas hidrocoloides, emulsificantes y oxidantes. Rossel y Gómez (2007) también recopilaron información acerca de los ingredientes y el proceso de congelación de masa para pan, así como de panes parcialmente horneados y congelados. Además de lo estudiado por dichos autores, la nueva tendencia para mejorar la calidad de productos de masa congelada es el uso de aditivos que controlen el problema de la redistribución de agua en su estructura durante el almacenamiento (Asghar *et al.*, 2011). Entre los aditivos recientemente utilizados se encuentran harina de papa, miel de abeja (Kotoki y Deka, 2010), leche de soya en polvo (Simmons *et al.*, 2012), proteínas de suero de leche (Asghar *et al.*, 2011), fibras solubles (Filipovic y Filipovic, 2010), enzimas (Steffolani *et al.*, 2012), productos sin gluten, con sustitutos de azúcar, y la modificación de los procesos de la congelación de productos de panadería y prefermentaciones (Gabric *et al.*, 2011), además del uso de crioprotectores, que serán discutidos en esta revisión.

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de los cambios fisicoquímicos que sufre la masa durante la congelación y el almacenamiento, y los efectos en la levadura, el gluten y la calidad del pan. Además, revisar cómo el uso de aditivos en masa congelada puede ayudar a la crioprotección de la levadura y a mejorar la calidad del pan.

Cambios Fermentativos

Durante la elaboración de masa congelada ocurren cambios en la producción de CO_2 que determinan el volumen final del pan. Los cambios dependen tanto del potencial de fermentación de la levadura, como de la cantidad de células viables. El potencial de fermentación depende del tipo de levadura y de su capacidad para adaptarse a las bajas temperaturas (Ando *et al.*, 2005). Existen varios factores que intervienen para que la levadura se adapte a las condiciones de congelación (Hsu *et al.*, 1979). Entre esos factores se encuentran la temperatura durante la preparación de la masa, la velocidad de congelación, la presión osmótica durante la concentración de solutos en el almacenamiento en congelación (Lu y Grant, 1999; Rouille *et al.*, 2000; Selomulyo y Zhou, 2007), y la presencia o ausencia de sustancias crioprotectoras de levaduras (Tanghe *et al.*, 2004). La cantidad de células viables depende del tipo de cepa y del número de células de levadura vivas e integras, es decir, el estado fisiológico de la levadura. La reproducción de las células también difiere con la cantidad de azúcares fermentables disponibles para las células.

Después de un prolongado almacenamiento en congelación, la viabilidad de la levadura decrece dramáticamente (Oda *et al.*, 1986; Codón *et al.*, 2003). En general, la viabilidad de la levadura en masa congelada depende del estado físico del sistema: en el estado vítreo se observa una supervivencia más alta. A temperaturas por arriba de la temperatura de transición vítrea (Tg, por sus siglas en inglés), los factores cinéticos y osmóticos rigen la subsistencia. El primer factor predomina durante la congelación y el segundo durante el almacenamiento (Stecchini *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2008).

La producción de gas es muy importante a la hora de la fermentación de las masas para pan. Sin embargo, existe otro factor muy importante que es la capacidad de retención del gas producido, que depende de la estabilidad de la burbuja, la cual está dada por los componentes que forman su interface, y por otro lado, a la estabilidad de la matriz gluten-almidón-agua (MacRitchie, 2003; Aibara *et al.*, 2005). Durante la fermentación ocurre también el colapso de las burbujas de gas, debido a cambios en la estructura de los compuestos químicos que la forman, y por lo tanto el gas producido escapa y el volumen de pan disminuye.

En un estudio realizado por Ribotta *et al.* (2003a) incorporaron levadura comprimida a la masa y la congelaron, y encontraron que al aumentar el tiempo de almacenamiento en congelación disminuyeron las células viables en un 52,4% a los 90 días. La retención en la producción de CO_2 también disminuyó en 27,7% en el mismo periodo. Resultados similares fueron obtenidos por otros investigadores (Wolt y D'Appolonia, 1984; Inoue *et al.*, 1994; El-Hady *et al.*, 1996). Lorenz y Kulp (1995), sugiriendo que el aumento en el daño celular podría ser debido a que la levadura en un sistema de masa está bajo presión osmótica y en un estado de fermentación activa. Durante la fermentación activa, las células tienen una membrana plasmática más delgada que las células inactivas y, en consecuencia, son más susceptibles al daño (Bank y Mazur, 1973). Además, los compuestos orgánicos se concentran durante el tiempo de almacenamiento en congelación formando una solución concentrada en la fase acuosa, lo que puede causar la autolisis de las levaduras (Stauffer, 1993). Es importante proteger a las levaduras del daño que causan estos fenómenos.

Algunos investigadores hacen uso de levaduras crioresistentes para tratar de obtener la mayor cantidad de células viables al término del proceso (Baguena *et al.*, 1991; Ribotta *et al.*, 2003b). Pepe *et al.* (2005) observaron una gran cantidad de levadu-

ras supervivientes después de la congelación cuando incorporaron levaduras crioresistentes. Además, obtuvieron un pan con características similares a las del pan fresco.

Aditivos Crioprotectores de Levaduras

En los sistemas biológicos, las dos fuentes principales de las lesiones por congelación son: ruptura por el hielo y efectos de solución, esta última provocada por la excesiva concentración de solutos intracelulares (Mazur *et al.*, 1972; Meryman *et al.*, 1977). Por ello se han utilizado nuevas formulaciones y aditivos crioprotectores, como la trealosa, prolina y glicerol, con la misma finalidad de preservar las levaduras viables, evitando el daño de las células (Wolt y D'Appolonia, 1984; Hirasawa, 2001; Stecchini *et al.*, 2002; Takano *et al.*, 2002; Codón *et al.*, 2003; Tange *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2005; Selomulyo y Zhou, 2007; Kim *et al.*, 2008). Los requisitos principales de la criopreservación de un cultivo de levadura son el almacenamiento a largo plazo y una alta tasa de supervivencia después de la descongelación (Bond, 1995).

Trealosa

Se ha observado que al añadir trealosa en las formulaciones de masa congelada, esta protege las levaduras y por lo tanto aumenta la producción de gas, proporcionando panes con mejor volumen y textura (Giannou y Tzia, 2008; Silvas-García, 2010). Otros estudios se han enfocado en los rangos de prefermentación, donde se ha observado que al aplicar un tiempo corto de prefermentación antes de la congelación ayuda a minimizar la pérdida de volumen de pan (Rasanen *et al.*, 1997; Le-Bail *et al.*, 2010; Gabric *et al.*, 2011). Morimoto y Seguchi (2011) propusieron añadir azúcar y levadura después de la descongelación de la masa con el fin de restaurar las levaduras pérdidas durante la congelación. Esto ayudó a la fermentación de las levaduras y la calidad del pan.

El uso de trealosa exógena en bajas concentraciones es una alternativa propuesta por Giannou y Tzia (2008) para preservar la integridad de las células de levaduras. Este disacárido es naturalmente un carbohidrato de almacenamiento de las células de levadura. Asimismo, 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 (Gancedo y Flores, 2004; Giannou y Tzia, 2008; Kim *et al.*, 2008). Huang *et al.* (2008) también encontraron que la adición de la trealosa exógena mejora la supervivencia de la levadura y la producción de CO_2 en masa congelada. Por otro lado, existen cultivos de levaduras que acumulan una gran cantidad de trealosa intracelular, la cual estabiliza las membranas lipídicas y protege las células de la deshidratación y del daño por congelación (Oda *et al.*, 1986). Por otro lado, un nivel entre 4-5% o menor de trealosa endógena es suficiente para garantizar la protección de la membrana celular y el citoplasma; además ayuda a recuperar la actividad metabólica y la posible reparación de los daños por la congelación. Concentraciones mayores son inefectivas; sin embargo, debería considerarse también la funcionalidad de las membranas celulares después de la congelación (Meric *et al.*, 1995).

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 *et al.*, 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 (Weisburd, 1988; Crowe *et al.*, 2001).

Prolina

Otro aditivo que funciona como crioprotector y también como osmoprotector, es la prolina (Nolte y Hanson, 1997). El efecto ocurre cuando el aminoácido se acumula en la célula de levadura de manera natural, y actúa como defensa contra el estrés. En masa congelada es importante su uso debido a que hay que cuidar a la levadura del daño por exposición a la concentración de solutos. Las células crioprotegidas con prolina tienen mayor potencial de recuperación, comparado con otros crioprotectantes tales como el glicerol. El mecanismo de acción sugerido es que las células de levadura biosintetizan prolina a partir de glutamato en el citoplasma a través de la misma vía que usan las bacterias y plantas, y también convirtiendo el exceso de prolina en glutamato en la mitocondria (Takagi, 2008).

La ingeniería genética puede hacer que los niveles de ese compuesto incrementen en las células para mejorar su resistencia al estrés (Nolte y Hanson, 1997). Se han perfilado células de *S. cerevisiae* que acumulan prolina mediante la disrupción de los genes que degradan la prolina y expresando los genes que la sintetizan a partir de glutamato para mejorar su actividad biosintética. Estas cepas modificadas presentan mayor tolerancia al estrés, incluyendo la congelación, deshidratación, oxidación y etanol. Sin embargo, la crioprotección por acumulación de prolina de forma artificial está condicionada por su concentración y localización dentro de la célula (Takagi, 2008). Aplicando prolina exógena, también puede conferir tolerancia al estrés; por ejemplo, se ha reportado que aumenta la tolerancia al enfriamiento a -7°C en diferentes microorganismos y plantas, evitando el sobre enfriamiento (Withers y King, 1979).

Glicerol

El contenido de glicerol intracelular en las levaduras *S. cerevisiae*, afecta la tolerancia al estrés por la congelación y descongelación. Las células de levadura cultivadas en medios enriquecidos con glicerol, adquieren tolerancia al estrés por congelación, al tiempo que mantienen una actividad fermentativa alta, incluso en la masa después del almacenamiento en congelación (Izawa *et al.*, 2004). Así mismo, mediante la mutación de los genes de estas células se puede aumentar la acumulación de glicerol dentro de la célula sin un suministro exógeno. El glicerol es un efectivo crioprotector en un intervalo de -196 a -20°C (Brougham y Johnson, 1981).

La adición de glicerol disminuye el efecto de rigidez de las células durante la congelación, debido a que aumenta la viscosidad progresivamente a medida que se aumenta su concentración alrededor de las células. Los resultados de crioprotección obtenidos de este modo pueden ser explica-

dos por el supuesto de que las células se vuelven rígidas a bajas temperaturas y podrían someterse a daños mecánicos cuando se somete a compresión (Nei, 1981). Por tal motivo, el glicerol es un compuesto útil a la hora de congelar las masas, para evitar el daño de las levaduras.

Cambios en las Proteínas del Gluten y Propiedades Reológicas

Otro aspecto importante que debe considerarse para determinar la calidad de la masa son las propiedades de sus proteínas, principalmente las que forman el gluten (Shewry *et al.*, 1995). La red de gluten está formada por las proteínas gluteninas (poliméricas) y gliadinas (monoméricas). Estas proteínas al unirse entrelazadamente confieren propiedades viscoelásticas únicas en la masa, las cuales son un equilibrio entre extensibilidad y elasticidad (Tatham *et al.*, 1985; Shewry *et al.*, 2002). Además, es el gluten quien permite que la masa se expanda atrapando los gases de la fermentación, logrando una estructura esponjosa que se convertirá en la miga de pan durante la cocción (Tatham *et al.*, 1985; MacRitchie, 2003; Mondal y Datta, 2007). Cualquier cambio en estas propiedades se ve reflejado en el producto final y en su calidad.

En masa congelada se ha reportado que el daño en su estructura y los cambios en sus propiedades reológicas son debidos a cambios en la red de gluten. Los cambios están relacionados con la interrupción de las cadenas del polímero por la acción mecánica de corte durante la formación de los cristales de hielo (Varriano-Marston *et al.*, 1980, Berglund *et al.*, 1991). La ruptura y pérdida de entrecruzamiento de las cadenas de proteínas facilita la pérdida de gas en la masa durante la fermentación (Hsu *et al.*, 1979; Varriano-Marston *et al.*, 1980; Autio y Sinda, 1992; Ribotta *et al.*, 2001). Es importante analizar el tamaño de los polímeros de proteínas en la masa congelada con el fin de determinar el daño causado. Zhao *et al.* (2012) reportaron que durante el almacenamiento en congelación el contenido de grupos sulfhidrilos libres del gluten incrementó de 9,8μmol·g^{-1} del control a 12,87μmol·g^{-1} a los 120 días de almacenamiento, atribuyéndoselo a una despolimerización y deshidratación del gluten debido a la redistribución de agua y una recristalización del hielo, lo que ocasiona una ruptura en el polímero. Al afectarse las proteínas de gluten durante la congelación y almacenamiento, se ven modificadas las propiedades viscoelásticas de las masas. La expansibilidad de la masa de pan se reduce (Aibara *et al.*, 2005), lo que da como resultado propiedades reológicas y de panificación pobres, con un debilitamiento de la masa. Una despolimerización, en consecuencia, afecta la calidad general de la masa y el pan. Es importante tomar en cuenta qué factores afectan a las proteínas durante la congelación, para cuantificarlos y buscar técnicas que ayuden a evitar esos cambios a fin de preservar la calidad de las proteínas de gluten y su funcionalidad en la masa, y por consiguiente mejorar el pan.

Las propiedades reológicas de la masa, tales como la viscoelasticidad, la adhesividad, la extensibilidad, la fuerza y la resistencia que opone cuando es sometida a una deformación, están estrechamente relacionadas con las interacciones moleculares entre los componentes de la masa, y entre las más importantes se encuentran las que se dan entre agua y proteínas (Aminlari y Majzoobi, 2002). En el caso de la masa congelada, estas interacciones se ven afectadas por los procesos de congelación y descongelación, relacionados principalmente con los cambios en las proteínas del gluten y la redistribución del agua. Después de la congelación y descongelación, las propiedades reológicas se modifican (Nicolas *et al.*, 2003). Yi y Kerr (2009) encontraron que la fuerza para la extensión de la masa congelada decrece con el tiempo de almacenamiento, el cual tiene una mayor influencia sobre la extensibilidad que la temperatura de congelación. Este efecto puede ser atribuido a un deterioro de la red de gluten, ya que la extensibilidad está relacionada con la estructura del gluten, en particular con las gluteninas de alto peso molecular. Por otro lado, esos investigadores observaron que la adhesividad aumenta durante el tiempo de almacenamiento, y que esto podría estar relacionado con una separación del agua de la red de gluten y una redistribución de ésta por la recristalización del hielo. El agua puede quedar adherida libremente a la superficie y causar el aumento en la adhesividad. En general, al estudiar las propiedades reológicas de masa congelada se ha observado que la fuerza de extensibilidad decrece y la adhesividad aumenta con el tiempo de almacenamiento en congelación, lo que en consecuencia resulta en masas débiles y menores volúmenes de pan (Autio y Sinda, 1992; Inoue *et al.*, 1994; Kenny *et al.*, 1999; Angioloni *et al.*, 2008).

La pérdida de la resistencia a la extensión de las masas indica un debilitamiento de la red de gluten. De acuerdo a Steffolani *et al.* (2012), el uso de enzimas como la glucosa oxidasa y la transglutaminasa ayuda a aumentar la resistencia a la extensión debido a que inducen la formación de puentes disulfuro entre las proteínas del gluten. Por el contrario, la enzima pentosanasa disminuye la resistencia a la extensión debido a la formación de pentosanos de menor tamaño que interactúan con las gliadinas del gluten, aumentando la viscosidad de la masa. Por otro lado, el módulo de elasticidad (G') evaluado con el método dinámico decrece con el almacenamiento en congelación de la masa. Sin embargo, las enzimas glucosa oxidasa y transglutaminasa ayudan a que el módulo elástico aumente, mientras que la enzima pentosanasa hace que disminuya. La adhesividad en masa congelada aumenta con el tiempo de almacenamiento, lo cual se atribuye a un incremento del agua libre por efecto de la redistribución de agua después de la congelación. El uso de pentosanasa aumenta la adhesividad debido a que decrece el tamaño de los pentosanos en la masa, provocando que se vuelva más pegajosa.

Como se ha discutido, el agua juega un papel muy importante tanto para los cambios en las proteínas como para las propiedades reológicas de la masa. Algunos autores han estudiado el uso de aditivos que aumenten la capacidad de enlazar el agua a las proteínas y mejorar su redistribución en la matriz. El uso de proteínas de suero de leche puede controlar la redistribución de agua en la estructura de la masa durante el almacenamiento. Además, protege la red de gluten en el sistema congelado, eliminando así el debilitamiento indeseable de la masa y mejorando la calidad de los productos (Asghar *et al.*, 2011).

Entre los aditivos recientemente utilizados se encuentran harina de papa, miel de abeja (Kotoki y Deka, 2010), leche de soya en polvo (Simmons *et al.*, 2012), proteínas de suero de leche (Asghar *et al.*, 2011), fibras solubles (Filipovic y Filipovic, 2010) y el uso de enzimas. Todos estos aditivos actúan enlazando agua y así evitando el deterioro de la red de gluten, la concentración de solutos y la deshidratación de las proteínas.

Cambios en la Calidad del Pan

Además de las evaluaciones en la masa, es importante evaluar la calidad del pan. Entre los parámetros más importantes que se determinan en el pan se tienen el volumen específico, la textura, el color de la miga y el aroma. Los tres últimos parámetros pueden ser determinados tanto sensorial como instrumentalmente. En el caso de la textura, principalmente se miden los atributos de firmeza o suavidad y la masticabilidad (Giannou y Tzia, 2007). Existen varios estudios que demuestran que en masa congelada, el volumen específico de pan y las propiedades de aroma disminuyen durante el almacenamiento (Giannou y Tzia, 2007), mientras que la firmeza se incrementa (Bárcenas *et al.*, 2003). La disminución del volumen del pan no solo se debe a la pobre producción de gas por parte de las células de levadura, sino también se debe al debilitamiento de la red de gluten de la masa y la pérdida de la capacidad de retención de las burbujas de gas.

En un estudio realizado por Giannou y Tzia (2007), en panes elaborados de masa congelada, observaron un aumento en el color instrumental proporcional al almacenamiento en congelación. En la corteza el promedio incrementó de 64,5 a 71,4 durante el almacenamiento de 0 a 300 días. En la miga el color incrementó de 69,6 a 73. Los autores atribuyen los cambios en la coloración a la formación de manchas blancas en la superficie de la corteza y un color más oscuro de la miga. En contraste, afirman que el aspecto de las muestras es aceptable, según un panel entrenado, incluso después de nueve meses de almacenamiento en congelación.

Ribotta *et al.* (2003a) encontraron evidencia suficiente de que las propiedades del almidón son modificadas durante el almacenamiento en congelación. Esas modificaciones fueron evidentes durante la gelatinización del almidón después de la descongelación. Al mismo tiempo, encontraron una mayor susceptibilidad a la retrogradación del almidón por parte de las masas que fueron congeladas y descongeladas que la de masa fresca. Esto podría explicar el porqué de la pérdida de la suavidad del pan de masa congelada y que podría existir una correlación entre el almidón dañado y el aumento de la firmeza durante el tiempo de almacenamiento.

Simmons *et al.* (2012) agregaron proteínas de soya en la formulación de masas para prevenir la migración de agua durante el almacenamiento en congelación; observaron que los panes que contenían dichas proteínas presentaban valores menores de dureza del pan comparados con los panes de masas de trigo congeladas. Steffolani *et al.*, (2012) utilizaron las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa para minimizar el daño por la congelación en masas; encontraron que tanto los panes de masas sin enzimas como los que contenían enzimas presentaron una disminución de volumen a las 3 y a las 9 semanas de almacenamiento. Sin embargo, los panes que contenían la enzima pentosanasa en diferentes concentraciones, presentaron los valores más altos de volumen de pan comparados a los de otros tratamientos. En general, el uso de enzimas mejoró la calidad del pan, pero pentosanasa fue la mejor. En cuanto a la textura del pan, todos los tratamientos de masa congelada con enzimas presentaron atributos de textura mejores comparados con el control.

Al final, los atributos de volumen y textura del pan son los principales parámetros para determinar la calidad general de este producto de masa congelada. Es importante considerar los factores que intervienen durante la congelación y el almacenamiento en congelación de las masas para preservar los atributos de calidad del pan, además de modificar los procesos y formulaciones a fin de obtener un producto mejor.

Conclusiones

Para determinar la calidad de masa congelada y así obtener un pan con buen volumen y textura es importante considerar sus propiedades fisicoquímicas, como son las fermentativas, de las proteínas de gluten y viscoelásticas de la masa. Todas estas propiedades están relacionadas entre sí y, en conjunto, determinan la calidad del pan. Las masas congeladas sufren cambios negativos significativos en su estructura y en sus componentes que dan como resultado un producto de pobre calidad. Como se discutió en este trabajo, es importante considerar cómo es que el proceso de congelación afecta estos componentes para poder buscar estrategias que ayuden a preservar la calidad de las masas y sus productos. El estudio de la calidad de masa congelada es muy amplio y día a día se implementan nuevas formulaciones y mejoras en los procesos. Como se discutió, la viabilidad y potencial de fermentación de las levaduras depende tanto del tipo que se utilice como de la formulación, aditivos y procesos a los que estas sean sometidas. Es importante tomar en cuenta cada uno de estos elementos a la hora de la elaboración de las masas, con la finalidad de obtener los mejores resultados en cuanto a la producción de gas después de la congelación y como consecuencia un mejor volumen de pan. En esta revisión se ha concluido que después de la descongelación la masa se debilita. Este cambio es debido principalmente, a la deshidratación de las proteínas del gluten y ruptura de su estructura, lo que afecta la calidad de los productos de panificación. Es importante preservar la funcionalidad de las proteínas para evitar el debilitamiento de la masa. También se discutió que lo más importante es la calidad del pan, considerando los factores que intervienen durante la congelación y almacenamiento de la masa, para preservar los atributos de volumen y textura de este producto.

REFERENCIAS

Aibara S, Ogawa N, Hirose M (2005) Microestructures of bread dough and the effects of shortening on frozen dough. *Biosci. Biotech. Biochem. 69*: 397-402.

Aminlari M, Majzoobi M (2002) Effect of chemical modification, pH change, and freezing on the rheological, solubility, and electrophoretic pattern of wheat flour properties. *J. Food Sci. 67*: 2502-2506.

Ando A, Suzuki C, Shima J (2005) Survival of genetically modified and self-cloned strains of commercial baker's yeast in simulated natural environments: environmental risk assessment. *Appl. Env. Microbiol. 71*: 7075-7082.

Angioloni A, Balestra F, Pinnavaia GG, Dalla Rosa M (2008) Small and large deformation tests for the evaluation of frozen dough viscoelastic behavior. *J. Food Eng. 87*: 527-531.

Asghar A, Anjum FM, Allen JC (2011) Utilization of dairy byproduct proteins, surfactants, and enzymes in frozen dough. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 51*: 374-382.

Autio K, Sinda E (1992) Frozen doughs: rheological changes and yeast viability. *Cereal Chem. 69*: 409-413.

Baguena R, Soriano MD, Martinez-Anaya MA, Benedito-de-Barber C (1991) Viability and performance of pure yeast strains in frozen wheat dough. *J. Food Sci. 56*: 1690-1694.

Baier A, Handschin S, Conde B (2005) Ice in prefermented frozen bread dough-an investigation based on calorimetry and microscopy. *Cereal Chem. 82*: 251-255.

Bank H, Mazur P (1973) Visualization of freezing damage. *J. Cell Biol. 57*: 729-742.

Bárcenas ME, Haros M, Benedito C, Rosell CM (2003) Effect of freezing and frozen

storage on the staling of part-baked bread. *Food Res. Int. 36*: 863–869.

Berglund PT, Shelton DR, Freeman TP (1991) Frozen bread dough ultrastructure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycles. *Cereal Chem 68*: 105-107.

Bond CJ (1995) Cryopreservation of yeast cultures. *Meth. Mol. Biol. 38*: 39-47.

