



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA EN LA  
MICROESTRUCTURA DE LA PASTA HOJALDRE PARA LLEVAR A CABO UNA  
REDUCCIÓN DE GRASA EN EL PROCESO DE LAMINADO

TESIS QUE PRESENTA

ALEJANDRA MORA MUNDO

ASESOR ACADÉMICO

DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE

ASESORES ADJUNTOS

DRA. MIRIAM FABIOLA FABELA MORÓN

DRA. ROSA MARÍA GÓMEZ ESPINOZA

ENERO, 2017

# ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | III |
| AGRADECIMIENTOS.....   | IV  |
| RESUMEN.....   | 1   |
| INTRODUCCIÓN.....  | 4   |
| 1.0 MARCO TEÓRICO .....  | 6   |
| 1.1 La panificación .....  | 6   |
| 1.2 Historia y evolución del pan.....                                  | 6   |
| 1.3 El elemento primordial del pan: Trigo .....                        | 9   |
| 1.4 Tipos de pan .....   | 9   |
| 1.5 Masas laminadas .....  | 10  |
| 1.6 Pasta hojaldre .....   | 11  |
| 1.7 Funcionalidad de la materia prima.....                             | 13  |
| 1.7.2 Composición Química de la Harina.....                            | 13  |
| 1.8 Proceso de elaboración de la pasta hojaldre .....                  | 18  |
| 1.9 Métodos de laminado de la pasta hojaldre .....                     | 20  |
| 1.10 Número de láminas de la pasta hojaldre.....                       | 22  |
| 1.11 Tendencias actuales en panificación .....                         | 24  |
| 1.12 Tecnología enzimática.....  | 24  |
| 1.13 Enzimas .....   | 25  |
| 1.14 Evolución de las enzimas en la panadería.....                     | 26  |
| 1.15 Las enzimas en los nuevos procesos de panificación.....           | 27  |
| 1.16 Sinergia de enzimas (sinergismo).....                             | 38  |
| 2. JUSTIFICACIÓN.....  | 42  |
| 4. OBJETIVOS.....  | 44  |
| 4.1 Objetivo general .....   | 44  |
| 4.2 Objetivos específicos.....   | 44  |
| 5. METODOLOGÍA .....   | 44  |
| 5.1 Materiales.....  | 44  |
| 5.2 Ingredientes .....   | 45  |
| 5.3 Elaboración de la pasta hojaldre .....                             | 45  |
| 5.4 Preparación de las muestras experimentales de pasta hojaldre ..... | 47  |
| 6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA .....                                | 47  |



|   |    |
|---|----|
| 6.1 Cinética enzimática.....  | 48 |
| 6.2 Análisis de curvas de temperatura .....   | 48 |
| 6.3 Análisis de pH.....   | 48 |
| 6.4 Volumen específico.....   | 48 |
| 6.5 Análisis del perfil de textura TPA: Fracturabilidad y dureza.....   | 49 |
| 6.6 Color .....   | 49 |
| 6.7 Método de extracción Soxhlet .....  | 50 |
| 6.8 Análisis estadístico .....  | 50 |
| 6.9 Caracterización micro estructural.....  | 50 |
| 7.3 Análisis de pH.....   | 68 |
| 7.4 Volumen específico.....   | 70 |
| 7.5 Análisis del perfil de textura TPA: fracturabilidad y dureza.....   | 73 |
| 7.6 Color .....   | 75 |
| 7.8 Análisis del porcentaje de grasa sobre una concentración de 0.5% de $\alpha$ -amilasa en la pasta hojaldre..... | 81 |
| 8. CONCLUSIONES .....   | 84 |
| 9. REFERENCIAS .....  | 84 |
| 11. ARTÍCULO.....   | 91 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Fórmula típica de masa de hojaldre industrializada.....   | 12 |
| Cuadro 2. Una fórmula de hojaldre tradicional francés.....  | 12 |
| Cuadro 3. Composición de la harina de trigo.....  | 13 |
| Cuadro 4. Grasas usadas en panificación.....  | 17 |
| Cuadro 5. Grupos de enzimas .....   | 30 |
| Cuadro 6. Valores de pH de las pastas hojaldre .....  | 69 |
| Cuadro 7. Valores de volumen específico.....  | 72 |
| Cuadro 8. Dureza del pan hojaldre .....   | 74 |
| Cuadro 9. Parámetros de color del pan hojaldre.....   | 75 |
| Cuadro 10. Análisis de la determinación del contenido de extracto etéreo.....   | 78 |
| Cuadro 11. Análisis del porcentaje de grasa sobre una concentración de 0.5% de $\alpha$ -amilasa en la pasta hojaldre ..... | 83 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Cinco etapas en la evolución de las máquinas de moler grano.....   | 7  |
| Figura 2. Estructura de las masas.....   | 11 |
| Figura 3. Mecanismo de aumento de volumen de la masa hojaldre durante el horneado  | 11 |
| Figura 4. Diagrama de flujo de la elaboración de la pasta hojaldre .....   | 19 |
| Figura 5. Método laminado francés .....  | 20 |
| Figura 6. Representación esquemática de la acción de la $\alpha$ -amilasa sobre los polímeros de almidón (amilopectina) .....          | 41 |
| Figura 7. Método de laminación “Inglés”. .....   | 46 |
| Figura 8. Curvas de temperatura interna durante el horneado de las diferentes formulaciones de pasta hojaldre. ....                    | 66 |
| Figura 9. Medición de temperatura interna durante el horneado. ....  | 68 |
| Figura 10. Incremento del volumen en la pasta hojaldre durante el horneado.....  | 70 |
| Figura 11. Formulación 4 .....   | 71 |
| Figura 12. Medición de TPA en pasta hojaldre horneada.....   | 74 |
| Figura 13. Color en la corteza de los panes hojaldrados de las 4 formulaciones distintas. ....   | 76 |
| Figura 14. Imágenes de microscopia confocal de barrido láser (CSLM) de las diferentes formulaciones de pasta hojaldre sin hornear..... | 79 |

## RESUMEN

Las masas laminadas se caracterizan por presentar una estructura dividida en múltiples capas mediante grasa incorporada a través de un proceso mecánico llamado "laminado". Existen diferentes masas de este tipo, cada una de éstas presenta una textura diferente, las cuales se caracterizan por la forma en que se incorpora la grasa a la masa en su elaboración. La pasta hojaldre consiste en harina con suficiente agua para formar una masa de consistencia similar a la de la grasa que se utiliza en el proceso de laminado; caracterizada por su estructura crujiente. Esta masa no contiene azúcar ni levadura o algún agente leudante en su formulación, sin embargo es capaz de crecer hasta 600% su tamaño original mediante el vapor generado por la grasa atrapada en la masa durante el proceso de horneado a una temperatura elevada (210°C).

En los últimos años el uso de tecnología enzimática en alimentos ha crecido, y en el área de panificación también es ampliamente utilizada. En especial las amilasas, las cuales son utilizadas como agente antienviejecimiento, dando suavidad y textura a los panificados, alargando su vida útil. Sin embargo, existen pocos trabajos de investigación respecto a los efectos relacionados con la adición de este tipo de enzimas en pastas laminadas y su interacción con el proceso de laminado, por lo que se considera importante ampliar los estudios de la aplicación de esta enzima en pasta hojaldre.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de un complejo enzimático comercial (Corbion Caravan Ingredients) de alfa amilasas (0.5, 1.0, 1.5%) sobre la microestructura de pasta hojaldre y como afecta en el contenido de grasa (100%, 80% y 60%) en base al peso de la masa), para llevar a cabo una reducción de la misma.

Los resultados obtenidos demostraron que al utilizar el complejo comercial de enzimas  $\alpha$ -amilasa al 0.5% en base al peso de la harina, mejora las propiedades térmicas y fisicoquímicas tanto de la pasta cruda, como del producto final, mejora y optimiza el proceso de horneado, debido a que acelera los procesos de gelatinización del almidón, además las enzimas hidrolizan los gránulos de almidón, creando micro-rupturas en la estructura laminar de la pasta hojaldre, haciendo que el vapor producido durante el horneado tenga una mejor difusión a lo largo de las láminas, Y que a su vez la pasta



hojaldrada expulsa 7.6% de grasa durante el horneado, optimizando así el tiempo de horneado y hace que sea posible reducir el porcentaje de grasa utilizado durante el laminado sin cambiar las características fisicoquímicas de la pasta hojaldrada de 100% a 80%, es decir se puede reducir 20% de grasa que se utiliza durante el laminado.