Brougham MJ, Johnson DB (1981) Glycerol, α-glycerophosphate and other compounds as stabilizers of alcohol dehydrogenase from yeast. *Enz. Microbiol. Technol. 3*: 225-228.

Codon AC, Rincón AM, Moreno-Mateos MA, Delgado-Jarana J, Rey M, Limon C, Rosado IV, Cubero B, Peñate C, Castrejón F, Benitez T (2003) New *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast displaying enhanced resistance to freezing. *J. Agric. Food Chem.51*: 483-491.

Cox PM (1987) *Ultracongelación de Alimentos. Guia de la Teoria y Practica*. Acribia. Zaragoza, España. pp 374-378.

Crowe J, Crowe L, Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Sci. 223*: 209-217.

Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F (2001) The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology 43*: 89-105.

El–Hady EA, El-Samaby SK, Seibel W, Brummer JM (1996) Changes in gas production and retention in non-prefermented frozen wheat doughs. *Cereal Chem. 73*: 472-477.

Filipovic J, Filipovic N (2010) Fibres in the dough influencing freezing and thawing kinetics. *Int. J.Food Sci. Technol. 45*: 1-6.

Gabric D, Ben-Aissa A, Le-Bail A, Monteau JY, Curic D (2011) Impact of process conditions on the structure of pre-fermented frozen dough. *J. Food Eng. 105*: 361-366.

Gancedo C, Flores CL (2004) The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res. 4*: 351-359.

Giannou V, Kessoglou V, Tzia C (2003) Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends Food Sci. Technol. 14*: 99-108.

Giannou V, Tzia C (2007) Frozen dough bread: quality and textural behavior during prolonged store- prediction of final product characteristics. *J. Food Eng. 79*: 929-934.

Giannou V, Tzia C (2008) Cryoprotective role of exogenous trehalose in frozen dough products. *Food Bioprocess Technol. 1*: 276-284.

Gómez M, Oliete B, Pando V, Ronda F, Caballero PA (2008) Effect of fermentation conditions on bread staling kinetics. *Eur. Food Res. Technol. 226*: 1379-1387.

Hirasawa R, Yokoigawa K, Isobe Y, Kawai H (2001) Improving the freeze tolerance of baker's yeast by loading with trehalose. *Biosci. Biotechnol. Biochem. 65*: 522-526.

Hosomi K, Nishio K, Matsumoto H (1992) Studies on frozen dough baking. I. Effects of egg yolk and sugar ester. *Cereal Chem. 69*: 89-92.

Hsu KH, Hoseney RC, Seib PA (1979) Frozen dough. I. Factors affecting stability of yeasted doughs. *Cereal Chem. 56*: 419-424.

Huang W, Kim Y, Li X, Rayas-Duarte P (2008) Rheofermentometer parameters and bread specific volume of frozen sweet dough influenced by ingredients and dough mixing temperature. *J. Cereal Sci. 48*: 639-646.

Inoue Y, Sapirstein H, 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*: 118-121.

Izawa S, Ikeda K, Maeta K, Inoue Y (2004) Deficiency in the glycerol channel Fps1p confers increased freeze tolerance to yeast cells: application of the fps1Δ mutant to frozen dough technology. *Appl Microbiol Biotechnol. 66*: 303-305.

Kenny S, Wehrle K, Dennehy T, Arendt EK (1999) Correlations between empirical and fundamental rheology measurements and baking performance of frozen dough. *Cereal Chem. 76*: 421-425.

Kim YS, Huang W, Guocheng D, Zhengxing P, Chung O (2008) Effect of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. *Food Res. Int. 41*: 903-908.

Kotoki D, Deka SC (2010) Baking loss of bread with special emphasis on increasing water holding capacity. *J. Food Sci. Technol. 47*: 128-131.

Le-Bail A, Nicolitch C, Vuillod C (2010) Fermented frozen dough: impact of pre-fermentation time and of freezing rate for a pre-fermented frozen dough on final volume of the bread. *Food Bioproc. Technol. 3*: 197-203.

Li Z, Tang X, Huang W, Liu JG, Yao Y (2011) Rheology microstructure, and baking characteristics of frozen dough containing Rhizopus chinesis lipase and transglutaminasa. *Cereal Chem. 88*: 596-601.

Lorenz K, Kulp K (1995) Doughs for bread and rolls in the United States. En Kulp K, Lorenz K, Brummer J (Eds.) *Frozen & Refrigerated Doughs and Batter*. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, EEUU. pp. 135-153.

Lu W, Grant LA (1999) Effects of prolonged storage at freezing temperatures on starch and baking quality of frozen doughs. *Cereal Chem. 76*: 656-662.

MacRitchie F (2003) Fundamentals of dough formation. *Cereal Food World 48*: 173-176.

Madrid A (1999) *Confiteria y panaderia: Manual de Formacion*. AMV. Madrid, España. pp. 174-184.

Maruda TG, Chevallier S, Pessôa Filho P, Le-Bail A, Tadini CC (2008) Impact of guar and xantan gums on proofing and calorimetric parameters of frozen bread dough. *J. Cereal Sci. 48*: 741-746.

Maruda TG, Pessoa Fhilo PA, Tadini CC (2011) Experimental data and modeling of the thermodynamic properties of bread dough at refrigeration and freezing temperatures. *J. Cereal Sci. 53*: 126-132.

Mazur P, Leibo SP, Chu HER (1972) A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell Res.71*: 345-355.

Meric L, Lambert-Guilois S, Neyfeneuf O, Richard-Molard D (1995) Cryoresistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in frozen dough: Contribution of cellular trehalose. *Cereal Chem. 72*: 609-615.

Meryman HT, Williams RJ, Douglas MSJ (1977) Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology 14*: 287-302.

Mondal A, Datta AK (2007) Bread baking- a review. *J. Food Eng. 86*: 465-474.

Morimoto N, Seguchi M (2011) Restoration of breadmaking properties to frozen dough by addition of sugar and yeast and subsequent processing. *Cereal Chem. 88*: 409-413.

Nei T (1981) Mechanism of freezing injury to erythrocytes: Effect of initial cell concentration on the post-thaw hemolysis. *Cryobiology 18*: 229-237.

Nicolas Y, Smit RJM, Van Aalst H, Esselink FJ, Weegels PL, Agterof GM (2003) Effect of storage time and temperature on rheological and microstructural properties of gluten. *Cereal Chem. 80*: 371-377.

Nolte KD, Hanson AD (1997) Proline accumulation and methylation to proline betaine in citrus: implications for genertic engineering of stress resistance. *JASHS 122*: 18-13.

Oda Y, Uno K, Ohta S (1986) Selection of yeasts for breadmaking by the frozen-dough method. *Appl. Env. Microbiol. 52*: 941-943.

Panadero J, Randez-Gil F, Prieto JA (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*: 9966-9970.

Pepe O, Anastasio M, Villani F (2005) Improvement of frozen dough stability using a cryoresistant yeast strain and refreshment. *Cereal Chem. 82*: 239-241.

Phimolsiripol Y (2009) Shelf life determination of frozen bread dough stored under fluctuating temperature conditions. *Kasetsart J. (Nat. Sci.). 43*: 187-197.

Rasanen J, Laurikainen T, Autio K (1997) Fermentation stability and pore size distribution of frozen prefermented lean wheat doughs. *Cereal Chem. 74*: 56-62.

Ribotta PD, León A E, Añón MC (2001) Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality. *J. Agric. Food Chem. 49*: 913-918.

Ribotta PD, León AE, Añon MC (2003a), Effect of freezing and frozen storage on the gelatinization and retrogradation of amylopectin in dough baked in a differential scanning calorimeter. *Food Res. Int. 36*: 357-363.

Ribotta PD, León AE, Añon MC (2003b) Effect of yeast freezing in frozen dough. *Cereal Chem. 80*: 454-458.

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

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.

Sahlstrom S, Nielsen AO, Faergestad EM, Lea P, Park WJ, Ellekjaer MR (1999) Effect of dough processing conditions and DATEM on Norwegian hearth bread prepared from frozen dough. *Cereal Chem. 76*: 38-44.

Selomulyo VO, Zhou W (2007) Frozen bread dough: effects of freezing storage and dough improvers. *J. Cereal Sci. 45*: 1-17.

Serna SO (2001) *Qutmica, Almacenamiento e Industrializacion de los Cereales*. AGT. México. pp. 247-248.

Sharadanant R, Khan K (2003) Effect of hydrophilic gums on the quality of frozen dough: II. Bread characteristics. *Cereal Chem. 80*: 773-780.

Shewry PR, Tatham AS, Barro F, Barcelo P, Lazzeri P (1995) Biotechnology of breadmaking: unravelling and manipulating the multi-protein gluten complex. *Bio/Technol. 13*: 1185-1190

Shewry PR, Harford NG, Belton PS, Tatham AS (2002) The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Trans. R. Soc. Lond. B. 357*: 133-142.

Silvas-Garcia MI (2010) *Efecto de la Adicion de Trealosa sobre las Propiedades Viscoelasticas y de Panificacion de Masa Congelada y Calidad de Pan Tipo Bolillo*. Tesis. Universidad de Sonora. México. 120 pp.

Simmons AL, Smith KB, Vodovotz Y (2012) Soy ingredients stabilize bread dough during frozen storage. *J. Cereal Sci. 56*: 232-238.

Stauffer CE (1993) Frozen dough production. En Kamel B, Stauffer C (Eds.) *Advances in Baking Technology*. Blackie. Glasgow, RU. pp. 88-106

Stecchini ML, Maltini E, Venir E, Del Torre M, Prospero L (2002) Properties of wheat dough at sub-zero temperaturas and freeze tolerance of a baker's yeast *(Saccharomyces cerevisiae)*. *J. Food Sci. 67*: 2196-2201.

Steffolani ME, Ribotta PD, Perez GT, Puppo MC (2012) Use of enzymes to minimize dough freezing damage. *Food Bioproc. Technol. 5*: 2242-2255.

Takagi H (2008) Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 81*: 211-223.

Takano H, Naito S, Ishida N, Koizumi M, Kano H (2002) Fermentation process and grain structure of baked breads from frozen dough using freeze-tolerant yeasts. *J. Food Sci. 67*: 2725-2733.

Tanghe A, Van Dijck P, Colavizza D, Thevelein JM (2004) Aquaporin mediated improvement of freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* is restricted to rapid freezing conditions. *Appl. Env. Microbiol. 70*: 3377-3382.

Tatham AS, Miflin BJ, Shewry PR (1985) The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationship to gluten elasticity. *Cereal Chem. 62*: 405-412

Varriano-Marston E, Hsu H, Mahdi J (1980) Rheological and structural changes in frozen dough. *Baker's Dig. 54*: 32-34.

Weisburd S (1988) Death-defying dehydration. *Sci. News 133*: 107-110.

Withers L A, King P, (1979), Proline: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol. 64*: 675-678.

Wolt M, D'Appolonia B (1984) Factors involved in the stability of frozen dough. II. The effects of yeast type, and dough additives on frozen-dough stability. *Cereal Chem. 61*: 213-221.

Yi J, Kerr W (2009) Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties. *Food Sci. Technol. 42*: 1474-1483.

Zhao L, Lin L, Guo-Qin L, Xing-Xun L, Bing L (2012) Effect of frozen storage on molecular weight, size distribution and conformation of gluten by saxs and sec-malls. *Molecules 17*: 7169-7182.

PHYSICOCHEMICAL CHANGES IN FROZEN DOUGH AND THE EFFECT ON BREAD QUALITY: A REVIEW

Maria Irene Silvas Garcia, Benjamin Ramirez Wong, Patricia Isabel Torres Chávez, Elizabeth Carvajal Millan, Luis Arturo Bello-Pérez and Jesús Manuel Barrón Hoyos

SUMMARY

Main physicochemical changes that occur in frozen dough affecting the bread quality are reviewed. Generally, bread made from frozen dough has a lower quality than that made of non-frozen or fresh dough, since dough is weakened and a smaller volume is obtained. The quality of products made of frozen dough is affected by factors such as dough formulation, storage time, and freezing and thawing process conditions. These factors induce physicochemical changes in the dough, which reduce the production of gas, damage gluten proteins, alter the visco-elasticity and decrease bread quality. Furthermore, when the dough system is modified in formulation by adding crioprotectants such as fiber and by removal of gluten, the dough becomes completely different. It is important to study the mechanisms by which the dough loses its quality, and how to evaluate them, in order to understand the changes and be able to modify them so as to obtain a product of the highest quality.

MUDANÇAS FÍSICO-QUÍMICAS EM MASSA CONGELADA E SEU EFEITO NA QUALIDADE DO PÃO: UMA REVISÃO

Maria Irene Silvas Garcia, Benjamin Ramirez Wong, Patricia Isabel Torres Chávez, Elizabeth Carvajal Millan, Luis Arturo Bello-Pérez e Jesús Manuel Barrón Hoyos

RESUMO

Revisam-se as principais mudanças físico-químicas que ocorrem na massa congelada e que afetam a qualidade do pão. O pão elaborado de massa congelada geralmente tem menor qualidade do que o pão de massa não congelada ou fresca, já que a massa se debilita obtendo-se um menor volume. A qualidade dos produtos de massa congelada é afetada por fatores tais como a formulação da massa, o tempo de armazenamento, e as condições de congelamento e descongelamento. Além disso, quando o sistema da massa se modifica na sua formulação, mediante a adição de crioprotetores, de fibras e eliminação do glúten, a massa se torna completamente diferente. É importante estudar os mecanismos pelos que a massa perde sua qualidade e como avaliá-los, com a finalidade de entender as mudanças e assim poder evitá-los ou modificá-los para obter um produto da melhor qualidade.

CAPÍTULO 5

Etapa 1: Cambios en la Redistribución de Agua en Masa Congelada

En este trabajo se evaluó el efecto de la velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento sobre la redistribución de agua en masa congelada. A continuación se describe brevemente el planteamiento y realización de dicha investigación.

Hipótesis

La redistribución de agua en masa congelada aumenta durante el tiempo de almacenamiento, y la velocidad de congelación es un factor determinante.

Objetivo

Evaluar el efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre los cambios en el agua y pH de masa congelada.

Metodología

Termogravimetría. Se pesaron 30 mg de masa congelada, en una celda de aluminio y se colocaron en un platillo de alúmina en un equipo para termo gravimetría (TGA Q500 TA Instruments). Para el análisis se llevó a cabo un calentamiento desde 25°C hasta 160°C a una velocidad de 5°C/min, con un flujo de Argón de 50 mL/min. Se obtuvieron las curvas de sorción para las muestras. Se determinó el porcentaje de pérdida de peso y con ayuda del software (TA Universal Analysis 2000), se calculó la derivada de la curva de pérdida de peso. De ahí se obtuvieron dos curvas adicionales, de las cuales se calculó el porcentaje de agua libre y de agua ligada.

Calorimetría diferencial de barrido. Para el análisis calorimétrico se pesaron 20 mg de masa congelada en una charola de aluminio la cual se selló herméticamente. La medición se llevó a

cabo en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q200 TA Instruments). Se llevó a cabo un barrido de temperatura desde -50°C hasta 100°C a una velocidad de 5°C/min con un flujo de Nitrógeno de 50 mL/min. La charona con la muestra de masa se comparó contra una charola de aluminio vacía. (Baier-Shenk, et al., 2005). Se obtuvieron los termogramas correspondientes a cada tratamiento, de donde se calcularon la entalpia de fusión (ΔH de fusión), (J/g) y Temperatura de transición vítrea (Tg) (°C), utilizando un software (TA Universal Analysis 2000).

Cantidad de agua congelable. Los cálculos se hicieron siguiendo la ecuación de Baier-Shenk et al. (2005). (ver pág. 44).

Actividad del Ion Hidrógeno (pH). Se utilizó el método 02-52 de la A.A.C.C. (2000). Se tomaron 15 g de masa descongelada y fermentada, se hizo una suspensión de la muestra en 100 mL de agua fría previamente hervida. Se agitó en un período de 30 min continuamente de tal manera que las partículas permanecieran en suspensión, posteriormente se dejó reposar durante 10 min, se decantó el sobrenadante y a esté se le midió el pH con el método electrométrico usando un potenciómetro (marca Corning, modelo GO1305A) y electrodos calibrados con soluciones de buffer conocidas.

Resultados

Durante el tiempo de almacenamiento, hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) en la cantidad de agua libre, entalpía de fusión y la cantidad de agua congelable, esto se puede observar en las tablas 1, 2 y 3 (ver págs. 51, 52 y 53). La temperatura de transición vítrea se mantuvo constante durante el tiempo de almacenamiento a -8.22°C. Sin embargo, la velocidad de congelación y el tipo de cristales formados durante el proceso no tuvieron un efecto sobre la redistribución de agua, la migración de agua continúa durante el almacenamiento y modifica el pH en la masa (Figura 3, ver pág. 56). La migración de agua para formar cristales de hielo, provoca un cambio en la conformación de proteínas, lo que aunado a el cambio en las regiones de agua concentrada sin congelar, da como resultado cambiós en el pH del sistema, el cambio conformacional provoca interacciones intramoleculares que a su vez provocan la repulsión de más agua. Al aumentar el tiempo de

almacenamiento de la masa, la migración de agua continúa y aumenta la proporción de agua libre, el agua puede actuar como plastificante aumentando la viscosidad de la masa. Por otro lado, el incremento en la entalpía de fusión podría significar que se requiere mayor energía para fundir cristales de hielo más grandes, esto podría ser evidencia que durante el almacenamiento ocurre una recristalización y el aumento del tamaño y cantidad de los cristales. Cuando la masa es descongelada y su temperatura supera 0 °C, los cristales de agua funden pero el agua no regresa a su estado original en la matriz de gluten. Esta deshidratación del gluten tiene efectos negativos sobre la estructura de la masa y la calidad del pan. En la migración de agua también provoca deshidratación de las células de levadura, por aumento de la presión osmótica.

Conclusión

La redistribución de agua en masa congelada aumenta durante el tiempo de almacenamiento, este fue el factor principal que afecta las proporciones de agua libre y unida, así como la entalpía del hielo (ΔH), la cantidad de agua congelable y el pH. Durante el tiempo de almacenamiento, aumenta la ΔH de fusión, la cantidad de agua congelable y agua libre, y sucede una disminución del pH, independientemente de la velocidad de congelación y el tipo de cristales formados durante el proceso. La migración de agua continúa durante el almacenamiento y promueve cambios en el pH de la masa.

Artículo científico derivado de la etapa 2: Effect of freezing rate and storage time in the freezable water of bread dough using thermal analysis.

El presente manuscrito es un artículo que fue enviado, y el cual se encuentra en el formato del Journal of Food Process and Preservation (Editorial Wiley, by John Wiley & Sons, Inc.). En él se detallan los resultados y discusión para esta etapa de la investigación.

EFFECT OF FREEZING RATE AND STORAGE TIME IN THE FREEZABLE WATER OF BREAD DOUGH USING THERMAL ANALYSIS

M. I. SILVAS-GARCÍA[1], B. RAMÍREZ-WONG[1, 6], P. I. TORRES-CHÁVEZ[1], E. CARVAJAL-MILLAN[2], J. M. BARRÓN-HOYOS[1], L. A. BELLO-PÉREZ[3], D. LARDIZABAL-GUTIÉRREZ[4], AND A. QUINTERO-RAMOS[5]

[1]Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.
[2]Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.
[3]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN. Yautepec, Morelos, México.
[4]Centro de Investigación en Materiales Avanzados. Chihuahua, Chihuahua, México.
[5]Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua, México.

[6]Corresponding autor: Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n. Col. Centro. Hermosillo, Sonora, México. C. P. 83000. PHONE-FAX: 52-662-259-22-07/08/09
E-MAIL: bramirez@guaymas.uson.mx

ABSTRACT

Frozen dough and bread quality changes are related to the formation of ice crystals during the freezing process. The objective of this study was to evaluate the effect of the rate of freezing and storage time on changes in the freezable water dough, using calorimetric techniques. Dough was frozen at a slow speed (-0.14°C/min) or fast (-1.75°C/min), and stored at -20°C for 56 days. Samples of frozen dough were evaluated for their thermal properties by scanning differential calorimetry, and thermogravimetric analysis. During the storage time, there was a significant increase ($p<0.05$) in the amount of free water, enthalpy of fusion and the amount of freezable water. The glass transition temperature was maintained during the storage time. Nevertheless the rate of freezing and the type of crystals formed during the process, water migration continues during storage and modifies the pH in dough.

Keywords: Frozen dough, freezing rate, storage time, freezable water.

PRACTICAL APPLICATIONS

Dough freezing process allows producers to save time in preparing their products, as well as to save labor costs. However, the cost of the equipment for frrezing is high to freezing. On the other hand, it has been found that to preserve the properties of dough and the bread quality, it is more important the storage time than the freezing type; because, redistribution causes an important decrease of quality at prolonged storage time. This behavior could be fixed by changing the amount of freezable water, preventing the dough components become dehydrated and suffer such changes. This information is useful for producers because they can choose the

storage time and suitable additives to preserve the frozen dough in the best conditions. This would reduce the migration and dislocation of water into dough sistem.

INTRODUCTION

Frozen dough products are one of the current examples of value-added cereal products that face stability problems during prolonged storage periods of times (Ashgar *et al.* 2011). This problem is associated with a reduction in the fermentative capacity of yeast, dough extensibility and freshness of bread (Seguchi *et al.* 2003; Yi and Kerr 2009; Meziani *et al.* 2012).The growth of ice crystals in the dough pores is favored as storage time progresses. The freeze damage mechanism of dough is not due to changes in the total ice content, but because there is a redistribution of water in the form of ice into dough (Baier-Schenk et al. 2005). There are two factors that most affects dough water redistribution: freezing rates and frozen storage. The rate of freezing is crucial because it determines the size and location of ice crystals within dough (Petzold and Aguilera 2009). The freezing damage in foods is associated with a slow freezing rate; however, in frozen dough it appears be the opposed (Silvas-García *et al.* 2014).

While freezing, water is redistributed within the pores of the dough, dislocated and migrates to form ice crystals (Cauvain and Young 2008). The speed at which cooling performed determines the size and shape of the crystals (Singh and Heldman 2001). The size and location of these crystals modify the properties of the dough because the water is accumulated as crystals leaves of the pores (Kulp *et al.* 1995). During the slow freezing process, large deposits located heterogeneously of crystals in dough are formed, while in the fast-freezing process located small crystals are formed homogeneously in dough (Laaksonen 2000). Hence, there areas where free water in which a series of chemical and biochemical changes occur during storage (Esselink *et al.* 2003; Nicolas *et al.* 2003; Baier-Shenk *et al.* 2005).

Changes in the size of ice crystals of frozen dough can be studied by several techniques including differential scanning calorimetry. This tool is widely used in foods and has also been applied to evaluate the content of ice crystals in wheat dough, reported as the enthalpy of fusion of crystals (Bot 2003; Baier-Shenk *et al.* 2005). Furthermore, the thermogravimetric analysis helps to understand the kinetics of weight loss during drying of the samples and can calculate both the amount of free water and bound water; because the resistance to water removal will be given by the way it is water interacting with the other components (Roozendaal *et al.* 2012).

When redistribution of water occurs during migration to form ice crystals, there is a change in the proportion of free water in relation to that it had in the unfrozen dough (Rasanen *et al.* 1998; Ribotta 2002; Seguchi *et al.* 2003). This impacts the properties of dough during thawing, because water leaves from the gluten-starch matrix and does not return to its original location, and changes the characteristics of the dough (Nicolas *et al.* 2003; Boehm *et al.*

2004). The greatest impact of the redistribution of water is associated with changes in gluten and yeast. This is due to dehydration during freezing of this component during storage, and these changes are accentuated as time progress (Nicolas *et al.* 2003; Esselink *et al.* 2003; Baier-Shenk *et al.* 2005). In the case of gluten, there are conformational changes due to modification of the chemical environment on this material, and hydrolysis reactions are promoted then break the network (Varriano-Marston *et al.* 1980; Berglund *et al.* 1991). Regarding yeast, when the surrounding crystals are very large, the cell undergoes dehydration to maintain osmotic balance (Meryman 1968). When small crystals are formed within the cytoplasm, they can recrystallize and break the cell membrane (Casey and Foy 1995; Kulp *et al.* 1998; Singh and Heldman 2001).