## ABSTRACT

Laminated doughs are characterized by a structure divided into multiple layers by incorporated fat through a mechanical process called "lamination". There are different doughs of this type, each of them with a different texture, characterized by the way of incorporation of fat in their preparation. Puff pastry consists of wheat flour with enough water to form a dough of similar consistency to that of the fat used during the laminating process; characterized by its crisp and flaky structure. Puff pastry does not contain sugar or yeast or any leavening agent in its formulation, however it is able to grow up to 600% its original size by the steam generated by the fat trapped in the dough during the baking process at a high temperature (210°C).

In recent years the use of enzymatic technology in food industry has grown, and in the baking area is also widely used. Especially the amylases, which are used as anti-staling agent, giving softness and texture to baked goods, extending its shelf life. However, there is little research on the effects related to the addition of this type of enzymes in laminated pastes and their interaction with the rolling or laminating process, so it is considered important to extend the studies of the application of this enzyme paste puff pastry. The aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of a commercial enzyme complex (Corbion Caravan Ingredients) of  $\alpha$ -amylases (0.5, 1.0, 1.5%) on the puff pastry microstructure and how it affects fat content (100% 80% and 60%) based on the weight of the dough), to carry out a reduction there of. The results obtained showed that using the 0.5%  $\alpha$ -amylase enzyme complex based on flour weight improves the thermal and physico-chemical properties of both raw and final products, improves and optimizes the baking process, because it accelerates the processes of gelatinization of the starch, in addition the enzymes hydrolyze the starch granules, creating micro-ruptures in the laminar structure of the puff pastry, causing that the steam produced during the baking has a better diffusion along and that in turn the pastry paste expels 7.6% fat during baking, thus optimizing the baking time and makes it possible to reduce the percentage of fat used during the rolling without changing the



physico-chemical characteristics of the pastry from 100% to 80%, and 20% of fat used can be reduced during the rolling process.



## INTRODUCCIÓN

Las masas laminadas se caracterizan por presentar una estructura dividida en múltiples capas mediante grasa incorporada a través de un proceso mecánico llamado “laminado”. Existen diferentes masas de este tipo, cada una de éstas con una textura diferente, caracterizadas por la forma de incorporación de la grasa.

La masa hojaldre se conoce también como hojaldre francés, la cual consiste en harina con suficiente agua para formar una masa de consistencia similar a la de la grasa que se utiliza en el proceso de laminado, caracterizada por su estructura crujiente. Esta masa no contiene azúcar ni levadura o algún agente leudante en su formulación, sin embargo es capaz de crecer hasta 600% su tamaño original mediante el vapor generado por la grasa atrapada en la masa durante el proceso de horneado a una temperatura elevada (210°C).

En los últimos años el uso de tecnología enzimática en alimentos ha crecido, y en el área de panificación también es ampliamente utilizada. En especial las amilasas, las cuales son utilizadas como agente antienviejecimiento, dando suavidad y textura a los panificados, alargando su vida útil. Sin embargo, existen pocos trabajos de investigación respecto a los efectos relacionados con la adición de este tipo de enzimas en pastas laminadas y su interacción con el proceso de laminado, por lo que se considera importante ampliar los estudios de la aplicación de esta enzima en pasta hojaldre.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de diferentes concentraciones de un complejo enzimático comercial (Corbion Caravan Ingredients) de alfa amilasas (0.5, 1.0, 1.5) sobre la microestructura de pasta hojaldre y como afecta en el contenido de grasa (100%, 80% y 60%) en base al peso de la masa), para llevar a cabo una reducción de la misma.

El presente proyecto fue dividido en tres partes:

1.-Estandarización de técnicas y métodos. Se llevó a cabo la selección de los métodos y técnicas adecuadas para la realización del proyecto. Dichas técnicas fueron útiles para la estandarización tanto de las materias primas como del proceso de elaboración y el desarrollo de los análisis pertinentes.



2.- Análisis a la masa hojaldre (producto crudo). La microestructura y distribución de ingredientes de las diferentes formulaciones de las masas laminadas se evaluó mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM), la determinación del contenido de lípidos totales se cuantificó mediante el método Soxhlet en la masa (sin hornear) y se evaluó la actividad enzimática en las masas de manera indirecta (grado de hidrólisis) por medio de la determinación de azúcares reductores, mediante el método del 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) a temperaturas de activación del complejo enzimático.

3.- Las pastas hojaldre de cada formulación se hornearon para evaluar la calidad fisicoquímica del producto final mediante análisis de perfil de textura (TPA), colorimetría con referencia al sistema CIEL\*a\*b\*, determinación del contenido de lípidos totales por método Soxhlet. Finalmente se realizó una comparación entre los resultados obtenidos en la pasta hojaldre (cruda) y los obtenidos en las muestras horneadas y así encontrar un equilibrio entre la concentración adecuada de enzima y el porcentaje de grasa utilizado en el proceso de laminado, para de esta manera alcanzar los objetivos del proyecto.

Se utilizó un análisis estadístico para evaluar la diferencia significativa entre las muestras a un nivel de significancia del 95%.



## **1.0 MARCO TEÓRICO**

### **1.1 La panificación**

Este término se aplica al proceso más importante del empleo de las harinas obtenidas de cereales para la alimentación humana, transformándolas en pan mediante calor seco aplicado directamente por radiación o convección en un horno o en un aparato similar (AIB, 1994). Este producto es uno de los alimentos más consumidos cotidianamente y el sustento al que han recurrido centenares de generaciones desde tiempos prehistóricos para asegurar la supervivencia, convirtiéndose en sinónimo de alimento en todo el mundo (McGee, 2007).

### **1.2 Historia y evolución del pan**

En la evolución del pan han influido todos los elementos que intervienen en su elaboración: los cereales, las máquinas usadas para molerlos, los microorganismos y productos sintéticos que esponjan la masa, los hornos en los que se cuece, las personas que lo hacen y las que lo comen.

En los últimos años se ha logrado llevar el refinado y el enriquecimiento hasta grados extremos y actualmente se dispone de panes industriales que se venden en los supermercados y los cuales están siendo mejorados cada vez (McGee, 2007).

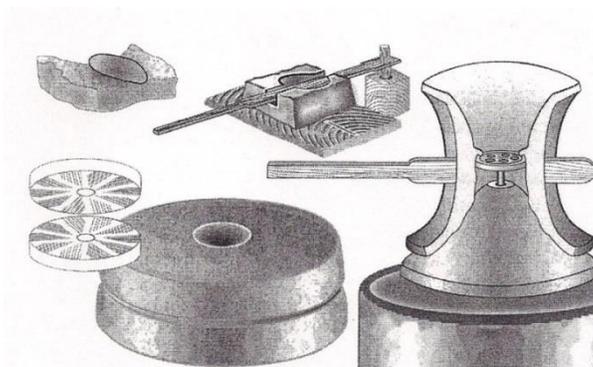
#### **1.2.1 La prehistoria**

Dos descubrimientos prehistóricos fueron fundamentales para la transformación de los cereales en pan y luego en fideos, pastas y pasteles. El primero fue que, además de que se podían hacer atoles o papillas cociendo los cereales molidos, las pastas obtenidas al mezclarlos con agua también se podían transformar en un sólido interesante con sólo cocerlas sobre piedras muy calientes: el resultado fue el pan ácimo. El segundo fue que, si se dejaba reposar una masa durante algunos días, ésta fermentaba y se expandía merced a los gases, lo que permitía elaborar un pan mucho más suave, ligero y con mejor sabor (McGee, 2007).

#### **1.2.2 Egipto y Mesopotamia**

La prueba arqueológica más antigua que se tiene del pan leudado procede de tumbas

egipcias que datan del año 4000 a. C. Los panes fermentados aparecieron espontáneamente, ya que las esporas de las levaduras son ubicuas en el aire y en las superficies de los cereales, de modo que infestan cualquier masa de cereal húmeda que les sirva de alimento. La producción de levadura se convirtió en una profesión especializada en Egipto hacia el año 300 a.C.; entre tanto, el equipo de molienda (figura 1) evolucionó del simple mortero a dos piedras planas y luego en Mesopotamia (hacia el año 800 a.C.) a dos piedras que giraban continuamente. El uso eventual de animales de tiro y de la energía hidráulica y eólica hizo posible la molienda continua y con ello también la elaboración de harinas muy finas sin apenas requerir mano de obra humana (McGee, 2007).



**Figura 1. Cinco etapas en la evolución de las máquinas de moler grano.** De arriba a la izquierda y en el sentido de las agujas del reloj: la piedra de moler y el molino de palanca, el molino de ánfora, las muelas planas hicieron posible aprovechar la fuerza de la naturaleza al utilizarlas en molinos de agua y viento. En el moderno mundo industrial la mayoría del grano se muele entre discos metálicos estriados. Fuente: McGee, 2007.