Changes in the gluten network and yeast during freezing and storage result in significant changes in the dough properties and bread quality (Sharadanant and Khan 2003; Huang *et al.* 2008; Matuda *et al.* 2008). Among these changes include loss of resistance to stretching and weakening of the dough structure, changes in the rheological properties of dough, changes in properties of fermenting yeast, loaf volume decreased, and staling loss of smell and taste (Autio and Sinda 1992; Kenny *et al.* 1999; Lu and Grant 1999; Ribotta *et al.* 2004). Therefore, it is important to evaluate changes in the redistribution of water in the frozen dough. The objective of this study was to assess the effect of the rate of freezing and storage time on changes in the freezable water of bread dough using calorimetric techniques.

MATERIALS AND METHODS

Dough Preparation

The type of bread used was French bread, flour (100%, bakers percentage), compress yeast (3%), shortening (5%), salt (1.5%) and dough improver (2%) and 59.6% of water. The ingredients were mixed, molded, proofed and wrapped following the procedure reported by Silvas-García *et al.* (2014).

Freezing Process

The dough was divided into two batches and frozen at two different freezing rates up to reach a temperature of -20°C. One set of dough was frozen at -1.75°C/min (fast freezing rate) in an ultra-low temperature freezer (Thermo Scientific, ULT21866A, USA), and the other set of dough was frozen at -0.14°C/min (slow freezing rate) in a conventional freezer (Frigidaire, GLFC1526FW1, Aug. Canada). Both frozen dough sample sets were stored at the same temperature of -20°C in a conventional freezer (Frigidaire, GLFC1526FW1, Aug. Canada) for 0, 14, 28, 42 or 56 days.

Thermogravimetry Analysis

For each storage time, a sample of frozen dough was weighed (~30 mg) in an aluminum cell and placed on an alumina dish of thermogravimetric equipment (TGA Q500 TA Instruments, New Castle, DE, and Lindon, UT, US). The analysis was performed in a heating ramp mode from 25°C to 160°C at a rate of $5°C.min^{-1}$, and an Argon flow of 50 mL/min. Results were obtained as sorption curves for each dough sample. The percentage of weight loss was obtained, and the derivative of the weight loss was calculated using software TA Universal Analysis 2000. Hence two curves, of which the percentage of free water and bound water obtained were calculated.

Differential scanning calorimetry (DSC)

For scanning calorimetry technique, samples from the different freezing rates and storage times were tracked from the center of frozen dough (-20°C) and weighed (~20 mg) into an aluminum pan (50mL, 0.1mm, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), which were sealed after weighed. To avoid melting of the frozen samples, they were weighed and transported to the equipment on a bed of solid CO_2. The measurement was carried out in a differential scanning calorimeter (TA Instruments DSC Q200, New Castle, DE, and Lindon, UT, US). Dough sample was cooled up to -50°C with a cooling rate of 5°C/min, then heated at 5°C/min rate, up to 50°C and a nitrogen flow of 50 mL/min was remained. The pan with the dough sample was compared to a tray of empty aluminum pan (Baier and Conde, 2005). For each treatment were obtained thermogram curves. The enthalpy of fusion ($\Delta H_{melting}$) (J/g) and glass transition temperature (Tg) (°C) were calculated using a software (TA Universal Analysis 2000) (Baier-Shenk *et al.* 2005).

Amount of freezable water

Calculations of freezable water were made following the equation reported by Baier-Shenk *et al.* (2005), and using the information extracted from DSC curves:

$$FW = \frac{\Delta H_{melting}}{\Delta H_{ice} \times WC}$$

Where FW= frozen water ($g.100\ h\ of\ total\ water^{-1}$); $\Delta H_{melting}$= melting enthalpy of ice in the sample ($J.g^{-1}$); ΔH_{ice}= enthalpy of fusion of ice ($335J.g^{-1}$); WC= water content of the dough (59.3 $g/100_{wb}$). Duplicate measurements were made for each treatment.

Hydrogen ion activity (pH)

To evaluate if hanges in dough pH caused redistribution of water, the 02-52 method of A.A.C.C. (2000) was used to measure pH. From the center of thawed dough, were taken 15 g and was suspended in 100 mL of water cold boiled. The sample suspended was stirred over

continuously for 30 min to remain the particles in suspension, and then allowed to rest for 10 min, the supernatant is decanted and the pH was measured with the method electrometric using a potentiometer (Corning, model GO1305A, US) and electrodes calibrated with buffer solutions known.

Experimental Design and Statistical Analysis

A 2x5 factorial design experiment was used, where the factors were: rate of freezing, with two levels (slow freezing rate, -0.14°C/min or fast freezing rate, -1.75°C/min) and storage time with five levels (0, 14, 28, 42 or 56 days). To determine the effect of the different factors in each evaluation water proportions, enthalpy and pH, an analysis of variance (ANOVA) was performed at a 95% level of confidence. The Duncan test was used to determine differences among specific treatments. The statistical analysis was done using the Statistical Analytical Software System (SAS Institute, Inc. Cary, NC 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Thermogravimetric Analysis

To determine the effect of freezing rate and storage time on the proportion of free and bound water in frozen dough, an analysis of variance (ANOVA) on the gathered data was performed. Fig. 1 shows TG thermogram to frozen dough during the storage time. It was found that only the storage time affected significantly ($p<0.05$) the content of free water and bound water. Table 1 shows the effect of storage time on the proportion of free and bound water is frozen sample dough. During the storage time, there was a significant increase ($p<0.5$) of 27.74 % in the proportion of free water from 0 to 56 days of storage. In contrast, the amount of bound water had a significant decrease ($p<0.05$) of 38 % during the same storage time.

Similar trends were found by Baier-Shenk *et al.* (2005) but in contrast with our investigation they frozen dough at -26°C to slow freezing rate only and storage at 56 days; and Bot (2003) they investigated the concentration of water in gluten frozen. They observed an increase in the amount of free water during storage time. Rasanen *et al.* (1998) attributed the increase in free water to increase the size of the ice crystals. Ice crystals cause redistribution of water in frozen dough, resulting in drying polymers and water in large spaces within the system. It could mean that after thawing water ice crystals formed did not return to the original location in the ground system. This is also related to the changes that occur in the protein molecules that modify their conformation and interactions and lose some links previously done with water. This means that regardless of the rate of freezing, the water does not return to its original state within the system and although initially form small crystals during freezing during storage, small crystals are grouped to form larger crystals. The growth of ice crystals may be controlled by reducing the water content (Larsson and Eliasson 1996). Furthermore, it has been reported that between 35 and 50% of total water dough is frozen (Rasanen *et al.* 1998; Laaksonen and Roos 2000;

204 Matuda *et al.* 2005; Ribotta and Le Bail 2007). This suggests that the gluten dehydrated
205 slowly during the freezing process and frozen storage.
206
207 **Differential scanning calorimetry (DSC)**
208
209 To determine the effect of freezing rate and storage time on the enthalpy of fusion ($\Delta H_{melting}$)
210 and glass transition temperature (Tg), an analysis of variance (ANOVA) was performed. Fig. 2
211 shows DSC thermogram to frozen dough during the storage time. It was found that only the
212 storage time affected significantly ($p<0.05$) to $\Delta H_{melting}$ and Tg. Table 2 shows the results of
213 the effect of storage time on the melting enthalpy of frozen dough. During the storage time,
214 there was a significant increase ($p>0.05$) of 16.56 J/g in the enthalpy of fusion from 0 to 56
215 days of storage. . Tg temperature had not a significant effect ($p>0.05$), during the storage time
216 and had a mean of Tg was 8.22 ± 0.4 °C.
217 This behavior is consistent with the trends found by Baier-Shenk et al. (2005) and Bot (2003).
218 They observed an increase of $\Delta H_{melting}$ during storage time suggesting significant changes in
219 the ice crystals during prolonged frozen storage. It is important to establish the conditions for
220 storage The increase in the enthalpy of fusion could mean that more energy is required to melt
221 larger ice crystals, which could be probably evidence that recrystallization during storage and
222 increasing the size and amount of crystals occurs. When frozen dough is thawed, and its
223 temperature exceeds 0°C, the crystals melt water but this water does not return to its original
224 state in the matrix of gluten. This gluten dehydration has negative effects on the structure of
225 the dough and quality of baked products (Nicolas *et al.* 2003). During the storage time, there
226 was a tendency to keep the Tg. The glass transition temperature of gluten in the frozen state is
227 to -7 ° C (Fennema, 1996), starch is -6 ° C and wheat dough is in a range from -5 to -10 ° C,
228 which agrees with the values found. The glass transition temperature (Tg) is critical important
229 in food freezing. In this condition, the speed of reactions or transitions resulting in the loss of
230 dough quality decreases. Consequently, frozen at temperatures below the glass transition
231 temperature, will result in lower spreed of food spoilage reactions, maintaining its quality
232 longer.
233
234 **Freezable water**
235
236 To determine the effect of freezing rate and storage time on the amount of freezable water, an
237 analysis of variance (ANOVA) was conducted. Only the storage time had a significant effect
238 ($p<0.05$) on the amount of freezable water. Table 3 shows the effect of storage time on the
239 amount of freezable water in frozen dough. During storage (0 to 56 days), there was an
240 increase of 13.66% in the amount of freezable water. .
241
242 This behavior is consistent with that reported by Baier-Shenk *et al.* (2005) and Bot (2003).
243 They observed an increase in the amount of freezable water during storage time. The amount
244 of freezable water was calculated from the enthalpy of fusion, which showed an increase
245 during storage time. This increase in the amount of freezable water during storage time
246 indicates a progressive release of water from the protein fraction and other components of the
247 composition (Lu and Grant 1999; Bhattacharya *et al.* 2003; Sharadanant and Khan 2003). The
248 redistribution of water changes the properties of dough and bread. There are many

controversial definitions of bound water; one of them is "the water does not freeze at -40 ° C" (Fennema 1996). Although at a temperature of -40 ° C can be a small amount of unfrozen water, that it is generally considered that in this condition the freezing process ended, denominating unfreezable water to the amount of unfrozen water at that temperature (Hamdami *et al.* 2004). The increase in the amount of freezable water is consistent with the results obtained by the Thermogravimetry technique, where an increase in the fraction of free water was observed. This change in the amount of freezable water caused significant changes in the properties of the dough during the storage time.

Hydrogen ion activity (pH)

To determine the effect of freezing rate and storage time on pH, an analysis of variance (ANOVA) was conducted. It was found that freezing rate and storage time had a significant effect on pH ($p<0.01$) and the interaction also affected very significantly ($p<0.01$) pH. In Fig. 3, pH of the dough frozen at either the slow or fast freezing rate after different storage time is shown. During the storage, the dough frozen pH decreased very significantly ($p<0.01$). The dough frozen using the fast freezing rate had the lower pH than the dough frozen using the slow freezing process.

Zanoni *et al.* (1993) found a good quality flour for baking, has a pH between 5.7- 6.1, based on the fact that flour mixed with unfrozen water would be the proper state of good quality for baking. In this investigation it was found that as increased storage time and the rate of freezing, decreased pH value below 5.7, indicating that the dough lost quality and was acidified during the storage, presenting one greater effect during rapid freezing. Changes in pH could be due to the concentration of solutes and redistribution of water in the dough occurs, which causes the pH change and in this case becomes more acid. The pH changes are very important because at pH close to 8, gliadins solubility is low (Thewissen *et al.* 2011), as the pH becomes more acidic or more alkaline, the solubility of proteins increases, which could affect the properties of dough and bread.

Although no statistically significant differences were obtained, there was a clear trend between the two freezing rates slow freezing resulted in the highest values in free water, enthalpy and freezable water. Silvas-García et al. (2014) dough freezing and storage below the same conditions had and decrement in overall quality of the dough and the bread. Dough frozen at a slow freezing rate exhibited a very significant decrease in the proportion of insoluble polymeric protein, an increase the protein solubility, a decreasein the resistance to extension, an increase in the viscous modulus (G') and a decrease in the gas retention was observed. In contrast, dough frozen at a fast freezing rate shows a decrease in the specific volume of the bread and an increase in its hardness and also a decrease in springiness. A higher content of IPP decreased the retention of CO_2, and bread was harder and less springy. These could be related with conformational changes inter and intramolecular interaction promoted by the redistribution of water after freezing and thawing.

CONCLUSION

Thermal analysis was an important tool to determine changes in water frozen dough. The storage time was the main factor affecting the proportions of free and bound water as well as the enthalpy (ΔH) and the amount of freezable water. During the storage, the ΔH melting of ice, the amount of freezable water increased and free water and pH decreased regardless of the rate of freezing and the type of crystals formed during the process occurs. Water migration continues during storage and promotes changes in pH of dough. This water migration and redistribution leds changes in dough and bread.

REFERENCES

ASGHAR, A., ANJUM, F. M., ALLEN, J. C. 2011. Utilization of dairy byoproduct proteins, surfactants, and enzymes in frozen dough. Crit. Rev. Food. Sci. *51*, 374-382.

AUTIO, K., SINDA, E. 1992. Frozen doughs: rheological changes and yeast viability. Cereal Chem. *69* (4), 409-413.

BAIER-SCHENK, A., HANDSCHIN, S., and CONDE-PETIT, B. 2005. Ice in prefermented frozen bread dough- an investigation based on calorimetry and microscopy. Cereal Chem. *82*(3), 251-255.

BERGLUND, P.T., SHELTON, D.R., FREEMAN, T.P. 1991. Frozen bread dough ultra structure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycles.Cereal Chem. *68*, 105-107.

BHATTACHARYA, M., LANGSTAFF, T. M., and BERZONSKY, W. A. 2003. Effect of frozen storage and freeze-thaw cycles on the rheological and baking properties of frozen doughs. Food Res. Int. *36*, 365-372.

BOEHM, D.J., BERZONSKY, W.A. and BHATTACHARYA, M. 2004. Influence of Nitrogen Fertilizer Treatments on Spring Wheat (*Triticumaestivum L.*) Flour Characteristics and Effect on Fresh and Frozen Dough Quality. Cereal Chem. *81*, 51–54.

BOT, A. 2003. Differential scanning calorimetric study on the effects of frozen storage on gluten and dough. Cereal Chem. *80*, 366-370.

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.

ESSELINK, E.F.J., VAN AALST, H., MALIEPAARD, M., VAN DUYNHOVEN, J.P.M. 2003. Long-term storage effect in frozen dough by spectroscopy and microscopy, Cereal Chem. *80* (4), 396-403.

FENNEMA, O. 1996. Food Chemistry. 2ª Ed., Acribia. P.p.54-57.

HUANG, W., KIM, Y., LI, X., RAYAS-DUARTE, P. 2008. Rheofermentometer parameters and bread specific volume of frozen sweet dough influenced by ingredients and dough mixing temperature. J. Cereal Sci. *48*, 639-646.

KENNY S, WEHRLE K, DENNEHY T, ARENDT EK. 1999. Correlations between empirical and fundamental rheology measurements and baking performance of frozen dough, *Cereal Chem. 76*(3), 421-425.

336 KULP K. (1995). Biochemical and biophysical principles of freezing. Kulp K, Lorenz K,
337 Brummer K, editores. Frozen and refrigerated doughs and batters. St. Paul:
338 American Association of Cereal Chemists. pag. 63.89.
339 LAAKSONEN, T.J. and ROOS, Y.H. 2000. Thermal, dynamic-mechanical and dielectric
340 Analysis of phase and state transitions of frozen wheat doughs. J. Cereal Sci.
341 *32*(3), 281-292.
342 LU, W., GRANT, L.A. 1999. Effects of prolonged storage at freezing temperatures on starch
343 and baking quality of frozen doughs. Cereal Chem. *76*, 656-662.
344 MATUDA, T. G., CHEVALLIER, S., PESSOA FILHO, P., LEBAIL, A., and TADINI, C. C.
345 2008. Impact of guar and xantan gums on proofing and calorimetric parameters of frozen
346 bread dough. J. Cereal Sci. *48*, 741-746.
347 MERYMAN, H. 1968. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes.
348 Nature. *218*, 333-336.
349 MEZIANI, S., JASNIEWSKI, J., RIBOTTA, P., ARAB-TEHRANY, E., MULLER, J.M.,
350 GHOUL, M. and DESOBRY, S. 2012. Influence of yeast and frozen storage on
351 rheological, structural and microbiological quality of frozen sweet dough. J. Food Eng.
352 *109*, 538-544.
353 NICOLAS, Y., SMIT, R.J.M., VAN, AALST H, ESSELINK FJ, WEEGELS PL, AGTEROF
354 GM. 2003. Effect of storage time and temperature on rheological and microstructural
355 properties of gluten. Cereal Chem. *80* (4), 371-377.

356 PETZOLD, G., AGUILERA, J. M. 2009. Ice morphology: fundamentals and technological
357 applications in foods. Food Biophysics. 4, 378-396.
358 RASANEN, J., BLANSHARD, J.M.V., MITCHELL, J.R., DERBYSHIRE, W., and AUTIO,
359 K. 1998. Properties of frozen wheat doughs at subzero temperatures. J. Cereal Sci.,
360 *28*,1-14.
361 RIBOTTA, P. D.; LEÓN, A. E., AÑÓN, M. C. 2005. Effects of freezing in frozen dough.
362 Cereal Chem. *80*(4), 454-458.
363 RIBOTTA, P.D., and LE BAIL, A. 2007. Effect of additives on the thermo–mechanical
364 behaviour of dough systems at sub–freezing temperatures. Eur. Food Res. Tech. *224*,
365 519–524.
366 ROOZENDAAL, H., ABU-HARDAN, M., FRAZIER, R.A. 2012. Thermogravimetric
367 analysis of water release from wheat flour and wheat bran suspensions. J. Food Eng.
368 *111*, 606–611.
369 SEGUCHI, M., NIKAIDOO, S. and MORIMOTO, N. 2003. Centrifuged liquid and
370 breadmaking properties of frozen.and.thawed bread dough. Cereal Chem. *80*, 264.268.
371 SHARADANANT, R., and KHAN, K. 2003. Effect of hydrophilic gums on the quality of
372 frozen dough: II. Bread characteristics. Cereal Chem. *80*(6), 773-780.
373 SILVAS-GARCÍA, M. I., RAMÍREZ-WONG, B., TORRES-CHÁVEZ, P., CARVAJAL-
374 MILLÁN, E., BARRÓN-HOYOS, J.M., BELLO-PÉREZ and L.A., QUINTERO-
375 RAMOS, A. 2014. Effect of freezing rate and storage time on gluten protein solubility
376 and dough and bread properties. J Food Process Eng. *37*(3), 237-247.
377 SINGH, R. P. and HELDMAN, D. R. 2001. Introduction to food engineering.3ra ed.
378 Academic Press, USA.
379 THEWISSEN, B.G., CELUS, I., BRIJIS, K., DELCOUR, J. A. 2011. Foaming properties of
380 wheat gliadinas. J. Agric. Food Chem. *59*, 1301-1375.

VARRIANO-MARSTON, E., HSU, H., MAHDI, J. 1980. Rheological and structural changes in frozen dough. Baker's Dig. *54*, 32-34.

YI, J., and KERR, W. 2009. Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties. Food Sci. Technol. *42*, 1474-1483.

ZANONI, B., PERI, C. 1993. A study of the bread-baking process. I: aphenomenological model, J. Food Eng. *19*(4), 389–398.

TABLE 1. EFFECT OF STORAGE TIME ON THE PROPORTION OF FREE WATER AND BOUND WATER FROM FROZEN DOUGH

Storage time (days)	Weight (%)	
	Free water	Bound water
0	29.66 a[1]	29.93 a
14	35.55 a	24.04 a
28	37.98 ab	21.61 ab
42	49.98 b	19.61 b
56	41.05 b	18.55 b

[1]Within a column, values with different letter are statistically different ($P < 0.05$).

TABLE 2. THE EFFECT OF STORAGE TIME ON THE MELTING ENTHALPY ($\Delta H_{melting}$) OF FROZEN DOUGH

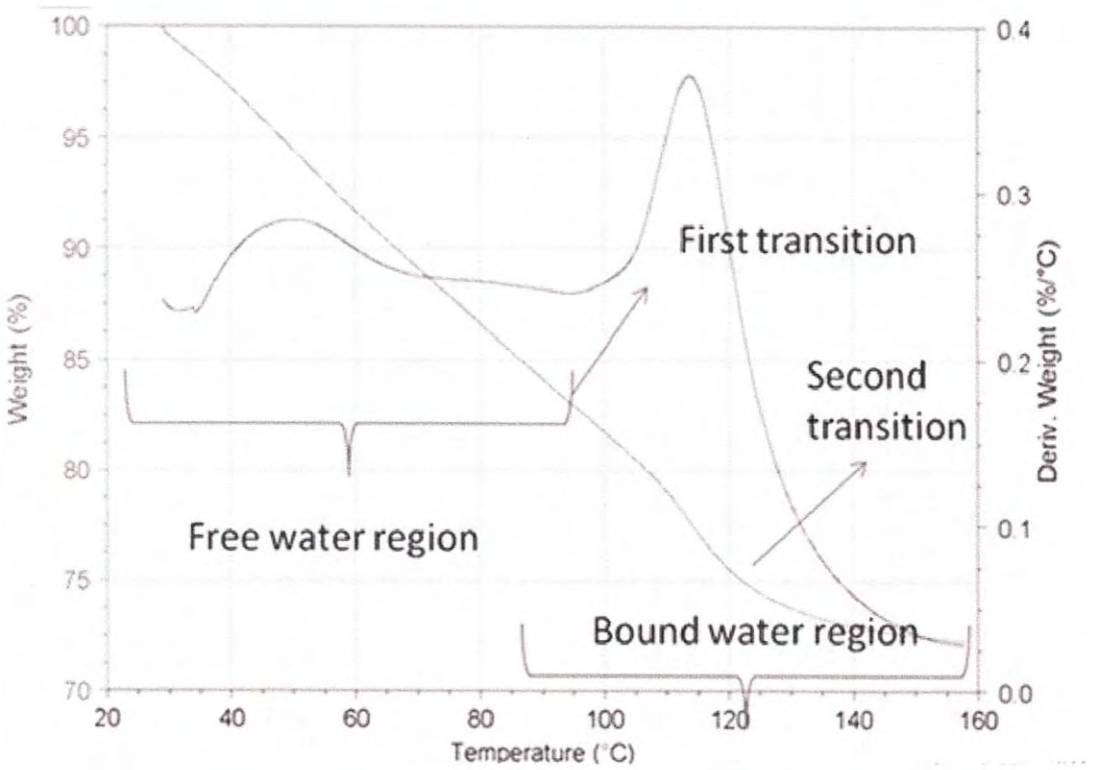
Storage time (days)	$\Delta H_{melting}$ (J/g)
0	58.42 a[1]
14	62.29 a
28	63.29 ab
42	66.97 b
56	70.02b

[1]Within a column, values with different letter are statistically different ($P < 0.05$).

TABLE 3. EFFECT OF STORAGE TIME ON THE AMOUNT OF FREEZABLE WATER IN FROZEN DOUGH

Storage time (days)	Freezable water (g/100g of sample)
0	29.26 a[1]
14	31.05 ab
28	31.69 ab
42	34.78 b
56	33.88 b

[1]Within a column, values with different letter are statistically different ($P < 0.05$).



505

506

507 **Fig.1** TGA THERMOGRAM OF FROZEN DOUGH AT 0 DAYS AND 56 DAYS OF
508 FROZEN STORAGE

509

510

511

512

513

514

515

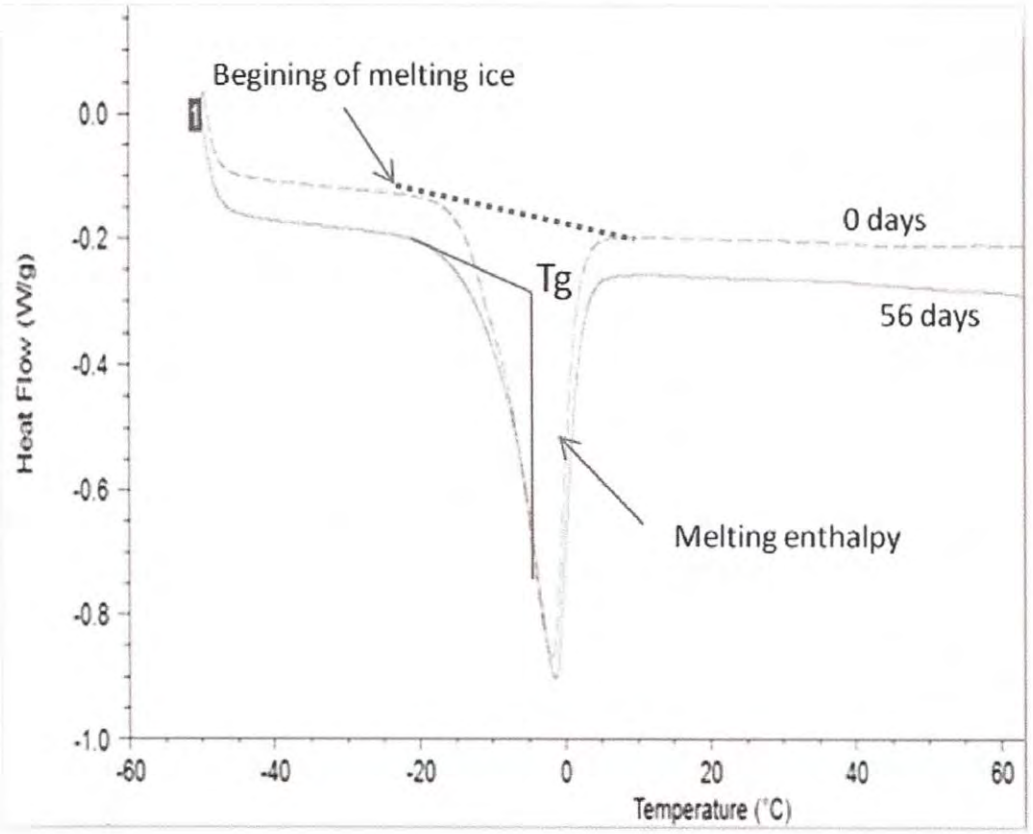
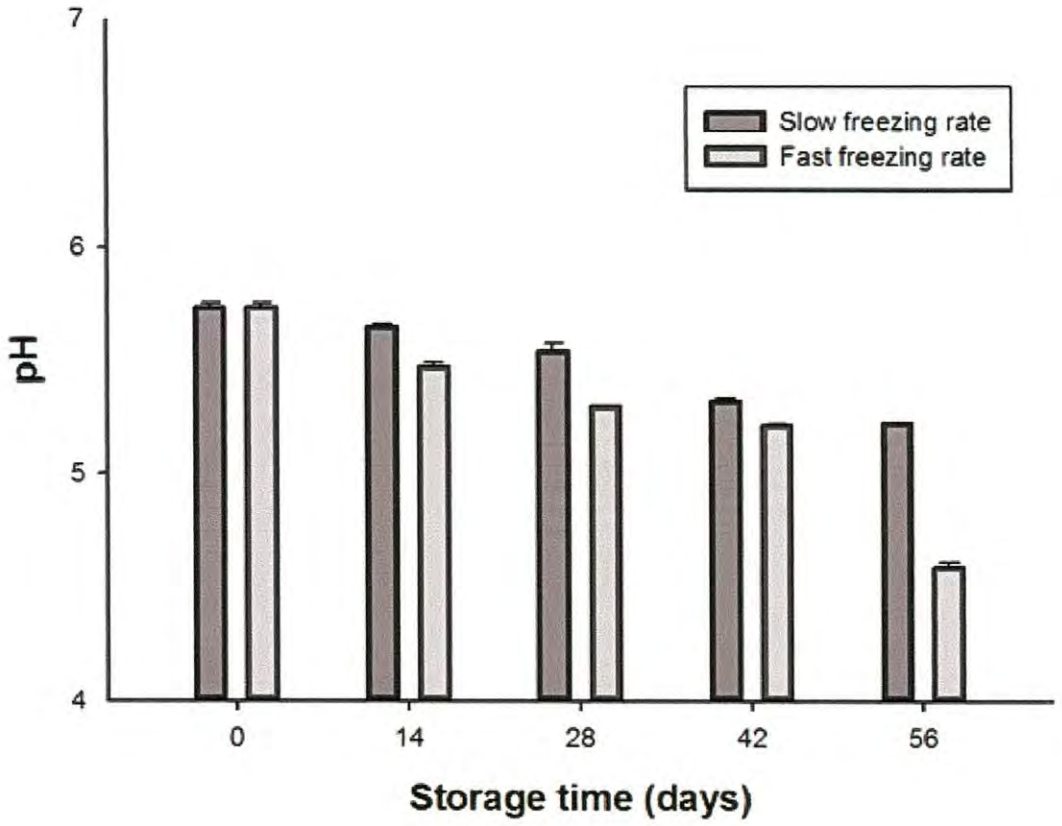


Fig. 2 DSC THERMOGRAM OF FROZEN DOUGH AT 0 DAYS AND 56 DAYS OF FROZEN STORAGE

538

539



540

541

542

543

544 **Fig. 3** pH OF THE DOUGH FROZEN USING THE SLOW OR FAST FREEZING RATES
545 AND STORED AT DIFFERENT TIMES. Bars indicate the standard deviation.

CAPÍTULO 6

Etapa 2: Cambios en las Propiedades Fermentativas, Proteicas y Reológicas en Masa Congelada y Calidad del Pan

En este capítulo se discuten los resultados de los efectos de la velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento, sobre las propiedades fermentativas, proteicas, reológicas y de panificación de masa congelada. A continuación se describe brevemente el planteamiento y realización de dicha investigación.

Hipótesis

La velocidad de congelación afecta las proteínas de gluten de la masa, modificando la capacidad de retener el CO_2, viscoelasticidad y extensibilidad; esos cambios se ven reflejados en la calidad del pan.

Objetivo

Evaluar el efecto de la velocidad de congelación y tiempo almacenamiento sobre la solubilidad de las proteínas del gluten, propiedades fermentativas y reológicas de la masa, así como la calidad del pan.

Metodología

A partir de la masa congelada, las muestras se fermentaron y con parte de ellas se realizaron las diferentes evaluaciones y con otra parte se elaboró pan.

Evaluaciones en masa

Proteínas de Gluten. Para extraer las proteínas, se tomaron 250 mg de masa, luego se solubilizaron con 1 ml de propanol al 50%, seguido de agitación en vortex por 5 min, luego se tomaron 500 µL en un vial, la operación se realizó dos veces y los extractos fueron combinados para analizarlos en HPLC-SEC (Bean et al., 1998). Para determinar la cantidad de proteína polimérica insoluble se usó el procedimiento descrito por Bean et al. (1998), para

T-T1501191

solubilizar las proteínas en propanol al 50%, el pellet resultante se secó y se le determinó el contenido de Nitrógeno usando un determinador de Nitrógeno Leco FP-528 (St. Joseph, MI). El contenido de proteína por contenido de Nitrógeno fue obtenido como N × 5.7. Para fines comparativos se llevó a cabo la misma prueba pero en masas de harina y agua. La Proteína soluble (50% propanol) fue analizada en un sistema HPLC Varian Prostar (Palo Alto, CA) usando una columna BIOSEP-SEC-S4000 (Phenomenex, Torrence, CA) con un tamaño de partícula de 5 µm, diámetro de 7.8 mm, y 200 mm de largo. La fase móvil fue acetonitrilo/agua (50:50) con 0.1% de TFA (Lookhart et al., 2003). La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C con un flujo de 0.5 mL/min. La detección se hizo con un detector de arreglo de diodos (Varian, Palo Alto CA) a 210 nm. En los Cromatogramas se obtuvieron 3 picos, según fueron eluyendo, los dos primeros picos corresponden a las proteínas monoméricas y el tercero a las proteínas poliméricas solubles. Los parámetros obtenidos fueron proteína polimérica soluble, gliadinas, albúminas-globulinas.

Potencial de Fermentación. Para conocer los cambios durante la fermentación, se utilizaron las masas congeladas de 315 g, las cuales fueron descongeladas y directamente puestas en la cámara hermética de un reofermentografo (marca Chopin, tipo Rheo F3), con una pesa de 2 kg, durante 3 horas a temperatura constante (28.5°C). Se obtuvo la producción, retención y desprendimiento de CO_2 (mL).

Prueba de Extensibilidad. La prueba se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Kieffer et al. (1998), usando la plataforma de Kieffer en un analizador de textura (marca Stable Micro Systems Texture Analyzer, modelo TA-TX plus). Se tomaron 15 g de la muestra previamente descongelada y fermentada, se colocaron en la prensa de moldeo durante 10 min (modificación de la prueba de Kieffer, quienes usaron 40 min de reposo en el moldeo). Las condiciones de prueba fueron: velocidad de pre-prueba 2.0 mm/s, velocidad de prueba 3.3 mm/s, velocidad pos-prueba 10.0 mm/s, distancia 75 mm. Los parámetros obtenidos fueron la resistencia a la extensión (g-f) y la extensión (mm).

Evaluaciones Viscoelásticas (Método dinámico). Las muestras de masa descongelada y fermentadas, se colocaron en una bolsa de polietileno y sellada para evitar la deshidratación, e inmediatamente se llevaron a su medición en el reómetro, (Magaña-Barajas, 2009). 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 sistema peltier para mantener la temperatura de la muestra a 25°C. Los barridos oscilatorios fueron medidos a una deformación de 0.1% bajo el régimen lineal de viscoelastisidad, en un rango de frecuencia de 0.1 a 100 rad/s y una separación entre platos de 2mm. Se midieron, el módulo de almacenamiento o elástico (G´, Pa), módulo de pérdida o viscoso (G´´, Pa) y la tangente del ángulo de fase (Tan δ). Estos parámetros fueron obtenidos usando el software de control (RSI Orchestrator, Rheometrics Scientific).

Elaboración de Pan

A partir de la masa en forma de pan 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, para posteriores determinaciones.

Evaluaciones en Pan

Volumen Epecífico. Después del horneado el pan se enfrió durante 2 horas y se midió el volumen específico el cual se obtuvo de la relación volumen/peso, y de acuerdo al método 10-09 de la A.A.C.C. (2001). Los panes fríos, se pesaron en una balanza granataria, (Marca Ohaus, Triple Beam 700/800 series, Poland), para calcular su volumen específico. La prueba se llevó a cabo con un medidor de volumen (marca National MFG Company, modelo PUP) calibrado a un volumen de 400 cm^3 de semilla de nabo.

Textura de la Miga (Análisis de perfil de textura, TPA, por sus siglas en inglés). Se evaluaron parámetros de textura del pan, a las 2, 24 y 48 horas de almacenado a temperatura ambiente (25 °C), después de haberse horneado. La textura se evaluó utilizando el método de TPA en un Analizador de Textura (marca Stable Micro SystemsTexture Analyzer, modelo TA-TX plus). Las condiciones de prueba fueron, doble compresión, a una deformación del 75 %, velocidad de pre-prueba 1 mm/s, velocidad de la prueba 3 mm/s, velocidad de pos-prueba 5 mm/s, tiempo de prueba 5 s. Los parámetros medidos fueron, dureza, cohesividad, resorteabilidad, gomosidad, masticabilidad, resilencia.

Resultados

Se encontró que tanto el tiempo de almacenamiento como la velocidad de congelación afectan las propiedades de la masa debido a que cambian las proporciones de las fracciones de proteínas de gluten (Figuras 1-4, ver págs. 46 y 47), disminuye el elemento elástico (Figuras 5-7, ver págs. 48 y 49) y la extensibilidad (Tabla 2, ver pág. 48). Al mismo tiempo, disminuye la retención de CO_2, y en pan disminuye su volumen (Figura 9, ver pág. 50) e incrementa la dureza (Tabla 3, ver pág. 51). En esta investigación se observaron cambios significativos, entre los tiempos de almacenamiento para ambas velocidades de congelación, en todas las fracciones proteicas. La proteína polimérica se solubilizó más durante todos los tiempos de almacenamiento y para cada tiempo de almacenamiento la solubilidad fue mayor para la masa que fue congelada en forma lenta. Las gliadinas aumentaron durante el tiempo de almacenamiento y aumentaron en una mayor proporción en la congelación lenta que en la rápida. Esto podría indicar que una parte de proteínas que no eran gliadinas con peso molecular similar, lograron eluir junto a estas aumentando esta área, lo que sugiere que posiblemente hubo una ruptura mecánica por parte de los cristales de hielo o bien una hidrólisis, que formó péptidos con esas características. Por otro lado, el aumento en la fracción de A-G puedo deberse a péptidos con un peso molecular similar que eluyeron a ese tiempo o bien, restos de proteínas provenientes de la lisis de las levaduras. Todo esto está relacionado con los cambios en la redistribución de agua y pH que se discutieron anteriormente en la etapa 1. Estos cambios en las fracciones proteicas, se pudieron confirmar, al medir la extensibilidad y viscoelasticidad de la masa. Los cambios en las proteínas provocaron una disminución del elemento elástico del gluten, el debilitamiento de la masa, pérdida de la extensibilidad y la disminución de la retención de CO2. En conjunto los cambios en la masa suscitaron que el pan presentara menor volumen.

Conclusión

La velocidad y el tiempo de almacenamiento afectan las propiedades de la masa y del pan. Existe un aumento de la depolimerización de las proteínas de gluten, disminución la extensibilidad y elasticidad de la masa con la subsecuente pérdida de la retención de gas, los

cambios de la masa afectan disminuyendo el volumen del pan e incrementando la dureza de la miga. Todo esto se detalla en el artículo que a continuación se presenta.

Artículo científico: Effect of freezing rate and storage time on gluten protein solubility, and dough and bread properties

Este artículo fue publicado en la revista Journal of Food Process Engineering (Editorial Wiley, by John Wiley & Sons, Inc.). En el se detallan el planteamiento y los resultados de la etapa 2.

Journal of Food Process Engineering

Journal of Food Process Engineering ISSN 1745-4530

EFFECT OF FREEZING RATE AND STORAGE TIME ON GLUTEN PROTEIN SOLUBILITY, AND DOUGH AND BREAD PROPERTIES

M.I. SILVAS-GARCÍA[1], B. RAMÍREZ-WONG[1,5], P.I. TORRES-CHÁVEZ[1], E. CARVAJAL-MILLAN[2], J.M. BARRÓN-HOYOS[1], L.A. BELLO-PÉREZ[3] and A. QUINTERO-RAMOS[4]

[1]Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico
[2]Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, Mexico
[3]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, Yautepec, Morelos, Mexico
[4]Universidad Autonoma de Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, Mexico

[5]Corresponding author.
TEL: 52-662-259-22-07;
FAX: 52-662-259-22-07;
EMAIL: bramirez@guaymas.uson.mx

Received for Publication December 3, 2014
Accepted for Publication January 23, 2014

doi:10.1111/jfpe.12079

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the freezing rate and storage time on the solubility of gluten proteins and on the fermentative and rheological properties of dough as well as the bread quality. Increased storage time very significantly decreased ($P < 0.01$) the quality of the dough and the bread. Dough frozen at a slow freezing rate exhibited a very significant decrease in the proportion of insoluble polymeric protein (IPP), an increase the protein solubility, a decrease the resistance to extension, an increase the viscous modulus (G'') and the gas retention decreased. In contrast, dough frozen at a fast freezing rate displayed a very significant decrease ($P < 0.01$) in the specific volume of the bread and a very significant increase ($P < 0.01$) in its hardness and a decrease in springiness. A higher content of IPP decreased the retention of CO_2, and bread was harder and less springy. In conclusion, a slow freezing rate and a short storage period provide better quality bread.

PRACTICAL APPLICATIONS

The quality of bakery products depends on the viscoelastic properties of the gluten proteins. In frozen dough, the gluten proteins are modified by the migration of water to form ice crystals. The size and shape of the crystals determine the changes in the proteins. Assessing the effect of the freezing rate and the storage period of bread dough on the changes in these proteins may facilitate improving the characteristics of frozen dough and bread. The information obtained from this work showed that the frozen storage is the most important factor that affects the dough and bread quality, and slow freezing rate is better to preserve the overall quality of frozen dough and bread. It could help bread makers to improve the quality of bread after thawing by using flours with protein quality with the features necessary for frozen dough and to obtain bread with better properties.

INTRODUCTION

Freezing process is widely used to preserve dough for bread making. When dough is frozen and stored at subzero temperatures, it is important to preserve the functional characteristics of the dough and the yeast viability, and to prevent damage to the proteins of the gluten network (Jiang *et al.* 2008). During freezing, ice crystals are formed as a consequence of a redistribution of water within the dough. The size, shape and location of the crystals can change and damage the physical structure of the dough and this affects the overall quality of the bread (Esselink *et al.* 2003; Baier-Schenk *et al.* 2005). The growth of ice crystals within the pores of the dough causes serious damage to its structure, due to the redistribution of water and the formation of ice crystals, which, in turn, affects the properties of biological and polymeric compounds, thus reducing the baking performance of the frozen dough (Esselink *et al.* 2003; Nicolas *et al.*

2003; Baier-Schenk *et al.* 2005). Dough damage is associated with the mechanical action of large ice crystals, which degrades the gluten network (Varriano-Marston *et al.* 1980; Berglund *et al.* 1991), whereas yeast cells are fractured by the small ice crystals within them (Singh and Heldman 2001). Consequently, the dough loses the ability to produce and retain gas (Hsu *et al.* 1979; Varriano-Marston *et al.* 1980; Autio and Sinda 1992; Ribotta *et al.* 2001).

The quality of the bread made from frozen dough is often lower than that of fresh dough (Seguchi *et al.* 2003). The decrease in bread quality is reflected in the reduction of the specific volume of the bread and texture deterioration. Bread quality is a function of several factors, including freezing rate and storage time (Selomulyo and Zhou 2007). These factors can promote a decrease in yeast activity and a weakening of the gluten network, modifying the fermentative, rheological and viscoelastic properties. All of these changes affect the quality of the bread volume and texture. The freezing rate and storage period have a significant effect on the properties of dough such as gas production and retention, and viscoelasticity (Meziani *et al.* 2012). Dough elasticity decreases, and adhesiveness increases (Yi and Kerr 2009). All of those changes indicate a weakening of the gluten network and a poor retention of gas (Havet *et al.* 2000; Kontogiorgos *et al.* 2008; Yi and Kerr 2009). Dough weakening during repeated thawing and freezing events is related to changes in protein solubility and composition (Inoue *et al.* 1994). The reduction in gluten cross-linking and water redistribution contributes to the loss of dough strength (Selomulyo and Zhou 2007). Gas production by the yeast is reduced because the viability of yeasts decreases dramatically during prolonged frozen storage (Oda *et al.* 1986; Codón *et al.* 2003). Therefore, the quality of the bread made from frozen dough is often inferior to that of freshly baked bread (Ribotta *et al.* 2001; Angioloni *et al.* 2008); the specific volume of the former bread is lower and its texture is substandard (Selomulyo and Zhou 2007; Phimolsiripol 2009; Yi and Kerr 2009).

The content of glutenin subunits of high molecular weight contributes to the high entrapment of carbone dioxide and results to a high volume of the bread (Wieser and Kieffer 2001). If there is a rupture of those polymers, it supposes a decrease of bread quality. It is due to the fact that there would be an increment of short chains from glutenin, and a low volume of bread would be expected (Ribotta *et al.* 2001). On the contrary, size exclusion chromatography is a tool to determine the hydrolysis of gluten proteins and the relationship with dough and bread properties (Bean *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2011). The aim of this study was to evaluate the effect of the freezing rate and the storage time on the gluten protein insoluble and soluble fractions and the fermentative and rheological properties of the dough as well as the bread quality.

MATERIALS AND METHODS

Raw Materials

Flour was obtained from milling a wheat cultivar called Kronstand. Wheat and freshly pressed baker's yeast (Azteca S.A. de C.V., Guadalajara, México) were kindly provided by MUNSA (Ciudad Obregón, Sonora, México). Other ingredients, such as salt (Mar de Cortés, Sales del Valle S.A. de C.V.), shortening (Inca, Alimentos Capullo, S. de R. L. C.V.) and improver (Magimix 40, SAFMEX S.A. de C.V.), were obtained from a local supermarket in Hermosillo, Sonora, México.

Flour Characterization

The content of moisture (method 44-40), ash (method 08-03), gluten (method 38-11), protein (method 46-13) and sedimentation volume (method 56-61A) of wheat flour were measured according to the methods of AACC (2000). The nitrogen content was determined using a nitrogen determinator (Leco FP-528, St. Joseph, MI), and the protein content was calculated using the formula N× 5.7. Rheological properties were evaluated with the farinograph (method 54-21), alveograph (method 54-30) and reofermentometer (method 54-30A) using the methods of the AACC (2000).

Dough Preparation and Freezing Process

In this study, a French-type bread formula was used; it comprised flour (100%, baker's percentage), compress yeast (3%), shortening (5%), salt (1.5%) and dough improver (2%). The ingredients were mixed in a mixer (National Mfg. Co., Lincoln, NE). Yeast was previously dissolved in water at 25C, and the remaining ingredients were added as solids. The resulting dough was rested for 5 min, divided into 50 g pieces and then hand-molded. The pieces of dough were immediately proofed for 10 min in a proofing cabinet (National Mfg. Co.) at 30C and 80% relative humidity (RH). Next, the samples were placed on individual trays and wrapped in polyethylene bags to be immediately frozen.

Dough samples were frozen at −20C with two different freezing rates. One set of the dough sample was frozen at −1.75C/min (fast freezing rate) in an ultra-low temperature freezer (ULT21866A, Thermo Scientific, Waltham, MA), and the other set of the dough sample was frozen at −0.14C/min (slow freezing rate) in a conventional freezer (GLFC1526FW1, Frigidaire, Mississauga, Canada). The time and the rate of freezing were established by measuring the temperature gradients with respect to time by preliminary tests (data not shown) with a Thermocoupe scanner Digi Sense 12 channel, 92000-00 (Cole-Parmer Instrument Co.,

Vernon Hills, IL). The freezing rate was defined by the initial temperature (25C) and the final temperature (−20C) in the center of dough (Singh and Heldman 2001). The conventional freezing time (slow rate) was 120 min at 0.14C/min, and in the ultra-low freezing (fast rate), the freezing time was 40 min at 1.75C/min. The freezing rate of 1.75C/min was three times faster than the freezing rate of 0.14C/min. Both frozen dough sample sets were stored at the same temperature of −20C in a conventional freezer for 0, 14, 28, 42 or 56 days.

Dough Thawing and Proofing

After the selected storage period, the frozen dough samples were thawed in a refrigerator (Whirlpool, ETI8NKXANO3, Whirlpool Co., Benton Harbor, MI). The thawing method was chosen by preliminary test (data not shown). The thawing rate and time were set by measuring the temperature gradients versus time of thawing (Singh and Heldman 2001). The frozen dough was thawed from −20C in the center of the dough up to 4C, which was the refrigerator temperature. The time to obtain this temperature gradient was 4 h and 15 min (Silvas-García *et al.* 2011). Next, the dough was proofed in a proofing cabinet (National Mfg. Co.) at 30C and 80% RH for 50 min, and then it was immediately used for various analyses.

Protein Analysis

Protein Extraction. Soluble proteins from 350 mg of dough were extracted twice using 1 mL of 50% propanol, vortexed in a micro tube using foam insert vortexer (Vortex Genie 2T, Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) for 5 min, and then 500 μL from each extraction step was collected and combined (Bean *et al.* 1998).

Insoluble Polymeric Protein (IPP) Determination. The IPP determination was conducted using the procedure described by Bean *et al.* (1998). The dough (350 mg) was extracted exhaustively with 50% propanol (1 mL, three times), and after drying the pellet, the nitrogen content was determined using a nitrogen determinator (Leco FP-528). The protein content was obtained using the formula N × 5.7.