### 1.2.3 Grecia y Roma

Es bien sabido que a los griegos les encantaba comer pan y pasteles aderezados con miel, anís, sésamo y frutas, y también que elaboraban panes tanto integrales con grano entero como con harina relativamente refinada. A partir de entonces, la blancura del pan se consideró como un signo de riqueza y distinción.

A finales del Imperio Romano, el pan de trigo era un producto tan esencial para la vida que se importaban inmensas cantidades de trigo duro (*durum*) y normal desde el norte de África y otras regiones del Imperio para satisfacer la demanda del pueblo (McGee, 2007).



#### 1.2.4 La edad media

En la Europa medieval, el hornear pan con levadura fue en gran parte una actividad profesional, ya que los hornos eran caros, cualquiera que pudiera darse el lujo de poseer y operar un horno grande era un profesional o bien un *Lord*. La mayoría de la gente no podía, por lo que compraba o efectuaba trueques con pan (Myhrvold, Young y Bilet, 2011). En esa época, en los banquetes se servía un “trincherero”, que era una gruesa rebanada de pan sin levadura para utilizarla como plato, que luego se podía comer o se daba a algún mendigo. Además se usaba la masa como una especie de recipiente para cocinar y guardar todo tipo de alimentos, en especial como envoltorio protector y comestible para diversas recetas de carne (McGee, 2007).

#### 1.2.5 El renacimiento y edad media

Durante el periodo del Renacimiento fueron aportados notables progresos en el arte de la repostería: tanto la masa hojaldre como la *Choux* datan de esta época. La elaboración de masas pasteleras surgió en los países mediterráneos a principios de esta época, cuando aparecieron los primeros buñuelos y masas rellenas de crema. Ya en el siglo XVII, tanto las masas quebradas como laminadas eran preparaciones cotidianas. Los híbridos de masa panadera y hojaldre (masa danesa) son un invento más reciente: datan de finales del siglo XIX y principios del XX (McGee, 2007).

#### 1.2.6 La industrialización del siglo XX

El siglo XX trajo a nivel mundial dos tendencias generalizadas. Una fue el descenso en el consumo del pan común: con el aumento de ingresos, la gente podía permitirse el consumo de más carne, pasteles y bollos enriquecidos con azúcar y grasa. La otra tendencia fue la industrialización de la producción del pan. La mayor proporción se elabora en grandes fábricas centralizadas y no en pequeñas tahonas locales (McGee, 2007).

Recientemente se ha desarrollado el sistema de “cocción parcial o pre-cocción”, que consiste en cocer parcialmente el pan y distribuirlo congelado a los supermercados, y tiendas, que se encargan de terminar de cocerlo y venderlo mientras está caliente y con todo su sabor. El pan industrial primero se “optimizó” para elaborar productos parecidos al pan tradicional, pero al mínimo coste y con el máximo plazo de caducidad posible. Pero al final también se ha tenido que tener en cuenta el sabor y al textura, y hoy en día se



trabaja para la mejora de estos productos (McGee, 2007).

### **1.3 El elemento primordial del pan: Trigo**

El trigo es, desde la prehistoria, el más importante de los cereales, debido a su adaptación a todo tipo de terreno y a diferentes climas (Quaglia, 1991).

Es generalmente aceptado que los orígenes del trigo se encuentran en los valles de los ríos Tigris y Éufrates, y su cultivo con fines de alimentación probablemente data desde el año 10 000 a.C. (Atwell, William, 2001) Fue llevado a América a principios del siglo XVII y en 1855 había llegado a las grandes praderas. En comparación con otros cereales de zonas templadas, el trigo es un cultivo exigente. En las regiones cálidas y húmedas es vulnerable a las enfermedades, y crece mejor en un clima templado (McGee, 2007).

#### **1.3.1 Transformación del trigo en harina**

Las propiedades de horneado de una masa en particular dependen del trigo con el que se elabora y de cómo se haya procesado (McGee, 2007).

Así pues, los procesos modernos de molinería involucran más que un triturado de grano a polvo. Tres de las operaciones comúnmente empleadas son: limpieza, atemperado y molienda. La parte de limpieza elimina las impurezas, el atemperado facilita la separación y el triturado; y la molienda implica un pulverizado aislando sus principales componentes por diferentes tamaños clasificándolos de acuerdo a su uso (Hernández, 2009).