Size-Exclusion Chromatography (SEC). Soluble proteins (50% propanol) were analyzed on a Varian Prostar high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Palo Alto, CA) using a BIOSEP-SEC-S 4,000 column (Phenomenex, Torrence, CA) with a 5-μm particle size, 7.8-mm diameter and 200-mm length. The mobile phase was acetonitrile/water (50:50) containing 0.1% trifluoracetic acid (Lookhart *et al.* 2003). The column temperature was maintained at 40C, and the flow rate was 0.5 mL/min. Proteins were detected at 210 nm using a diode array detector (Varian, Palo Alto, CA). The chromatograms contained three peaks, which were eluted; the first peak corresponded to soluble polymeric protein, and the last two peaks corresponded to monomeric proteins. The parameters examined were soluble polymeric proteins, gliadin, albumin and globulin fractions.

Viscoelasticity Evaluation

Fundamental rheological measurements of dough were obtained using dynamic oscillation tests on a controlled stress rheometer (Rheometrics Scientific brand, model RSF III, Piscataway, NJ) equipped with parallel plates 25 mm in diameter in plate-plate geometry with a 2-mm gap between the plates. After placing the dough on the lower plate, the upper plate was lowered, and the excess dough sample was trimmed. The exposed surface was covered with a thin layer of petroleum jelly to prevent moisture loss during the testing. For the oscillatory test, frequency sweeps were performed at a strain of 0.1% in the linear region, at temperature of 25C, which was controlled by a Peltier thermoelectric module. Dough viscoelasticity was evaluated from the storage modulus (G'), loss modulus (G'') and phase angle δ at a frequency ranging from 0.1 to 10 rad/s. The values were calculated using RSI Orchestrator software (Rheometric Scientific) (Magaña-Barajas *et al.* 2009).

Dough Uniaxial Extensibility (Kieffer Method)

Dough resistance to extension was measured in a texture analyzer (Stable Micro Systems Texture Analyzer, TA-TX plus, Surrey, U.K.) using the Kieffer dough rig (Kieffer *et al.* 1998). Dough sample was rested for 10 min in a molding form press after it was placed in the center of the sample platform over the hook of the Kieffer rig platform. The test was conducted in tension mode and returned to start again. The conditions were a pretest speed of 2.0 mm/s, a test speed of 3.3 mm/s, a post-test speed of 10.0 mm/s, a distance of 75 mm and a trigger force of auto-5 g-f. The extensibility was measured as the resistance to extension (g-f).

Gas Retention

A 315-g sample of thawed dough was placed directly in a rheofermentometer (F3 Choping, Villeneuve-La-Garenne Cedex, France) to measure the volumes of CO_2 produced and retained. The test was performed in a hermetically sealed chamber in the movable basket of the gas meter with a 2-kg cylindrical weight, with the cover of the vat equipped with an optical sensor. The test was conducted at 28.5C for

3 h and replicated, and the results were reported as the volume (mL) of CO_2 produced and retained.

Bread Preparation

To make bread, after thawing and proofing, part of the dough sample was baked at 250C for 10 min in an electric oven (Partlow, National Mfg. Co.), then it was cooled at 25C and wrapped in polyethylene bags. Bread samples were stored for 2, 24 and 48 h at 25C before evaluation. Bread temperature was controlled by air conditioning.

Bread Evaluations

The bread volume was determined by rapeseed displacement (National Mfg. Co. PUP), and the bread was weighed 2 h after baking. The specific volume was calculated by dividing the bread volume by the weight, following the method 10-09 of AACC (2000).

The texture of the bread was evaluated at different storage times using the texture profile analysis with a texture analyzer (Stable Micro Systems, TA-TX plus). Bread samples were cut into cubes of 10 × 10 × 10 mm. A 25-mm lapped Perspex cylinder probe was used for testing using the following conditions: double compression and 25% of deformation; pretest speed: 1 mm/s; test speed: 3 mm/s; post-test: speed 5 mm/s; and test time: 5 s. The texture of the bread was reported only as hardness and springiness. These two parameters were the most significantly affected.

Experimental Design and Statistical Analysis

A 2 × 5 factorial experimental design was used, in which the factors were the freezing rate (rapid, −1.75C/min, or slow, −0.14C/min) and the storage period (0, 14, 28, 42 or 56 days). An analysis of variance (ANOVA) was conducted on the data gathered from each evaluation, using a 95% confidence level. The mean values were compared using Turkey's test. The statistical analysis was performed using statistical analysis with SAS software 2002 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTS AND DISCUSSION

Flour Characteristics

Table 1 shows the characteristics of the wheat flour used. The overall quality of flour to bread making was good, although it is recommended to use flour with a higher protein content than the obtained in this research and dough must have greater strength than used in conventional bread making (Rosell and Gómez 2007; Olivera 2011).

TABLE 1. PHYSICOCHEMICAL AND RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE WHEAT FLOUR

Characteristic	Mean
Chemical analysis	
Moisture (%)	14.95 ± 0.1‡
Asht (%)	0.48 ± 0.004
Proteint (%)	11.72 ± 0.12
Sedimentationt (mL)	49.5 ± 0.38
Glutent (%)	10.71 ± 0.15
pH	6.25 ± 0.35
Farinograms	
Water absorption (%)	59.6 ± 0.26
Stability (min)	4.75 ± 0.25
Development time (min)	8.75 ± 0.25
Alveograms	
Deformation energy (W) (J)	415.5×10^{-4} ± 0.61
Curve configuration ratio (P/L) (mm)	1.47 ± 0.02
Puffed index (P/G) (mmH_2O)	5.9 ± 0.01

† Dry basis.
‡ Standard deviation.

Protein Analysis

Figure 1 shows the proportion of IPP for dough frozen at either the slow or fast freezing rate after different storage periods. A highly significant gradual decrease ($P < 0.01$) in the IPP proportion was observed from 0 to 56 days of storage. During the storage, it was observed that the dough frozen at a slow freezing rate decreased very significantly ($P < 0.01$) by 7.46% in IPP, whereas the dough frozen at a fast freezing rate decreased by 3.73%. A reduction in the proportion of IPP indicates weakening of the gluten

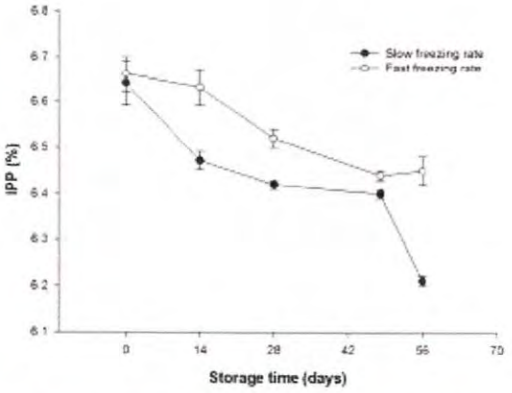


FIG. 1. CHANGES IN THE PROPORTION OF INSOLUBLE POLYMERIC PROTEIN (IPP) IN THE DOUGH AT DIFFERENT FREEZING RATES AND STORAGE TIMES
Bars indicate the standard deviation.

network. This result indicated that the slow freezing rate weakened the dough significantly more than did the rapid freezing process. A similar behavior was reported by Zhang *et al.* (2011).

An increase in the proportion in area under the curve of SEC chromatographic analysis of soluble polymeric protein (SPP) also indicates the weakening of the gluten network. Figure 2 shows a highly significant gradual increase ($P < 0.01$) in the SPP proportion from 0 to 56 days of storage. After storage, it was observed that the dough frozen at a slow freezing rate had a more significant proportion of SPP ($P < 0.01$) compared with that of the dough frozen using the rapid process. This result may indicate a modification of the polymer chains.

Figure 3 shows a highly significant gradual increase ($P < 0.01$) in the proportion of gliadins (GLI) from 0 to 56 days of storage. After 14 days of storage, it was observed that the dough frozen using the slow process had a more significant proportion of GLI ($P < 0.01$) than the dough frozen using the fast freezing rate process. This could indicate the presence of peptides derived from the breakdown of the glutenins to similar size as gliadin, which solubilized and eluted in the same region of gliadins peak. This means that there was deterioration in the protein polymer and thus a weakening of the gluten network.

An increase in the proportion of albumins-globulins (A-G) might indicate lysis of the yeast cells. Figure 4 shows a highly significant gradual increase ($P < 0.01$) in the proportion of the A-G from 0 to 14 days of storage. After 14 days of storage, it was observed that the dough frozen using the slow process had a more significant increase in the proportion of A-G ($P < 0.01$) than did the dough

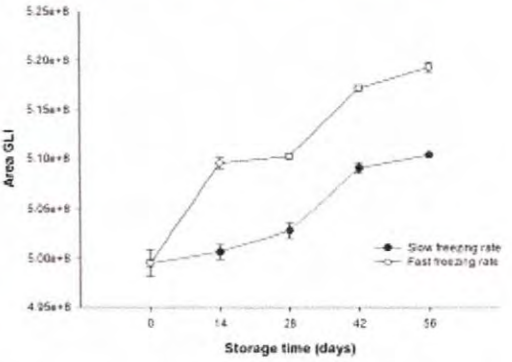


FIG. 3. CHANGES IN THE PROPORTION OF GLIADINS (GLI) IN THE DOUGH AT DIFFERENT FREEZING RATES AND STORAGE TIMES
Bars indicate the standard deviation.

frozen using the rapid process. Similar results were found by Zhang *et al.* (2011), wherein in refrigerated dough, they found an increment of albumin and globulin during the storage time. This result could indicate that freezing the dough slowly lyses the yeast cell significantly more than does freezing it rapidly.

HPLC-SEC procedures were useful to obtain information on changes in the solubility of the protein fractions induced by the freezing processes. In general, it was observed that there was a fragmentation of polymeric proteins, and this was observed in the increased area under the HPLC-SEC curve region of gliadins. This fragmentation had an effect on dough rheological properties, less strength of dough, and decreased elastic part and bread quality.

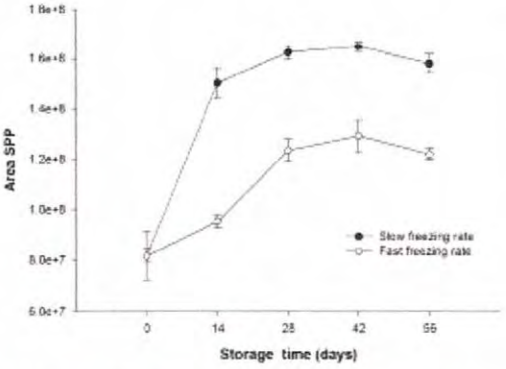


FIG. 2. CHANGES IN THE PROPORTION OF SOLUBLE POLYMERIC PROTEIN (SPP) IN THE DOUGH AT DIFFERENT FREEZING RATES AND STORAGE TIMES
Bars Indicate the Standard Deviation.

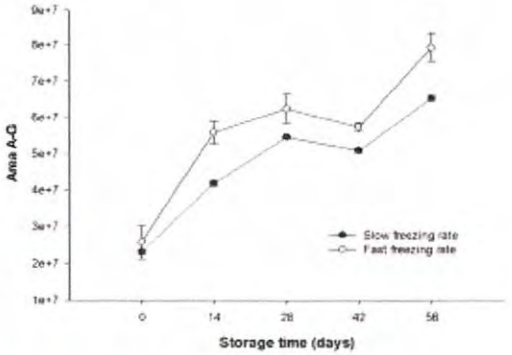


FIG. 4. CHANGES IN THE PROPORTION OF ALBUMINS AND GLOBULINS (A-G) IN THE DOUGH AT DIFFERENT FREEZING RATES AND STORAGE TIMES
Bars indicate the standard deviation.

TABLE 2. EFFECT OF FREEZING RATE AND STORAGE TIME ON UNIAXIAL EXTENSIBILITY OF DOUGH (KIEFFER TEST)

	Dough frozen storage time (days)									
	Slow freezing rate					Fast freezing rate				
Characteristics	0	14	28	42	56	0	14	28	42	56
Resistance to extension (g-f)	23.7a	21.5b	18.2c	15.4d	13.1e	23.7a	20.6b	17.4c	14.5d	12.0e
Extensibility at max (mm)	40.2a	28.0b	22.7c	19.1d	16.3e	40.2a	26.5b	20.9c	18.4d	12.9e

Within a row and for each freezing rate, means with the same letter are not statistically different at $P = 0.05$ ($P > 0.05$).

Dough Uniaxial Extensibility (Kieffer Method)

The resistance to extension value indicates dough's strength, which is a parameter of its bread-making quality. A decrease in resistance to extension indicates the weakening of the dough and its poor bread-making quality. Table 2 shows a highly significant gradual decrease ($P < 0.01$) of the resistance to extension value from 0 to 56 days of storage. During the storage, it was observed that the dough frozen using the fast freezing rate process decreased by 55.3% in resistance to extension, whereas dough frozen using the slow freezing rate process decreased by 50.6%. This result indicated that freezing using the slow process weakened the dough significantly more than freezing the dough using the fast process. The dough strength is related to IPP, a decrease of the proportion of these proteins suggests a loss of resistance to extension and moreover a weakening of the dough. These results agree with the observation of Angioloni *et al.* (2008) that the resistance to extension of frozen dough decreased with storage time and its adhesiveness increased. Similarly, Yi and Kerr (2009) assessed the properties of extensibility and adhesiveness of frozen dough and found that the extensibility decreased with storage time and that the storage period had a greater effect than did the freezing temperature. In addition, they observed an increase in the adhesiveness and an increase in the mobility of water during storage. According to the findings of Aibara *et al.* (2005), the expandability of dough decreased with freezing, resulting in poor bread-making rheological and quality of bread. Furthermore, the loaf volume decreased and the crumb firmness increased with the storage time.

Viscoelastic Properties

The viscoelastic properties of the gluten network result from the balance between extensibility and elasticity, both of which determine the quality of the dough used in bread making. The viscoelastic parameters examined were the storage modulus (G'), the loss modulus (G'') and the phase angle δ. To determine the effect of the freezing rate and storage time on the viscoelastic properties of dough, an ANOVA was performed using the viscoelastic values obtained at a frequency of 5 rad/s, which is within the linear region of viscoelasticity.

Figure 5 presents the elastic modulus (G'') curves at different frequencies and different storage periods for dough

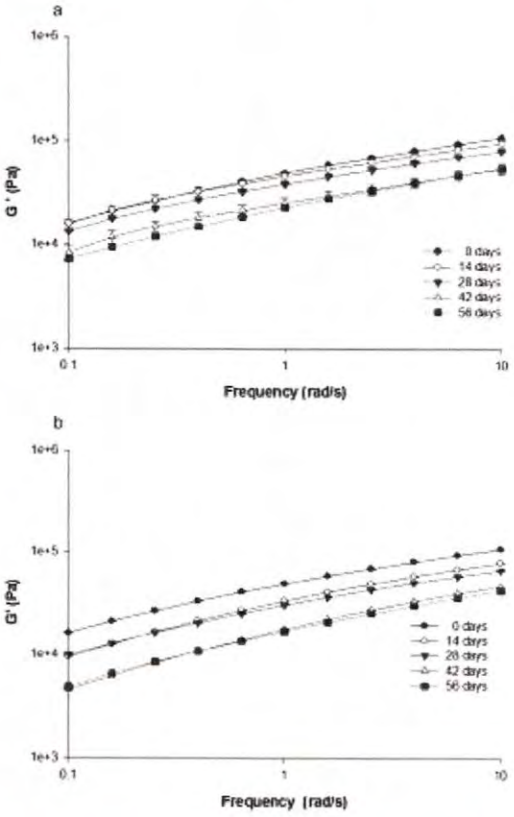


FIG. 5. CHANGES IN THE ELASTIC MODULUS (G') OF THE DOUGH AT DIFFERENT STORAGE TIMES AND AT (a) A SLOW FREEZING RATE AND A (b) FAST FREEZING RATE
Bars indicate the standard deviation.

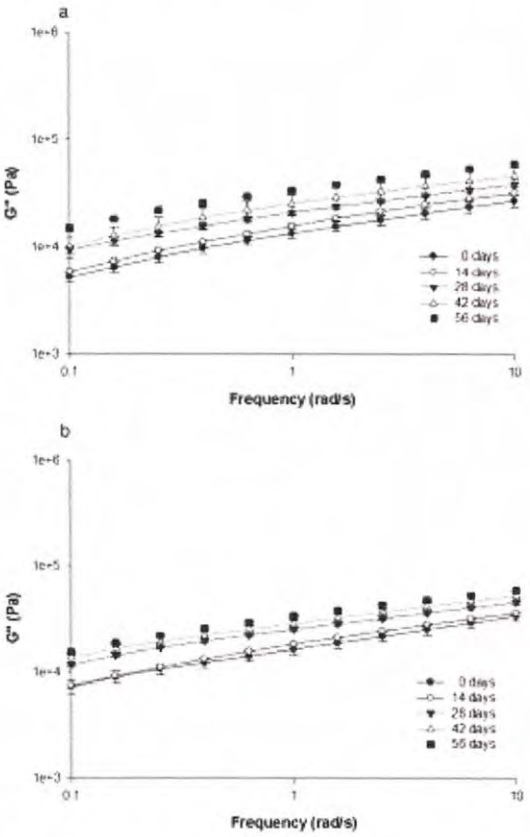


FIG. 6. CHANGES IN THE VISCOUS MODULUS (G'') OF THE DOUGH AT DIFFERENT STORAGE TIMES AND AT (a) A SLOW FREEZING RATE AND A (b) FAST FREEZING RATE
Bars indicate the standard deviation.

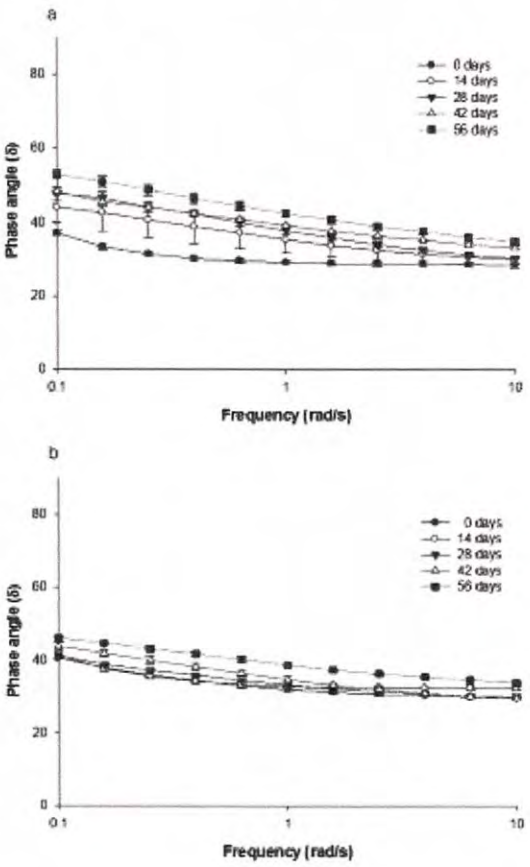


FIG. 7. CHANGES IN THE PHASE ANGLE (δ) IN DOUGH OF THE DIFFERENT STORAGE TIMES AND AT (a) A SLOW FREEZING RATE AND (b) A FAST FREEZING RATE
Bars indicate the standard deviation.

frozen at the slow freezing rate (Fig. 5a) or the fast freezing rate (Fig. 5b). A highly significant gradual decrease ($P < 0.01$) in the G' curves was observed from 0 to 56 days of storage for dough frozen using both freezing processes. After storage, it was observed that the dough frozen at the slow freezing rate (Fig. 5a) exhibited a more significant decrease of G' ($P < 0.05$) than did the dough frozen at the fast freezing rate (Fig. 5b). This result indicates that the dough frozen using the slow freezing rate had greater reduction in elasticity than did that frozen using the fast freezing rate. This reduction could be related to the reduction in IPP and the weakening of the gluten network.

Figure 6 shows the viscous modulus (G'') curves at different frequencies and different storage periods for dough frozen at the slow freezing rate (Fig. 6a) or the fast freezing rate (Fig. 6b). A highly significant gradual increase ($P < 0.01$) in the G'' curves was observed from 0 to 56 days of storage for dough frozen using both freezing processes. After storage, it was observed that the dough frozen at the slow freezing rate (Fig. 6a) had a more significant increase of G'' ($P < 0.05$) than did the dough frozen using the fast freezing rate (Fig. 6b). This result indicates that the dough frozen at the slow freezing rate had a greater increase in the viscous fraction than did the dough frozen at the fast freezing rate. This increase might be related to the increase of SPP and loss of the extensibility strength of the dough.

Figure 7 shows the phase angle (δ) curves at different frequencies and different storage periods for dough frozen at the slow freezing rate (Fig. 7a) or the fast freezing rate (Fig. 7b). A highly significant gradual increase ($P < 0.01$) of the δ curves was observed from 0 to 56 days of storage for

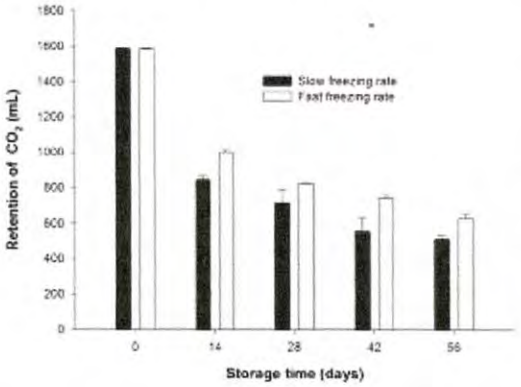


FIG. 8. GAS RETENTION OF THE DOUGH AT DIFFERENT STORAGE TIMES AND FREEZING RATES
Bars indicate the standard deviation.

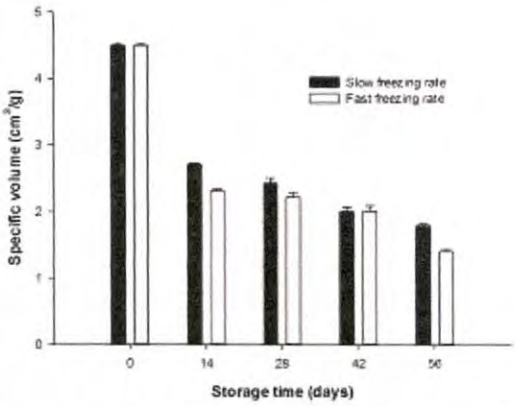


FIG. 9. SPECIFIC VOLUME OF THE BREAD MADE OF DOUGH FROZEN USING THE SLOW OR FAST FREEZING RATES AND STORED FOR DIFFERENT TIMES
Bars indicate the standard deviation.

dough frozen using both freezing processes. During storage, it was observed that the dough frozen at a slow freezing rate (Fig. 7a) increased significantly ($P < 0.05$) by 9.27% in δ, whereas the dough frozen at a fast freezing rate process increased by 7.35% (Fig. 7b). This finding could indicate that the dough frozen at the slow freezing rate had a greater reduction in the elasticity than did the dough frozen using at the fast rate process. This last freezing process increased the viscous module. This increment of δ is related to the weakening of the gluten network and changes in its proteins principally decrement in IPP. Also, an increase in shorter protein chains increases the viscous element. The results of this study are in agreement with those reported by Angioloni *et al.* (2008). These authors found a substantial decrease in the elastic component compared with that of the viscous fraction with the increase in storage time; they attributed this behavior to the reduction in the dough's elasticity with the increase in storage time at subzero temperatures caused by the reduction of gluten cross-linking. Autio and Sinda (1992) attributed the decrement in G' to the loss of gluten polymer cross-linking and finally to a weakening of the gluten network.

Gas Retention

The CO_2 retention was measured to determine the gluten strength during the fermentation of the stored frozen dough. Figure 8 shows a highly significant decrease ($P < 0.01$) of gas retention from 0 to 56 days of storage. After storage, a gradual decrease of gas retention was observed for both slow and fast freezing rates. During storage, the dough frozen using the fast freezing rate process decreased very significantly ($P < 0.01$) by 40.03% in the gas retention, whereas the dough frozen at the slow freezing rate decreased very significantly ($P < 0.01$) by 32.53%. These results suggest that during the fast freezing rate, the polymers of gluten preserve their structure more than that at slow freezing rate. The effect might be due to a decrease in the strength of the gluten network that limited the expansion of the dough or due to degradation in the gluten network causing CO_2 to leak. The capacity to stabilized the bubbles in dough is by two mechanisms: one by gluten-starch matrix (Sroan *et al.* 2009) and the other one by liquid lamellae (Sroan and MacRitchie 2009). This implies that high proportion of IPP promotes major retention of CO_2, and in the fast freezing rate, it might be the first mechanism that governed the bubble stabilization, resulting in a higher retention of CO_2.

Specific Volume

Figure 9 shows the specific volume of bread for dough frozen at either the slow or fast freezing rate after different storage periods. During the storage, the dough frozen using the slow process decreased very significantly ($P < 0.01$) by 60% in specific volume, whereas the dough frozen using the slow freezing rate decreased by 68.44%. After storage, it was observed that the dough frozen using the slow process produced bread with a higher specific volume ($P < 0.01$) than the dough frozen using the rapid process. This result indicated that freezing dough slowly preserved the overall quality of the bread significantly better than did freezing dough rapidly. This implies that an increase in the hydrolysis of glutenins from slow freezing rate promotes an increase in viscosity of the dough and could benefit loaf volume.

TABLE 3. EFFECT OF FREEZING RATE AND STORAGE TIME ON TEXTURAL PROPERTIES OF BREAD (TPA TEST)

	Dough frozen storage time (days)									
	Slow freezing rate					Fast freezing rate				
Characteristics	0	14	28	42	56	0	14	28	42	56
Hardness (N)										
2 h	1.09^{a}	2.40^{a}	16.06^{c}	28.57^{a}	57.38^{a}	1.09^{a}	3.15^{a}	18.02^{c}	30.71^{a}	72.91^{a}
24 h	1.70^{a}	4.34^{a}	19.79^{c}	33.15^{a}	71.44^{a}	1.70^{a}	6.42^{a}	20.31^{c}	39.76^{a}	75.31^{a}
48 h	2.27^{a}	11.89^{b}	21.79^{c}	46.10^{a}	92.71^{a}	2.27^{a}	14.61^{a}	23.40^{c}	50.08^{a}	115.82^{a}
Springiness										
2 h	0.99^{a}	0.96^{b}	0.88^{c}	0.73^{d}	0.54^{e}	0.99^{a}	0.95^{a}	0.86^{c}	0.71^{d}	0.51^{e}
24 h	0.97^{a}	0.95^{b}	0.85^{c}	0.70^{d}	0.50^{e}	0.97^{a}	0.93^{a}	0.84^{c}	0.67^{d}	0.48^{e}
48 h	0.97^{a}	0.90^{b}	0.83^{c}	0.60^{d}	0.44^{e}	0.97^{a}	0.85^{a}	0.83^{c}	0.57^{d}	0.37^{e}

Within a row and for each freezing rate, means with the same letter are not statistically different at $P = 0.05$ ($P > 0.05$).

We found that the freezing process itself supposes a low volume of bread; however, during storage of dough, the effect increases. Similar results are reported by Giannou and Tzia (2007, 2008), and they concluded that the most important changes in the gluten network structure and yeast viability occur during the first steps of freezing. It is known that the reduction in the bread volume is due not only to the poor production of gas by the yeast cells but also to the weakening of the gluten network of the dough and the reduction in its capacity to retain gas bubbles. Despite our results indicates a major depolymerization of gluten proteins to slow freezing rate, an increase of chains of low size and an increase in the viscous phase of dough, a higher volume of bread was obtained using this treatment. This seems that, in this case, the proteins with low size intervene in the second mechanism lamellae to stabilization of bubbles during baking and benefit loaf volume.

Bread Texture

The hardness and springiness parameters of bread texture indicate its shelf life. Hardness is the force required to compress between the molar teeth. An increase in the hardness shows a low quality and aging of the bread. Table 3 shows hardness values of bread stored at 2, 24 and 48 h made from frozen dough stored at different times. There was a significant gradual increase ($P < 0.01$) in the bread hardness after 14 days of dough storage. At each storage time, it was observed that the dough frozen at the fast freezing rate had a highly significant increased of hardness ($P < 0.01$) compared to the dough frozen at the slow freezing rate. The springiness parameters of bread texture indicates the degree and quickness of recovery after compressing force is removed, values close to 1 means quickly returns to size and shape; values close to 0 means stays compressed. A decrease in the springiness also indicates a low quality and the aging of the bread. The springiness values are shown in Table 3. There was a significant gradual decrease ($P < 0.01$) in the springiness of bread after 14 days of dough storage. At each storage period, it was observed that the dough frozen at the fast freezing rate had a highly significant decrease in springiness ($P < 0.01$) compared to the dough frozen at the slow freezing rate. This result indicated that the dough frozen at the slow freezing rate preserved the overall quality of the bread significantly better than did the dough frozen at the fast freezing rate. Hardness of bread values is in agreement with Steffolani *et al.* (2011), who found that the hardness of bread crumbs increased with frozen dough's storage time. Yi and Kerr (2009) reported that increasing the freezing temperature and the time of frozen storage both significantly increased the hardness of the bread crumbs. This finding also indicates that the best bread was obtained when the dough was frozen at the slow freezing rate and stored for 14 days and 2 h.

CONCLUSIONS

The effect of the freezing rate and the storage time on the properties of frozen dough and bread were studied. The storage time and the freezing rate significantly affected the properties of both the frozen dough and the bread. The storage time and the rate of freezing have a significant effect on gluten proteins. The polymer proteins with high molecular weight had a significant depolymerization during the storage time. Fractions from depolymerization became soluble and eluted in the gliadins HPLC-SEC regions due to the smaller size of the molecules. The increase in the solubility of proteins also modifies the properties of the dough; it became more viscous and lost tensile strength. However, increases in the viscosity benefited loaf volume and texture. The freezing rate also affected the protein properties of the dough; the protein solubility throughout storage was higher with the slow freezing process than the fast freezing process. The fast freezing rate decreased the loaf volume by 68.44%, whereas the slow freezing rate by 60%, indicating that it is better to freeze the dough slowly. The bread volume

decreased during the dough storage time, except between 14 and 28 days when bread volume remained comparable; therefore, it is recommended to store dough up to 28 days. After this period, the volume decrease was more dramatic. The texture was greatly affected by rapid dough freezing because bread was harder than when the dough was frozen slowly, so it is recommended that slow freezing be used to preserve the quality characteristics of the bread. The dough for bread should be frozen at the slow freezing rate and stored for no longer than 28 days and the bread should be consumed immediately after processing to retain their best attributes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study is part of the Grant No. 154090 from CONACyT "Study of Water Re-distribution in Gluten from Frozen Dough, and its Effect on Protein and Viscoelasticity Changes." We also thank Q.B. Cesar Otero for his technical assistance.

REFERENCES

AACC. 2000. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, 10th Ed., AACC, Saint Paul, MN. Methods (02–52, 08-03, 10-09, 26-10, 29–95, 38-11, 44-15, 44-40, 46-13, 54-21, 54-30, 54-30A, 56-61A, 74-09).

AIBARA, S., OGAWA, N. and HIROSE, M. 2005. Microstructures of bread dough and the effects of shortening on frozen dough. Biosci. Biotechnol. Biochem. *69*, 397–402.

ANGIOLONI, A., BALESTRA, F., PINNAVAIA, G.G. and DALLA, R.M. 2008. Small and large deformation tests for the evaluation of frozen dough viscoelastic behavior. J. Food Eng. *87*, 527–531.

AUTIO, K. and SINDA, E. 1992. Frozen doughs: Rheological changes and yeast viability. Cereal Chem. *69*, 409–413.

BAIER-SCHENK, A., HANDSCHIN, S. and CONDE-PETIT, B. 2005. Ice in prefermented frozen bread dough – an investigation based on calorimetry and microscopy. Cereal Chem. *82*, 251–255.

BEAN, S., LYNE, R., TILLEY, K., CHUNG, O. and LOOKHART, G. 1998. A rapid method for quantification of insoluble polymeric proteins in flour. Cereal Chem. *75*, 374–379.

BERGLUND, P.T., SHELTON, D.R. and FREEMAN, T.P. 1991. Frozen bread dough ultrastructure as affected by duration of frozen storage and freeze-thaw cycles. Cereal Chem. *68*, 105–107.

CODÓN, A.C., RINCÓN, A.M., MORENO-MATEOS, M.A., DELGADO-JARANA, J., REY, M., LIMÓN, C., ROSADO, I.V., CUBERO, B., PEÑATE, C., CASTREJÓN, F., *et al.* 2003. New *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast displaying enhanced resistance to freezing. J. Agric. Food Chem. *51*, 483–491.

ESSELINK, E.E.J., VAN AALST, H., MALIEPAARD, M. and VAN DUYNHOVEN, J.P.M. 2003. Long-term storage effect in frozen dough by spectroscopy and microscopy. Cereal Chem. *80*, 396–403.

GIANNOU, V. and TZIA, C. 2007. Frozen dough bread: Quality and textural behavior during prolonged store – prediction of final product characteristics. J. Food Eng. *79*, 929–934.

GIANNOU, V. and TZIA, C. 2008. Cryoprotective role of exogenous trehalose in frozen dough products. Food Bioprocess Technol. *1*, 276–284.

HAVET, M., MANKAI, M. and LE BAIL, A. 2000. Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough. J. Food Eng. *45*, 139–145.

HSU, K.H., HOSENEY, R.C. and SEIB, P.A. 1979. Frozen dough. I. Factors affecting stability of yeasted doughs. Cereal Chem. *56*, 419–424.

INOUE, Y., SAPIRSTEIN, H., TAKAYANAGI, S. and BUSHUK, W. 1994. Studies on frozen doughs. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. Cereal Chem. *71*, 118–121.

JIANG, B., KONTOGIORGOS, V., KASAPIS, S. and DOUGLAS, G.H. 2008. Rheological investigation and molecular architecture of highly hydrated gluten networks at subzero temperatures. J. Food Eng. *89*, 42–48.

KIEFFER, R., WIESER, H., HENDERSON, M.H. and GRAVELAND, A. 1998. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. J. Cereal Sci. *27*, 53–60.

KONTOGIORGOS, V., DOUGLAS, G.H. and KASAPIS, S. 2008. Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical properties of frozen flour-water mixtures. Food Hydrocolloids *22*, 1135–1147.

LOOKHART, G.L., BEAN, S.R. and BIETZ, J.A. 2003. HPLC of gluten monomeric proteins. In *Wheat Gluten Protein Analysis* (P.R. Shewry and G.L. Lookhart, eds.) pp. 64–65, AACC International, St. Paul, MN.

MAGAÑA-BARAJAS, E., RAMÍREZ-WONG, B., PLATT-LUCERO, L., LOPEZ-AHUMADA, G., TORRES, P. and SÁNCHEZ-MACHADO, D. 2009. Caracterización viscoelástica de masas de variedades de trigos suaves. Tecnología, Ciencia, Educación *24*, 12–22.

MEZIANI, S., JASNIEWSKI, J., RIBOTTA, P., ARAB-TEHRANY, E., MULLER, J.M., GHOUL, M. and DESOBRY, S. 2012. Influence of yeast and frozen storage on rheological, structural and microbiological quality of frozen sweet dough. J. Food Eng. *109*, 538–544.

NICOLAS, Y., SMIT, R.J.M., VAN AALST, H., ESSELINK, F.J., WEEGELS, P.L. and AGTEROF, G.M. 2003. Effect of storage time and temperature on rheological and microstructural properties of gluten. Cereal Chem. *80*, 371–377.

ODA, Y., UNO, K. and OHTA, S. 1986. Selection of yeasts for breadmaking by the frozen-dough method. Appl. Environ. Microbiol. *52*, 941–943.

OLIVERA, S.D. 2011. The effect of basic raw material in the process of wheat dough freezing. Food Feed Res. *38*, 9–19.

PHIMOLSIRIPOL, Y. 2009. Shelf life determination of frozen bread dough stored under fluctuating temperature conditions. Nat. Sci. *43*, 187–197.

RIBOTTA, P.D., LEÓN, A.E. and AÑÓN, M.C. 2001. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality. J. Agric. Food Chem. *49*, 913–918.

ROSELL, C.M. and GÓMEZ, M. 2007. Freezing in breadmaking performance: Frozen dough and part-baked bread. Food Rev. Int. *23*, 303–319.

SEGUCHI, M., NIKAIDOO, S. and MORIMOTO, N. 2003. Centrifuged liquid and breadmaking properties of frozen and thawed bread dough. Cereal Chem. *80*, 264–268.

SELOMULYO, O.V. and ZHOU, W. 2007. Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers. J. Cereal Sci. *45*, 1–17.

SILVAS-GARCÍA, M.I., RAMÍREZ-WONG, B., TORRES-CHAVEZ, P.I., MAGAÑA-BARAJAS, E., SALAZAR-GARCÍA, M.G. and LÓPEZ-AHUMADA, G.A. 2011. Effect of trehalose on fermentation, proteins and volume of French-type bread prepared with frozen dough. Cereal Foods World *56*, A63.

SINGH, R.P. and HELDMAN, D.R. 2001. *Introduction to Food Engineering*, 3rd Ed., pp. 409–410, Academic Press, San Diego, CA. Food Science and Technology International Series. Chapter 7.

SROAN, B.S. and MACRITCHIE, F. 2009. Mechanism of gas cell stabilization in bread making. II. The secondary liquid lamellae. J. Cereal Sci. *49*, 41–46.

SROAN, B.S., BEAN, S.R. and MACRITCHIE, F. 2009. Mechanism of gas cell stabilization in bread making. I. The primary gluten-starch matrix. J. Cereal Sci. *49*, 32–40.

STEFFOLANI, M.E., RIBOTTA, P.D., PEREZ, G.T., PUPPO, M.C. and LEÓN, A.E. 2011. Use of enzymes to minimize dough freezing damage. Food Bioprocess Technol. *5*, 2242–2255.

VARRIANO-MARSTON, E., HSU, H. and MAHDI, J. 1980. Rheological and structural changes in frozen dough. Baker's Dig. *54*, 32–34.

WIESER, H. and KIEFFER, R. 2001. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a microscale. J. Cereal Sci. *34*, 19–27.

YI, J. and KERR, W. 2009. Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties. Food Sci. Technol. *42*, 1474–1483.

ZHANG, Y., SIMSEK, S., CAMPANELLA, O.H., OHM, J.B., CHANG, H., REUHS, B.L. and MERGOUM, M. 2011. Rheological changes in refrigerated dough during storage in relation to proteins. J. Food Process Eng. *34*, 639–656.

CAPÍTULO 7

Etapa 3: Cambios en el Almidón de Masa Congelada

En esta etapa se presentan los resultados de los cambios en el almidón de masa congelada. Se evaluó el efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre el daño al almidón, las propiedades de viscosidad de la pasta y gelatinización y la morfología de la masa. A continuación se describe brevemente el planteamiento y realización de dicha investigación.

Hipótesis

La velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento modifican el almidón de masas congeladas.

Objetivo

Evaluar el efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento en algunas propiedades del almidón y la masa de trigo.

Metodología

Liofilización de la masa. Cada 14 días se tomaron muestras de masa congelada a las dos diferentes velocidades, y fueron secadas en un liofilizador (marca Labconco, Freeze dry system, E.U.A), para realizarles las diferentes determinaciones. Los muestreos fueron a los días 0, 14, 28, 42, y 56. La liofilización se llevó a cabo de la siguiente forma: las muestras de masa congelada se colocaron en la cámara de sublimación a -20°C, se aplicó vacío y se dejaron secar durante 48 h.

Almidón dañado. A las muestras de masa liofilizada, se les determinó el contenido de almidón dañado utilizando un kit enzimático comercial (Megazyme, 2011, K-SDAM 07/11). Una muestra de 100 mg de masa liofilizada se agitó 5 s con 1 mL de α-amilasa preequilibrada a 40°C y se incubó durante 10 min a 40°C, se detuvo la reacción enzimática con 8 mL ácido

sulfúrico diluido al 2%, se centrifugó a 1000 x g durante 5 min en una centrifuga (Marca THERMO SCIENTIFIC HERAEUS, modelo BIOFUGE PRIMO R Centrifuge, E.U.A.). Se tomaron alícuotas de 0.1 mL por duplicado. Se adicionó 0.1 mL de amiloglucosidasa y se agitó para después incubar a 40°C por 10 min, se añadió a las muestras, junto con el blanco de reactivos y la solución estándar 4 mL de GOPOD. De nuevo se incubaron a 40°C durante 20 min. Luego de este tiempo las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Marca, Varian Bio UV/ Visible, modelo Cary 50 Conc – 10069600, Australia) a una longitud de onda de 510 nm. El contenido de almidón dañado se reportó como el porcentaje de 4 repeticiones.

Viscosidad de la pasta de almidón. A las muestras liofilizadas de masa congelada, se les hizo un análisis de viscosidad en un viscoamilógrafo rápido (RVA). El análisis se llevó a cabo en un RVA (marca Newport Scientific, modelo 4, Sydney, Australia), siguiendo la técnica descrita en el manual de operación del equipo. Se preparó una suspensión de la muestra de masa liofilizada, en donde se agregaron 3 g de muestra de masa en 25 mL de agua. La suspensión se calentó a 50°C durante 1 min, posteriormente se incrementó la temperatura a 95°C en 8 min y se mantuvo a esa temperatura durante 5 min. Por último se disminuyó la temperatura a 50°C en un tiempo de 7.5 min, manteniéndose a esta temperatura durante 2 min. La velocidad de rotación inicial fue de 960 rpm durante 10 segundos y el resto de la prueba se realizó a una velocidad de 160 rpm. Se reportó la viscosidad máxima y la viscosidad de enfriamiento "setback" de las curvas obtenidas.

Morfología de la masa. A las muestras de masa, se les llevó a cabo un Barrido con un Microscopio Electrónico (Marca, JEOL 5410LV) operado a 20 kV, con magnificaciones de 500, 1000 y 2000 X. Las muestras fueron recubiertas con oro para su observación y obtención de las microfotografías y de ahí se observó la morfología de los gránulos de almidón.

Resultados

El almidón dañado (DS, por sus siglas en inglés) tuvo un incremento significativo ($p<0.05$) durante el tiempo de almacenamiento, y en la masa preparada en congelación lenta fue mayor que la masa congelada a velocidad rápida (Figura 1, ver pág. 97). Durante el tiempo de almacenamiento de la masa, los valores de viscosidad de pico de la pasta presentaron una

disminución gradual significativa ($p<0.05$) de 0 a 56 días (Tabla 1, ver pág. 97), durante este período para la velocidad de congelación lenta, los valores de viscosidad de pico fueron mayores que para la velocidad de congelación rápida. La entalpía durante el tiempo de almacenamiento tuvo un aumento gradual significativo ($p<0.05$) y en velocidad de congelación lenta fue inferior a la de velocidad de congelación rápida (Tabla 2, ver pág. 98). Los gránulos de almidón fueron separados de la matriz de gluten durante el tiempo de almacenamiento mayormente para la masa congelada a una velocidad de congelación rápida que para la velocidad de congelación lenta (Figura 3, ver pág. 96). La velocidad y el tiempo de almacenamiento congelado afectaron el DS y la morfología de la masa, lo que modifica la viscosidad pico de la pasta y la entalpía de masas congeladas, relacionado con cambios en la cristalinidad del almidón. La migración de agua durante la congelación deja espacios entre las moléculas de proteína y almidón, en donde se llevan a cabo interacciones intramoleculares e intermoleculares, que da como resultado la modificación de las proteínas superficiales del gránulo de almidón, además de su estructura interna, cambios en la entalpía de fusión indicaron cambios en la hélice de amilopectina, además los cambios en las propiedades de la pasta, indicaron una lixiviación de las cadenas de amilosa y un entrecruzamiento entre ellas. Estos cambios en las propiedades de la masa, suscitan cambios en la miga del pan, ocasionando el aumento de la firmeza y la disminución del "sringinness" que se observó en la etapa 2. Esto se discute más a detalle en el artículo que a continuación se presenta.

Artículo científico: Effect of freezing rate and storage on rheological, thermal and structural properties of wheat dough

El presente manuscrito es un artículo que fue enviado, y el cual se encuentra en el formato de la revista Starch (Editorial Wiley, by John Wiley & Sons, Inc.).

RESEARCH ARTICLE

Effect of freezing rate and storage on rheological, thermal and structural properties of wheat dough

María Irene. Silvas-García[1], Benjamín Ramírez-Wong[1, 6], Patricia Isabel Torres-Chávez[1], Elizabeth Carvajal-Millán[2], Jesús Manuel Barrón-Hoyos[1], Luis Arturo Bello-Pérez[3], Mario Enrique Rodríguez-García[4], Francisco Vazquez-Lara[2], and Armando Quintero-Ramos[5]

[1]Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

[2]Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.

[3]Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN. Yautepec, Morelos, México.

[4]Centro de Física Aplicada y Tecnología Aplicada de la UNAM. Juriquilla, Querétaro, México

[5]Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua, México.

[6]Corresponding autor: Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n. Col. Centro. Hermosillo, Sonora, México. C. P. 83000. PHONE-FAX: 52-662-259-22-07/08/09

E-MAIL: bramirez@guaymas.uson.mx

Keywords: Frozen dough/ Freezing rate/ Storage time/Starch properties

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of freezing rate and storage time on some wheat dough properties. Wheat flour dough was frozen at slow speed (-0.14 °C.min^{-1}) and fast (-1.75 °C.min^{-1}) and stored at -20°C for 56 days. Every 14 days, dough samples from both freezing processes were freeze-dried. Analyses in dried dough were starch damaged, paste properties in a rapid viscoamylograph (RVA), thermal properties by differential scanning calorimeter (DSC), and microstructure was observed by scanning electron microscopy (SEM). Damaged starch (DS) had a significant increase ($p<0.05$) during storage time, in dough prepared at slow freezing was higher than the dough at fast freezing rate. The peak viscosity values during the storage time had a significant gradual decrease ($p<0.05$) from 0 to 56 days, during this period of slow freezing rate, the peak viscosity values were higher than fast freezing rate. The enthalpy during the storage time had a significant gradual increase ($p<0.05$) and at slow freezing rate was lower than fast freezing rate. Starch granules were separated from the gluten matrix during the storage time greater for the frozen dough at a fast freezing rate than slow freezing rate. The frozen rate and storage time affected the DS and the morphology of dough, which turns influence the peak viscosity of the paste and enthalpy of frozen dough.

1 Introduction

Freezing of dough is a conservation process that presents many problems to obtain products with good quality [1]. Freezing and storage of dough at subzero temperatures causes a decrease in the number of viable yeast cells, low gas production, and weak gluten network. This is reflected in the decrease of the final volume of bread [2-5]. Several researchers have studied the effects of storage time or temperature on yeast viability, gluten structure [6-8] and starch [9-11]. However, a few of authors focuses on the study of starch in the whole dough, specially how the freezing rate and sometimes prolonged frozen storage affects to starch granules integrity in frozen dough and its effect on bread baking. These factors still have not been fully investigated [12]. The main component in wheat dough is starch. In this sense, differences in starch obtained from breads baked from frozen dough were reported [13]. The water redistribution in frozen dough can produce changes in amylose and amylopectin structure [10]. There are positive correlations among amylose-amylopectin ratio, proof time, and loaf volume; in contrast there is a negative correlation between amylose-amylopectin ratios with frozen storage time [14]. The gelatinization properties of isolated starch from flour and frozen dough were studied using differential scanning calorimetry (DSC) [10, 15]. The increase in the enthalpy is proportional to the increase in the degree of crystallinity [15]. Its increase is because a delay in the diffusion of water into the starch granules or to increased growth of ice crystals in the frozen doughs [16]. Ice recrystallization during storage of dough causes starch damage due to water displacement produces changes in amylose [10]. Starch damage allows intracellular release of amylose, which promotes their chains interaction to form a network of amylose leading to increase on hardness of the bread crumb [17, 13].

A relationship may exist between certain starch properties (starch damaged, binding capacity and intrinsic viscosity) and dough rheological properties [9]. There are changes in both starch properties and bread baking. These modifications are slightly reflected during the gelatinization process of starch, and there is an important influence on the rate of retrogradation [10]. The participation of starch in frozen dough quality seems to be important. Therefore, freezing rates and type and form of ice crystals influences may play an important role, this is an area that needs additional research. Hence, the aim of this study was to evaluate the effect of freezing rate and storage time of changes in rheological thermal and structural properties of starch dough.

2 Materials and methods

2.1 Dough preparation, freezing process and storage

Frozen dough samples were prepared according with the methodology of Silvas-García et al. [5], briefly described as following. The bread formula used comprised flour (100%, baker's percentage), compress yeast (3%), shortening (5%), salt (1.5%). The ingredients were mixed, hand-molded, pre-fermented and packaged. The dough samples were frozen at -20°C using two different freezing rates. One set of dough sample was frozen at -1.75°C.min^{-1} (fast freezing rate) in an ultra-low temperature freezer (ULT21866A, Thermo Scientific, Waltham, MA), and the other set of dough sample was frozen at -0.14°C.min^{-1} (Slow freezing rate) in a conventional freezer (GLFC1526FW1, Frigidaire, Mississauga, Canada). Both frozen dough sample sets were stored at the same temperature of -20°C in a conventional freezer (GLFC1526FW1, Frigidaire, Mississauga, Canada) for 0, 14, 28, 42 or 56 days.

2.2 Dough freeze-dry

Every 14 days, frozen samples were dried in a lyophilizer (Labconco mark, Freeze dry system, USA), for the different determinations. Samplings were on days 0, 14, 28, 42, and 56. The lyophilization was performed as follows: samples of frozen dough were placed in the chamber of sublimation at -20 ° C, vacuum was applied and allowed to dry for 48 h.

2.3 Starch damaged

The damaged starch content was determined from freeze-dried dough, using a commercial enzymatic kit (Megazyme, 2011, K-SDAM 07/11). A sample of 100 mg was stirred in a Vortex (Vortex Genie 2T, Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) 5 s with 1 mL of α-amylase pre-equilibrated at 40°C and incubated for 10 min at 40°C, the enzymatic reaction was stopped with dilute sulfuric acid 8 mL 2% centrifuged at 1000 × g for 5 min in a centrifuge (Heraeus Brand THERMO SCIENTIFIC, model Biofuge Primo R centrifuge, USA). Next, It was taken aliquots of 0.1 mL for duplicate and was added them 0.1 mL of amyloglucosidase and stirred then incubated at 40 ° C for 10 min. It was added to samples of 4 mL goPod, incubated again at 40 °C for 20 min. After this time, the samples were read in a spectrophotometer (Trade Mark, Varian Bio UV / Visible, Cary model 50 Conc - 10,069,600, Australia) at a wavelength of 510 nm. The damaged starch content was reported as the percentage of 4 replicates. The same process was carried out to blank reagent and standard.

2.4 Pasting properties

Pasting and gelatinization properties of dough freezing dried were determined by an analysis of viscosity on a fast viscoamylograph (RVA). The analysis was carried out in an RVA (Newport Scientific brand, model 4, Sydney, Australia), following the technique described in the operation manual of the equipment. Slurry of sample of lyophilized dough was added 3 g were sample of dough in 25 mL of water. The suspension was heated at 50°C for 1 min, then increased the temperature to 95°C in 8 minutes and held at that temperature for 5 min. Finally, the temperature was decreased to 50°C in a time of 7.5 min and held at this temperature for 2 min. Initial rotation speed was 960 rpm for 10 seconds and the rest of the test was conducted at a speed of 160 rpm. Maximum (peak) viscosity of hot paste, minimum viscosity after holding at 95°C, and cooling maximum viscosity were detected. Difference between maximum (peak) and minimum viscosity after holding at 95°C, between cooling maximum viscosity and maximum viscosity of hot paste, and between cooling maximum viscosity and minimum viscosity after holding at 95°C was defined as breakdown, setback, and total setback, respectively. The result was shown as the mean of duplicate.

2.5 Gelatinization properties

A differential scanning calorimeter (DSC Q200, TA Instruments, New Castle, DE) was used to measure the gelatinization of starch frozen dough [18]. The equipment was calibrated with Indium and an empty double pan was used as a reference. Samples of dough (2 mg of lyophilized dough), were taking for each freezing rate and storage time and was added 10 µL of water and sealed in tared aluminum DSC pans. A sealed, empty pan was

136 used as a reference. Each sample was heated to 100°C at a rate of 5°C/min, with the
137 endothermic being presented as a peak. The enthalpy change (ΔH) of the phase transition
138 was recorded. Transition temperatures and enthalpies were obtained with the TA Universal
139 Analysis software. At least, two determinations per dough lot were made and results were
140 expressed as mean S.D. Onset temperature (To) and gelatinization temperature (Tg), final
141 temperature (Tf) as well as the enthalpy of starch gelatinization (ΔHg) (expressed as mJ/mg
142 of sample) of starch from frozen dough were determined.
143

144 **2.6 Morphological characteristics of starch granules**

145 A scanning electron microscope (Brand, JEOL 5410LV) was used to observe the granule
146 starch structure. The microscope was operated at 20 kV, with magnifications of 1000 and
147 2000 X. The samples were coated with gold for observation and obtaining
148 microphotographs and then observed morphology of the starch granules.

149 **2.7 Experimental design and statistical analysis**

150 A 2×5 factorial experimental design was used, in which the factors were freezing rate
151 (rapid, -1.75°C.min^{-1}, or slow, -0.14°C.min^{-1}) and the storage period (0, 14, 28, 42, or 56
152 days). An analysis of variance (ANOVA) was conducted on the data gathered from each
153 evaluation, using a 95% confidence level. The mean values were compared using Duncan's
154 test. The statistical analysis was performed using statistical analysis with SAS software
155 2002, (SAS Institute Inc., Cary, NC).

156

157

158 **3 Results and discussion**

159 **3.1 Damaged starch (DS)**

160

161 Figure 1 shows the effect of freezing rate and storage time on DS. Regarding to the rate of
162 freezing, the DS content increased with the storage time. Furthermore, at every storage
163 time, DS was higher for slow freezing rate than fast freezing rate. During the storage time
164 at slow freezing rate and after 14 days, DS content showed a significant increase ($p <$
165 0.001) of 1 % until 56 days. The DS content was significantly higher ($p < 0.001$) at slow
166 freezing rate than fast freezing rate to each storage time, except for the zero-day storage
167 time. This increase is very important because an increase of 1 % DS increases about 4 times
168 the water absorption capacity compared to the undamaged starch [19]. The DS can be
169 attributed to the grinding, but it is also affected by high pressure, the shear stress and the
170 presence of endogenous enzymes such as alpha amylase. In the case of frozen dough, these
171 are subjected to high osmotic pressures, which could result in damage to the starch granules
172 surface during storage. DS has an adverse effect on peak viscosity due to restriction of the
173 swelling and on the gelation of the paste due to decreasing of the final viscosity [9], both
174 may modify the characteristics of the bread.

175 DS affects the properties of dough and bread. Unlike native starch, DS present
176 higher water absorption, solubility and susceptibility to enzymatic hydrolysis. In fresh
177 dough, the DS has the advantage to increase the fermentation velocity, because an
178 excessive damage on the granule starch surface facilitate the hydrolysis by the enzymes due
179 to that can penetrate easily and hydrolyze the starch chains [20]. However, for frozen dough
180 is not desired active fermentation during storage. When the intermolecular bonds are

181 broken causing damage to the starch granules are more susceptible to enzymatic and
182 structural changes in turn alter the properties of the dough. The DS content in frozen dough
183 is related to the DS content in the wheat flour. Occasionally, size of damaged starch
184 granules, does not decrease with increasing degree of damage to starch granules because
185 only the surface is damaged and appears rougher and more porous than the intact native
186 starch granule [21].
187
188 **3.2 Pasting properties**
189
190 Table 1 shows the effect of storage time and freezing rate on pasting and gelatinization
191 properties of frozen dough. The peak viscosity values during the storage time had a
192 significant gradual decrease ($p<0.05$) from 0 to 56 days (Fig. 2) . The swelling of starch
193 granules was restricted like to cross-linking starch. This pattern can be related to the DS
194 due to that some starch chains could be lixiviated and join starch granules, producing
195 interactions like to cross-linking. However, was observed that during this period of slow
196 freezing rate, the peak viscosity values were higher than fast freezing rate. This pattern is
197 due to there is a positive correlation between damaged starch and water binding capacity
198 [9].
199 The breakdown values during the storage time had a significant gradual decrease ($p<0.05$)
200 from 0 to 56 days. Low breakdown is related to the restricted starch granule swelling
201 above-mentioned. It was observed that during this period of storage at slow freezing rate,
202 the breakdown values were higher than fast freezing rate. This patern is due the coss-links
203 of lineal chains modify the internal starch-protein interaction equilibrium within granule,
204 causing higher breakdown values [22].

205 The setback values during the storage time had a significant gradual increase ($p<0.05$) from
206 0 to 56 days; This pattern can be related to interactions like to cross-linking because
207 setback is an indicative of the stability of the paste and the tendency to reorganization
208 during the cooling step [22, 23]. Values At slow freezing rate setback values were higher
209 than fast freezing rate and increased with the storage time. Increase in setback value with
210 storage time is due to reorganization of starch chains. Slow freezing can give more
211 opportunity to the starch chains (lineal chains) to reorganization in a network with increase
212 in the setback value [22]. Freezing rate of frozen dough can influence the texture of bread
213 due to that after baking retrogradation of amylopectin was present and increased the
214 firmness and rapid aging of the bread [24].
215 The final viscosity values during the storage time had a significant gradual decrease
216 ($p<0.05$) from 0 to 56 days. The decrease in the viscosity is clear evidence that the
217 structural changes in starch suffered their granules. It was observed that during this period
218 at slow freezing rate, the final viscosity values were higher than fast freezing rate. This
219 could indicate that decreased the number of intact starch granules and lost their ability to
220 swell water. This is consistent with our findings of increased damage to the starch the
221 viscosity decrease.
222 The pasting temperature values during the storage time had a significant gradual decrease
223 ($p<0.05$) from 0 to 56 days. It was observed that during this period of slow freezing rate,
224 the pasting temperature values were lower than fast freezing rate. This pattern is associated
225 with some damage to starch granules and the water from the continuous phase penetrates
226 easily and disorganized the granules to lower temperature.
227
228

229 **3.3 Gelatinization properties**

230

231 Table 2 shows the effect of storage time and freezing rate on the onset temperature, the
232 peak temperature and enthalpy of starch of frozen dough. The onset temperature values
233 during the storage time had a significant gradual increase ($p<0.05$) from 0 to 56 days. It
234 was observed that during this period at slow freezing rate, the onset temperature values
235 were higher than fast freezing rate. The peak temperature values during the storage time
236 had a significant gradual increase ($p<0.05$) from 0 to 56 days. It was observed that during
237 this period of storage at fast freezing rate, the peak temperature values were higher than
238 slow freezing rate. The final temperature values during the storage time had a significant
239 gradual decrease ($p<0.05$) from 0 to 56 days. It was observed that during this period of
240 storage at slow freezing rate, the final temperature values were higher than fast freezing
241 rate. The enthalpy values during the storage time had a significant gradual increase
242 ($p<0.05$) from 0 to 56 days. It was observed that during this period at slow freezing rate, the
243 enthalpy values were lower than fast freezing rate. Results might be indicative an increment
244 in the degree of crystallinity in the starch structure and low diffusion of water. These
245 ordered structucture might be conducing to major susceptibility in starch retrogadation.
246 Similar behavior was reported by Lu and Grant [9], they found an increase in the enthalpy
247 of gelatinization of starch isolated from frozen dough.

248

249 **3.4 Morphology of dough**

250

251 SEM has been used to reveal the characteristics of the structure of food matrix. Figure 2 (a,
252 b and c) presents photomicrographs at a magnification of 1,000 x of the effect of slow

253 freezing rate on the microstructure of the dough at a) 0 days, b) 28 days and c) 56 days of
254 storage. It was observed that the starch granules (S) were separated from the gluten matrix
255 (G) at the longest storage times, the spacing of the granules was more evident at 56 days of
256 storage. In Fig. 2 (d, e and f) are photomicrographs at a magnification of 1,000 x of the
257 effect of fast freezing rate on the microstructure of the dough at d) 0 days, e) and f 28 days
258 f) 56 days of storage. It was observed that the starch granules (S) were separated from the
259 gluten matrix (G) during the storage time, the spacing of the granules was more evident at
260 56 days of storage, however, when comparing the micrographs from both freezing rate with
261 corresponding storage times, it is shown that the separation of the granules is higher for the
262 frozen dough at a fast freezing rate. As a result, the maximum separation occurred in the
263 frozen dough during the fast freezing stored for 56 days. These suggest a disruption of the
264 association of gluten with starch.
265
266 In fresh dough, it has been observed that the starch granules are distributed and
267 suspended within the matrix of gluten [25]. In contrast, in the freezing and storage of
268 dough, syneresis occurs due to the migration of water towards the outside of the gluten -
269 starch matrix [26], and a change in the conformation of the gluten proteins, which causes
270 loosening of the starch granules that were scattered in the system. Separation of the
271 granules increased during the storage time of the dough, indicating that freezing causes a
272 change in the microstructure by the redistribution of water.
273
274 Kontogiorgos et al. [25], discussed that the interactions of water with starch gluten
275 matrix weaken and allow water diffusion. Furthermore, the origin of irregular inclusions
276 separate starch is attributed to the spaces occupied by the ice separating both proteins and

277 starch granules, changing its conformation. Our results agree with those reported by Ribotta
278 [27], who also observed a separation of the starch granules embedded in the gluten
279 network, which increased with storage time and cracked surface of the granules. The
280 increase in the crystallinity in starch molecules might be in indicative of loss of water
281 binding capacity and the separation is attributed to the uneven distribution of polar and no
282 polar residues of proteins as well as clusters of crystals. The hydrophilic part of the crystals
283 in combination with hydrophilic residues causes a repulsion of native starch granules,
284 causing separation.
285
286 **4 Conclusions**
287
288 Freezing rate and storage time affected the rheological, thermal and structural starch
289 frozen dough properties. However, the storage time was the factor that most affect these
290 properties followed by freezing rate. The prolonged storage increases starch damage;
291 decrease the maximum viscosity of a paste of frozen dough. An increase the setback is
292 proportional to an increase in the susceptibility to retrogradation of starch. Changes in the
293 enthalpy of gelatinization indicated a change in the double helices of amylopectin chains.
294 All that might explain the increase in bread hardness after the frozen storage of dough.
295 Starch granules are separated from the gluten matrix during the storage time which might
296 be evidence of changes in proteins and redistribution of water.
297
298
299
300

Acknowledgements

This study is part of the Grant No. 154090 from CONACyT "Study of Water Re-distribution in Gluten from Frozen Dough, and its Effect on Protein and Viscoelasticity Changes." We also thank I.Q. David Neder for his technical assistance. The authors have declared no conflict of interest.

5 References

[1] Asghar, A., Anjum, F. M., Allen, J. C., Utilization of dairy byoproduct proteins, surfactants, and enzymes in frozen dough. *Crit. Rev. Food. Sci.* 2011, *51*, 374-382.

[2] Varriano-Marston, E., Hsu, H., Mahdi, J. Rheological and structural changes in frozen dough.Baker's Dig. 1980, *54*, 32-34.

[3] Hosomi, K., Nishio, K., Matsumoto, H., Studies on frozen dough baking. I. Effects of egg yolk and sugar ester. *Cereal Chem.* 1992, *69*(1), 89-92.

[4] Aibara, S., Ogawa, N., Hirose, M., Microstructures of bread dough and the effects of shortening on frozen dough. *Biosc. Biotech. Biochem.* 2005, *69*(2), 397-402.

[5] Silvas-García, M. I., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P., Carvajal-Millán, E., Barrón-Hoyos, J.M., Bello-Pérez, L.A., Quintero-Ramos, A., Effect of freezing rate and storage time on gluten protein solubility, and dough and bread properties. *J Food Process Eng.* 2014, *37*(3), 237-247.

[6] El-Hady, E. A., El-Samahy, S. K., Seibel, W., Brummer, J. M., Changes in gas production and retention in non-prefermentedfrozen wheatdoughs. *Cereal Chem.* 1996, *73*, 472-477.

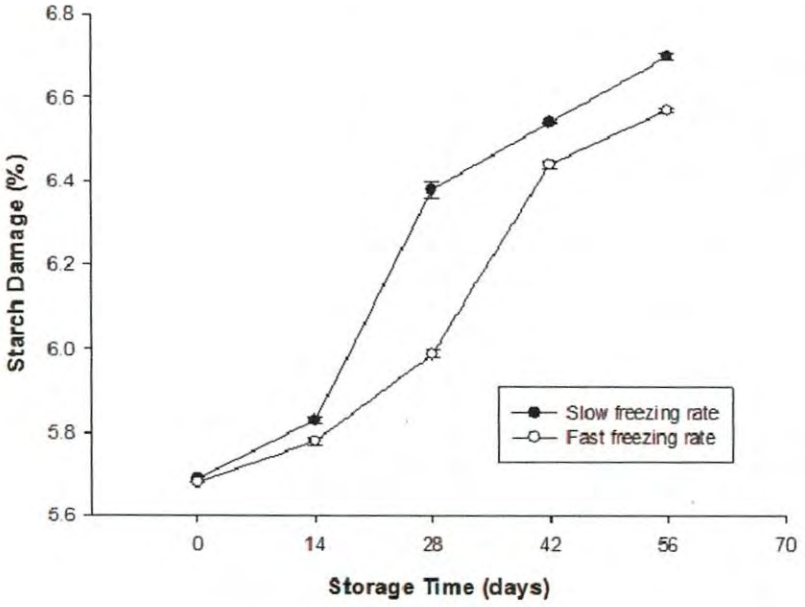
[7] Havet, M., Mankai, M., Le Bail, A., Influence of the freezing condition on the baking performances of french frozen dough. *J. Food Eng.* 2000, *45*, 139-145.

[8] Yi, J., Kerr, W., Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties. *Food Sci. Technol.* 2009, *42*, 1474-1483.

[9] Lu, W., Grant, L.A., Effects of prolonged storage at freezing temperatures on starch and baking quality of frozen doughs. *Cereal Chem.* 1999, *76*, 656-662.

347 [10] Ribotta, P.D., León, A.E., Añon, M.C., Effect of yeast freezing in frozen dough.
348 *Cereal Chem.* 2003, *80*(4), 454-458.
349 [11] Huang, W., Kim, Y., Li, X., Rayas-Duarte, P., Rheofermentometer parameters and
350 bread specific volume of frozen sweet dough influenced by ingredients and dough mixing
351 temperature. *J. Cereal Sci.* 2008, *48*, 639-646.
352 [12] Giannou, V., Tzia, C., Frozen dough bread: quality and textural behavior during
353 prolonged store- prediction of final product characteristics. *J. Food Eng.* 2007, *79*, 929-934.
354 [13] Borczac, B., Sikora, E., Sikora, M., Kapusta-Duch, J., The influence of prolonged
355 frozen storage of wheat-flour rolls on resistant starch development. *Starch/ Stärke*. 2014,
356 *66*, 533-538.
357 [14] Wolt, M., D'Appolonia, B., Factors involved in the stability of frozen dough. II. The
358 effects of yeast type, and dough additives on frozen-dough stability. *Cereal Chem.*1984, *61*,
359 213-221.
360 [15] Li, Z., Tang., X., Huang, W., Liu, J.G., Tilley, M., Yao, Y., Rheology microstructure,
361 and baking characteristics of frozen dough containing Rhizopus chinensis Lipase and
362 Transglutaminase, *Cereal Chem*. 2011, *88* (6), 596-601.
363 [16] Autio, K., Sinda, E., Frozen dough: rheological changes and yeast viability. *Cereal*
364 *Chem.* 1992, *69*, (4), 409-413.
365 [17] Bárcenas, M. E., Haros, M., Benedito, C., Rosell, C. M., Effect of freezing and frozen
366 storage on the staling of part-baked bread. *Food Res. Int.* 2003, *36*, 863–869.
367 [18] Baier-Schenk, A., Handschin, S., Conde-Petit, B., Ice in prefermented frozen bread
368 dough- an investigation based on calorimetry and microscopy. *Cereal Chem.* 2005, *82*(3),
369 251-255.

370 [19] Cauvain, S., Young, L., Bakery food manufacture and quality. Water control and
371 effects. 2da. Ed. Ames, Iowa. 2008.
372 [20] Sandstedt, R.M., Mattern, P.J., Damaged starch quantitative determination in flour.
373 *Cereal Chem.* 1960, *37*, 379-390.
374 [21] Li, E., Dhital, S., Hasjim, J., Effect of grain milling on starch structures and
375 flour/starch properties. *Starch/Stärk.* 2014, *66*, 15-27.
376 [22] Wu, J. P., and Corke, H. 2005. Quality of dried white salted noodles affected by
377 microbial transglutaminase. J. Sci. Food Agric. 85:2587-2594.
378
379 [23] Karim, A.A., Norziah, M.H., Seow, C.C., Methods for the study of starch
380 retrogradation. *Food Chem.* 2000, *71*, 9-36.
381 [24] Crosbie, G.B., Ross, A.S., The RVA handbook. AACC International. St. Paul, Minn.,
382 2007, pp.8
383 [25] Ribotta, P.D., León, A.E., Añón, M.C., Effect of freezing and frozen storage of doughs
384 on bread quality. *J. Agric. Food Chem.* 2001, *49*, 913-918.
385 [26] Kontogiorgos, V., Douglas Goff, H., Kasapis, S., Effect of aging and ice-structuring
386 proteins on the physical properties of frozen flour-water mixtures. *Food Hyd.* 2008, *22*,
387 1135 -1147.
388 [27] AACC., Starches, CHAPTER 3: Gelatinization, Pasting, and Retrogradation.
389 American Association of Cereal Chemists Publications, St. Paul, Minnesota, US, 1999, pp.
390 25-30.
391 [28] Ribotta, P.D., Le Bail, A., Effect of additives on the thermo–mechanical behaviour of
392 dough systems at sub–freezing temperatures. *Eur Food Res Technol.* 2007, *224* (4), 519–
393 524.



394

395

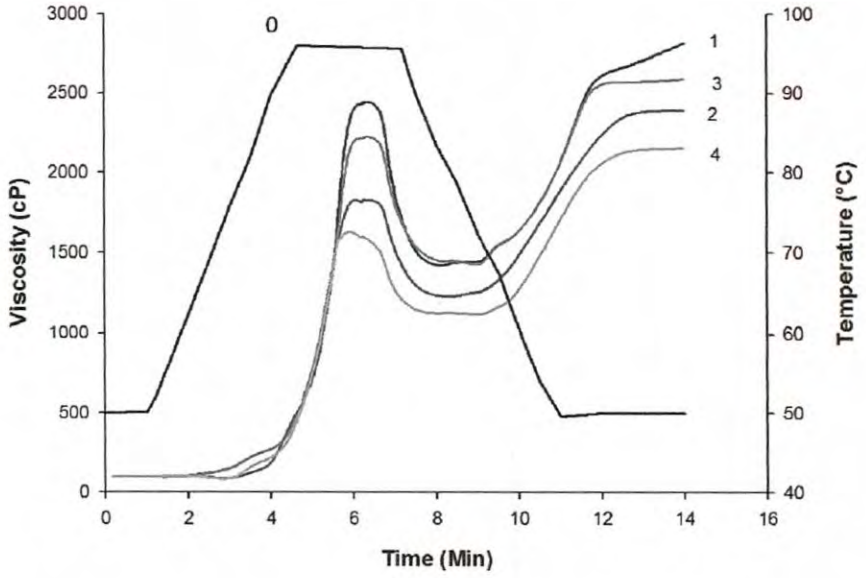
396 **Fig. 1** Effect of storage time and freezing rate on starch damaged in frozen dough. Bars

397 indicate standard deviation.

398

399

400

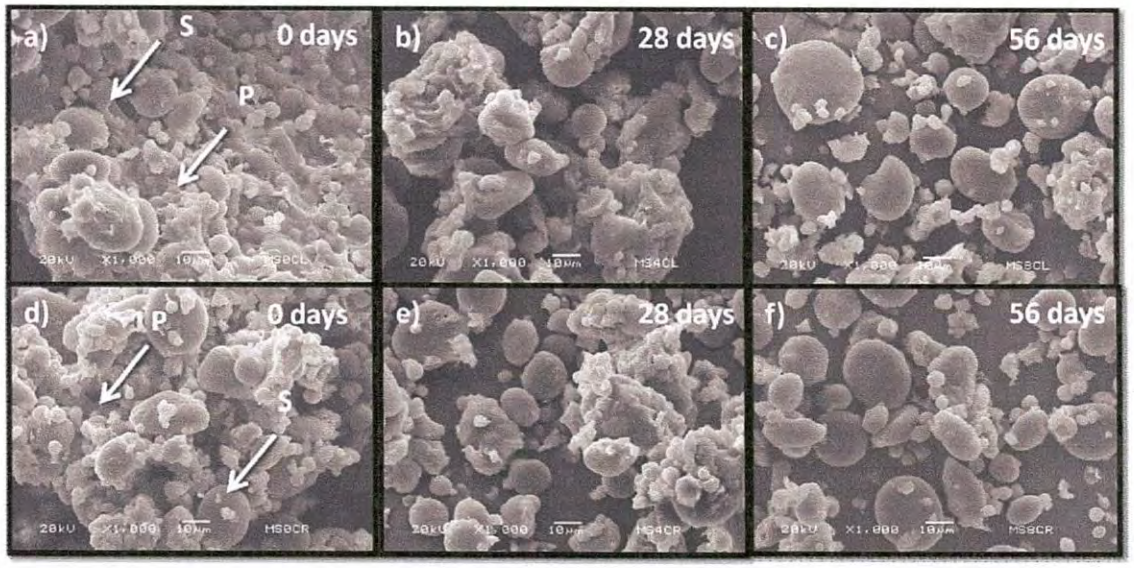


401

402 **Fig. 2** RVA viscosity of frozen wheat dough as response to the applied temperature program (line
403 0), wheat dough frozen at slow freezing rate and storage at 0 days (line 1), wheat dough frozen at
404 slow freezing rate and storage at 56 days (line 2), wheat dough frozen at fast freezing rate and
405 storage at 0 days (line 3) and wheat dough frozen at fast freezing rate and storage at 56 days (line
406 4).

407

408



409

410

411 **Fig. 3** Photomicrographs at a magnification of 1000 X of frozen dough at slow speed and

412 different storage times (a) 0 days, (b) 28 days and (c) 56 days, and dough at fast speed and

413 different storage times (d) 0 days, (e) 28 days and (f) 56 days. S (starch), G (Gluten).

414 **Table 1.** Effect of dough freezing rate and storage on the pasting properties of starch from dough.

415

Characteristics	Dough Frozen Storage Time (days)									
	Slow freezing rate (-0.14°C.min^{-1})					Fast freezing rate (-1.75°C.min^{-1})				
	0	14	28	42	56	0	14	28	42	56
Peak Viscosity (cP)	2435a[1]	1983b	1968c	1910d	1828e	2247.5a	1941b	1928.5c	1807d	1632e
Breakdown (cP)	1021a	720b	709c	685d	636e	870a	753.5b	737c	690d	611e
Setback (cP)	1190a	1202b	1268c	1274d	1554.5e	1133a	1211b	1215c	1288d	1413e
Final Viscosity (cP)	2817.5a	2604b	2544c	2475d	2394e	2592.5a	2588b	2492c	2328d	2154e
Pasting Temperature (°C)	91.20a	90.40b	90.02c	89.60d	77.45e	90.85a	90.45b	90.45b	91.30c	74.87d

416

417 [1]Within a row and for each freezing rate, means with the same letter are not statistically different at $P = 0.05$ ($P > 0.05$)

418

419

420

421 . 88

Table 2. Effect of dough freezing rate and storage and DSC on onset temperature, peak temperature, final temperature and gelatinization enthalpies.

Characteristics	Dough Frozen Storage Time (days)									
	Slow freezing rate (-0.14°C.min^{-1})					Fast freezing rate (-1.75°C.min^{-1})				
	0	14	28	42	56	0	14	28	42	56
Onset Temperature (°C)	55.47a[1]	55.68b	55.99c	56.05d	57.75e	55.31a	55.43b	55.51c	55.59d	55.87e
Peak Temperature (°C)	59.64a	59.88b	60.05c	60.34d	60.13e	60.09a	60.14b	60.24c	60.24c	60.43d
Final temperature (°C)	65.15a	64.62b	64.42c	64.3d	63.82e	65.56a	65.41b	65.1c	64.69d	60.3e
Enthalpy (J/g)	3.88a	4.43b	5.06c	5.18d	5.49e	3.98a	5.12b	5.16c	5.46d	5.49e

[1]Within a row and for each freezing rate, means with the same letter are not statistically different at $P = 0.05$ ($P > 0.05$).

CONSIDERACIONES FINALES

La masa para pan es un sistema complejo que involucra muchos elementos que en conjunto dan las características de la masa y el pan. Para su elaboración es importante considerar la calidad de la harina que incluye cantidad y tipo de proteína, la cantidad de agua, y el tiempo de mezclado de la masa, entre otros. Esto determinará la consistencia de la masa y sus propiedades viscoelásticas. Una consistencia adecuada, así como un equilibrio en la extensibilidad del pan permitirán una buena retención de CO_2, y durante el horneado se obtiene un pan de volumen y textura aceptables. Para las masas elaboradas en esta investigación cuyo destino fue la conservación mediante congelación, las consideraciones anteriores son de igual manera importantes. Sin embargo, para masas congeladas, los factores que rigen las características de calidad de la masa y el pan son la velocidad de congelación y el tiempo de almacenamiento de la masa en congelación. El tiempo de almacenamiento, seguido de la velocidad de congelación, juega un papel predominante en los cambios de la masa y el pan. Durante el proceso de congelación hubo migración de agua para formar cristales de hielo, la cantidad de agua libre aumentó durante el tiempo de almacenamiento, lo cual en el sistema se muestra que quedan regiones más concentradas de sólidos y depósitos de agua en forma de cristales de hielo. El cambio en la concentración de agua disponible para interaccionar con proteínas, almidón, levadura y demás componentes de la masa, da lugar a cambios conformacionales en las proteínas que forman el sistema, principalmente en las de la pared celular de las levaduras, en las de gluten y las de la superficie del almidón. El cambio conformacional de las proteínas involucra la modificación de los enlaces intramoleculares e intermoleculares. Es durante el tiempo de almacenamiento que aumenta la cantidad de iones hidronio disponible, lo que da como resultado una disminución del pH. Los cambios en los enlaces moleculares, aunado a la modificación en el pH, conduce a cambios en la solubilidad de las proteínas de gluten, además de reacciones de hidrólisis. Los cambios en las proteínas se ven implicados en las propiedades reológicas de la masa, una disminución de la proporción de proteína polimérica insoluble, además del aumento de agua libre que actúa como plastificante, da como resultado una disminución del elemento elástico de la masa y por tanto un aumento del elemento viscoso. Después de la congelación se observaron masas menos extensibles y con una pobre capacidad de retención de CO_2, en conjunto provocan una disminución del volumen de pan. Los cambios en la superficie el gránulo de almidón así como en las interacciones intermoleculares originan cambios en la miga del pan y una textura más firme.

CONCLUSIONES

La redistribución de agua en masas congeladas para pan afectó las propiedades fisicoquímicas y de panificación durante el proceso de congelación y el almacenamiento de las mismas. El tiempo de almacenamiento fue el factor principal que afectó la redistribución de agua y las propiedades fisicoquímicas y de panificación. También el tiempo de almacenamiento fue el principal factor que modificó las proporciones de agua libre y unida, así como la entalpía (ΔH) de fusión del hielo y la cantidad de agua congelable. Durante el tiempo de almacenamiento se presenta un aumento en el ΔH de fusión del hielo, cantidad de agua congelable y cantidad de agua libre, independientemente de la velocidad de congelación y el tipo de cristales que se formen durante el proceso. La migración de agua continúa después de formarse los cristales, lo cual sucede durante el almacenamiento.

El tiempo de almacenamiento en congelación seguido de la velocidad de congelación, afectaron significativamente las propiedades fermentativas y la solubilidad de las proteínas. La solubilidad de la proteína durante el almacenamiento fue mayor con la velocidad de congelación lenta que con la velocidad de congelación rápida. Las proteínas con alto peso molecular presentaron una despolimerización significativa durante el tiempo de almacenamiento. Las fracciones de despolimerización se convirtieron en segmentos solubles que eluyeron en la región correspondiente a las gliadinas debido al tamaño más pequeño de las moléculas. El aumento de la solubilidad de proteínas modificó las propiedades de la masa: ésta se hizo más viscosa y perdió resistencia a la extensión. El aumento en la viscosidad benefició el volumen y textura del pan.

El tiempo de almacenamiento en congelación seguido por la velocidad de congelación afectaron los cambios en el almidón de masas congeladas así como sus propiedades reológicas, térmicas y estructurales. Durante el tiempo de almacenamiento, el daño al almidón incrementa, disminuye la viscosidad máxima de la pasta de almidón y los gránulos se separan de la red de gluten. Se encontró evidencia que la congelación y el almacenamiento podrían modificar la cristalinidad del almidón en la masa congelada, haciéndolo más susceptible a la retrogradación y los cambios en la textura de la miga.

El tiempo de almacenamiento seguido por la velocidad de congelación afectó el volumen y la textura del pan. La velocidad de congelación rápida disminuyó el volumen del pan en un 68.44% a los 56 días de almacenamiento de la masa, mientras que la velocidad de congelación lenta en un 60%, lo que indica que es mejor congelar la masa a una velocidad lenta. El volumen del pan disminuyó durante el tiempo de almacenamiento de masa, excepto entre 14 y 28 días, cuando el volumen del pan permaneció similar. Por lo tanto, se recomienda almacenar la masa hasta 28 días. Después de este período, la disminución de volumen es drástica. La textura del pan se ve afectada por la congelación rápida de la masa. La dureza de la miga del pan incrementó durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo para la velocidad de congelación lenta fue menor el efecto que para la velocidad de congelación rápida. Por lo anterior, la masa para pan debe ser congelada a velocidad lenta y almacenada durante un período no superior a 28 días y el pan debe ser consumido inmediatamente después de su horneado para conservar sus mejores atributos.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar aditivos capaces de enlazar agua, con el fin de poder retardar la migración de agua y con ello, evitar los cambios que suceden en la masa y el pan.

2. Estudiar el efecto de la velocidad de congelación en panes pre-horneados y congelados.

3. Analizar los mecanismos por los que el gluten deja de enlazar el agua.

4. Evaluar el efecto de la congelación en las burbujas de aire y gas de la masa congelada.

5. Analizar los mecanismos por los cuales el almidón sufre daño en las estructuras que forman el granulo.

6. Evaluar el efecto de la prefermentación y cantidad de agua en la redistribución de agua de masas congeladas.

REFERENCIAS

AACC International. (2000). Approved Methods of the AACC, 10th ed. Method (02-52, 08-03, 10-09, 26-10, 29-95, 38-11, 44-15, 44-40, 46-13, 54-21, 54-30, 54-30A, 56-61A, 74-09). The Association: St. Paul, MN.

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). Microestructures of bread dough and the effects of shortening on frozen dough. *Biosci. Biotech. Biochem.* 69 (2), 397-402.

Anon, M. C., Le Bail, 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. and Datta, A.K. (2008). Bread baking - A review. *J. Food Eng.* 86, 465–474

Autio, K. and Sinda, E. (1992). Frozen doughs: rheological changes and yeast viability. *Cereal chem.* 69 (4),409-413

Baier-Shenk, A., Handschin, S., Conde, B. (2005). Ice in prefermented frozen bread dough- an investigation based on calorimetry and microspopy. *Cereal Chem.* 82(3), 251-255.

Bárcenas, M.E., Benedito, C., Rosell, C.M. (2003). Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage. *Food Hydrocol.* 18, 769–774.

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.

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.

Biliaderis, C.G., and Galloway, G. (1989). Crystallization behavior of amylose.V complexes: structure.property relationships. *Carbohyd. Res.* 189, 31.

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.

Bot, A. (2003). Differential scanning calorimetric study on the effects of frozen storage on gluten and dough. *Cereal Chem.* 80, 366-370.

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. Págs. 357–361.

Calaveras, J. (1996). Tratado de panificación y bollería. AMV ediciones. Págs. 226-228, 242-243.

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.

Cauvain, S., Young, L., Bakery food manufacture and quality. (2008).Water control and effects. 2da. Ed. Ames, Iowa.

Cox, P.M. (1987). Ultracongelación de alimentos. Guía de la teoría y práctica. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Págs. 374-378.

Dodi´c, D., Pejin, S. Dodi´c, S., Popov, J. Mastilovi´c, J., Popov-Ralji´c, 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.

El-Hady, E. A., El-Samahy, S. K., Seibel, W., and Brummer, J. M. (1996). Changes in gas production and retention in non-prefermented frozen wheat doughs. *Cereal Chem.* 73, 472-477.

Esselink, E.F.J., Van Aalst, H., Maliepaard, M., Van Duynhoven, J.P.M. (2003). Long-term storage effect in frozen dough by spectroscopy and microscopy, *Cereal Chem.* 80 (4), 396-403.

Hosomi, K., Nishio, K. and Matsumoto, H. (1992). Studies on frozen dough baking. I. Effects of egg yolk and sugar ester. *Cereal Chem.* 69(1), 89-92.

Hsu, K., Hoseney, R., Seib, S., (1979). Frozen dough. I. Factor affecting the stability of yeasted doughs. *Cereal Chem.* 54, 419–424.

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, microsetructure, and, baking properties if frozen dough. *Cereal Chem.* 85(3), 301-306.

Inoue, Y., and Bushuk, W. (1992). Studies on frozen doughs. II. Flour quality requirements for bread production from frozen dough. *Cereal Chem.* 69,423.

Inoue, Y., Sapirstein, H. D., Takayanagi, S., And Bushuk, W. (1994). Studies on frozen doughs. III. Some factors involved in dough weakening during frozen storage and thaw-freeze cycles. *Cereal Chem.* 71, 118-121.

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.

Kieffer R, Wieser H, Henderson M H and Graveland A. (1998). Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. *J. Cereal Sci.* 27, 53-60.

Kulp, K. (1995). Chapter 4: Biochemical and biophysical principles of freezing. Kulp K, Lorenz K, Brummer K, editores. Frozen and refrigerated doughs and batters. St. Paul: *American Association of Cereal Chemists*. Págs. 63-89.

Laaksonen, T.J. and Y.H. Roos. (2000). Thermal, dynamic-mechanical and dielectric Analysis of phase and state transitions of frozen wheat doughs. *J. Cereal Sci.* 32(3), 281-292.

León A, Duran E, Benedito de Barber, C. (1997). A new approach to study starch changes occurring in the dough.baking process and during bread storage. Z. Lebensm. Unters. Forsh. A, 204, 316.320.

Lookhart, G. L., bean, S. R., and bietz, J. A. (2003).HPLC of gluten monomeric proteins. In: Wheat Gluten Protein Analysis. P. R. Shewry,G. L. Lookhart, eds. AACC International: St. Paul, MN.

Lu, W. and Grant, L.A. (1999). Effect of prolonged storage at frezzing temperatures on starch and baking quality of frozen doughs. *Cereal Chem.* 76(5), 656-662.

Madrid, A. (1999). Confitería y pastelería: Manual de Formación. AMV Ediciones. Madrid, España. Págs. 174-184.

Magaña-Barajas E, Ramírez-Wong B, Platt-Lucero L, López-Ahumada G, Torres P, Sánchez-Machado, D. (2009). Caracterización viscoelástica de masas de variedades de trigos suaves. *Tecnología, Ciencia, Educación*. 24, 12-22.

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.

Mazur, P. (1965). The roll of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. Ann. N.Y. Acad. Sci., 124, 658.676.

Mazur, P. (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science,* 168, 939.949.

Meryman, H. (1968). Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature,* 218, 333.336.

Nicolas, Y., Smit, R.J.M., Van Aalst, H., Esselink, F.J., Weegels, P.L., Agterof, W.G.M. (2003). Effect of storage time and temperature on rheological and microstructural properties of gluten. *Cereal Chemistry*, 80, 371.377.

Olivera, S.D. (2011). The effect of basic raw material in the process of wheat dough freezing. *Food Feed Res*. 38(1), 9-19.

Panadero, J., Randez-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.

Rasanen, J., Blanshard, J.M.V., Mitchell, J.R., Derbyshire, W., Autio, K. (1998). Properties of frozen wheat doughs at subzero temperatures. *J. Cereal Sci.* 28, 1.14.

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. (2002). Estudio de las transformaciones fisico.quimicas que se producen durante el procesamiento de las masas congeladas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 2002.

Ribotta, P.D., Leon, A.E., Anon, M.C. (2003). 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.

Roozendaal, H., Abu-Hardan, M., Frazier, R.A. (2012). Thermogravimetric analysis of water release from wheat flour and wheat bran suspensions. *J. Food Eng.* 111, 606–611.

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.

Sahlstrøm, S., Nielsen, A., Faergestad, E., Lea, P, Park W, Ellekjaer, M. (1999). Effecct of dough processing conditions and DATEM on Norwegian hearth bread prepared from frozen dough. *Cereal Chem.* 76, 38–44.

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.

Seguchi M, Nikaidoo S, Morimoto N. (2003). Centrifuged liquid and breadmaking properties of frozen.and.thawed bread dough. *Cereal Chem.* 80, 264.268.

Serna-Saldívar. S.O. (2001). Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. Editorial AGT Editor, S.A. Pp: 247-248.

Sharadanant, R., Khan, K. (2003). Effect of hydrophilic gums on the quality of frozen dough: II. Bread characteristics. *Cereal Chem.* 80(6), 773-780.

Silva, R. F. (2000). Uses of alpha-crystalline emulsifiers in the sweet goods industry. *Cer. Foods World.* 45,405-411.

Silvas-García, M.I., Ramírez-Wong, B., Torres-Chavez, P.I., Magaña-Barajas, E., Salazar-García, M.G. And López-Ahumada, G.A. (2011). Effect of trehalose on fermentation, proteins and volume of French-type bread prepared with frozen dough. *Cereal Foods World.* 56, A63.

Singh, N. K., Donovan, R. and MacRitchie, F. (1990). 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.

Singh, R. P. and Heldman, D. R. (2001). Introduction to food engineering.3ra ed. Academic Press, USA.

Sultan, W. J. (1990). Practical baking. 5a Edición. Van Nostrand Reinhold. New York. USA.

Variano-Marston, E., Hsu, K., Mahdi, J.(1980). Rheological and structural changes in frozen dough. *Bakers'Dig.* 54, 32.

Veraverbeke, W. S., and Delcour, J. A. (2002) Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *CRC Cr. Rev. Food Sci.* 42, 179 – 208

Wolt, M.J. and D'Appolonia, B.L. (1984). Factors involved in the stability of frozen dough. II. The effects of yeast type, flour type and dough additives on frozen-dough stability. *Cereal Chem.* 61(3),213-221.

Yi, J., and Kerr, W. (2009). Combined effects of freezing rate, storage temperature and time on bread dough and baking properties. *Food Sci. Technol.* 42, 1474-1483.

Zeleznak, K. and Hoseney, R.(1986). The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chem.*, 63, 407.411.

ANEXO 1

Publicaciones

M.I. Silvas-García, B. Ramírez-Wong, P. Torres-Chávez, E. Carvajal-Millán, J.M. Barrón-Hoyos, L.A. Bello-Pérez, A. Quintero-Ramos. 2014. Effect of Freezing Rate and Storage Time on Gluten Protein Solubility, and Dough and Bread Properties. Journal of Food Process Engineering, 37(3), 237-247.

M. I. Silvas-García, B. Ramírez-Wong, P. Torres-Chávez, E. Carvajal-Millán, J.M. Barrón-Hoyos, L.A. Bello-Pérez. 2013. Cambios fisicoquímicos en masa congelada y su efecto en la calidad del pan. Interciencia, 38(5), 332-338.

A. Escalante-Aburto, N. Ponce-García, M. I. Silvas-García, E. Magaña-Barajas, L.C. Platt-Lucero, R. Campa-Ramos, P. I. Torres-Chávez, B. Ramírez-Wong. 2011. Evaluación de la Viscoelasticidad de Masas de Maíz Obtenidas Por Diferentes Procesos. Memorias del Simposium Internacional sobre Tecnologías Convencionales y Alternativas en el Procesamiento de Maíz, Chihuahua, Chihuahua. México. 3-5 de Agosto de 2011. ISBN: 978-607-7691-88-4.

N. Ponce-García, A. Escalante-Aburto, M. I. Silvas-García, M. G. Salazar-García, B. Ramírez-Wong, P. I. Torres-Chávez, L. C. Platt-Lucero, R. Campa-Ramos. 2011. Evaluación de la Viscosidad Elongacional y Tiempo de Relajación de Masas de Maíz Obtenidas por Diferentes Procesos. Memorias del Simposium Internacional sobre Tecnologías Convencionales y Alternativas en el Procesamiento de Maíz Chihuahua, Chihuahua. México. 3-5 de Agosto de 2011. ISBN: 978-607-7691-88-4.

Silvas-García, M.I., Ramírez-Wong, B., Torres-Chavez, P.I., Magaña-Barajas, E., Salazar-García, M.G. And López-Ahumada, G.A. 2011. Effect of trehalose on fermentation, proteins and volume of French-type bread prepared with frozen dough. *Cereal Foods World*. 56, A63.

M.I. Silvas-García, B. Ramírez-Wong, P. Torres-Chávez, E. Carvajal-Millán, J.M. Barrón-Hoyos, L.A. Bello-Pérez, 2015 Effect of freezing rate and storage time in the freezable water of bread dough using thermal analysis. 2015. Journal of food process engineering. Enviado

M.I. Silvas-García, B. Ramírez-Wong, P. Torres-Chávez, E. Carvajal-Millán, J.M. Barrón-Hoyos, L.A. Bello-Pérez, Changes in rheological thermal and structural properties of starch dough by freezing rate and storage time 2015. Starch. En revisión por los autores.

ANEXO 2

Producción Científica

Presentaciones en congresos nacionales e internacionales

Ponencia: "Cambios fisicoquímicos en el agua congelable de masa para pan" en la XIX Reunión Universitaria de Investigación en Materiales RUIM 2014, Universidad de Sonora, 20 de noviembre de 2014.

Ponencia: Efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre algunas propiedades fisicoquímicas del almidón de masa congelada, V Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2014, Córdova Argentina, 19 de noviembre de 2014.

Ponencia: " The effect of freezing rate and storage time on fermentative and rheological properties of dough and bread quality" en EFFoST Annual Meeting, Européan Food Inovation Systems, del 13 al 15 de noviembre de 2013, Bologna, Italia.

Ponencia: "Efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre algunas propiedades fisicoquímicas y de panificación en masas congeladas" en el VIII Congreso del Noroeste y IV Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología del 27 de febrero al 1 de marzo del 2013, Guaymas, Son.

Ponencia: "Efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre las propiedades fermentativas, reológicas y de panificación en masas congeladas" en la XVII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales RUIM 2012, Universidad de Sonora, 28 al 30 de noviembre de 2012.

Presentación oral en la Reunión Universitaria de investigación en materiales 23 de noviembre de 2011.

Ponencia: "Effect of trehalose on fermentation, proteins, and volume of French-type bread prepared with frozen dough"presentada en el congreso internacional de la American Association of Cereal Chemist en Palm Spring, Ca. USA. 16 al 19 de octubre de 2011.

Participaciones programa de radio

Programa de Radio Alimentación Problema de Nuestro Tiempo, con el tema "Masas congeladas: una alternativa para hornear pan en el hogar", 8 de agosto de 2013.

ANEXO 3

Estancias de Investigación:

Universidad Autónoma de Chihuahua campus Chihuahua (UACH) y Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) Chihuahua semestre 2013-1, para estudiar el efecto de la velocidad de congelación y tiempo de almacenamiento sobre las propiedades térmicas de masas congeladas, bajo la tutela de Dr. Armando Quintero (UACH) y Dr. Daniel Lardizábal (CIMAV).