### **1.4 Tipos de pan**

A partir de los diferentes tipos de harina, se hace una masa para pan básica, sin embargo los panderos hacen distintas variedades modificando los cereales e ingredientes (McGee, 2007). Además este alimento recibe apelativos muy diferentes ya que presentan un amplio rango de diferencias según la forma, el tamaño, el peso, variaciones en los ingredientes, procesos de leudado (físico, químico, biológico, mixto), y también de las distintas regiones de los países en todo el mundo.

Existe infinidad de productos a base de harina de trigo. Dentro de una clasificación a groso modo, se encuentran distintos tipos, como los mencionados a continuación:



- Pan de masa madre, panes dulces, panes sin gluten.
- Panes dulces y enriquecidos: brioches, panettones,
- Panes planos: tortilla mexicana, pizza, pita.
- Panes cocidos al vapor.
- Frutos de la sartén: donuts y productos freídos.
- Productos de batidos fluidos: crepes, *hot cakes*, pasta *choux*.
- Productos de batidos espesos: panes dulces, bizcochos, *muffins*, *cakes*.
- Galletas.
- Pasta, fideos y masas hervidas: cuscús, ñoquis, fideos de harina de arroz.
- Panes precocidos: Bagels, pretzels.
- Masas laminadas: hojaldre, masa quebrada, phyllo, strudell, danés (AIB, 1994).

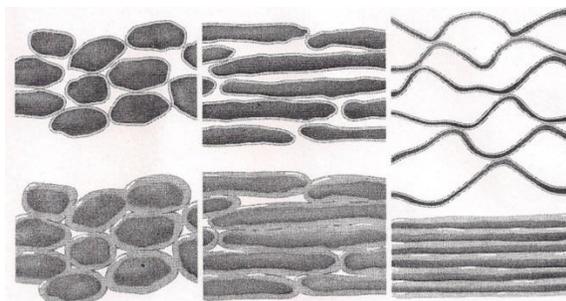
## 1.5 Masas laminadas

Las masas laminadas se caracterizan por presentar una estructura dividida en múltiples capas, mediante grasa incorporada a través de un proceso mecánico llamado laminado.

### 1.5.1 Clasificación de masas laminadas

Existen diferentes tipos de masas, cada uno de ellos con una textura diferente, caracterizadas por la forma de incorporación de la grasa.

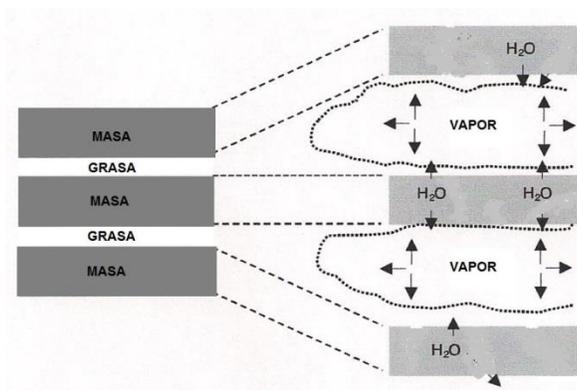
- Masas migosas: la masa quebrada (*pâte brisée*). Masas simples caracterizadas por la incorporación de la grasa mediante un proceso de encapsulación. Se forman partículas pequeñas e irregulares.
- La bollería hojaldrada (el croissant y danés) Representada por masas fermentadas y después laminadas.
- Las masas laminadas: (Hojaldre) son masas simples (harina y agua) sometidas a proceso de laminación.



**Figura 2.** Estructura de las masas. Las masas sin cocer se muestran abajo, las horneadas arriba. La clave de su estructura es la distribución de grasa, representada aquí como una capa clara que rodea la parte oscura (masa). Izquierda: Masas migosas, Centro: Bollería hojaldrada. Derecha: Masas hojaldre. Fuente McGee, 2007.

### 1.6 Pasta hojaldre

La pasta hojaldre es reconocida por su uso en una gran variedad de panes con relleno, tanto dulces como salados, se conoce también como hojaldre francés por su país de origen. Consiste en harina con suficiente agua para formar una masa de consistencia similar a la de la grasa que se utiliza en el proceso de laminado, el cual consiste en introducir grasa a la masa doblándola, a manera de que queden finísimas capas de grasa atrapadas e intercaladas entre finas láminas de masa, caracterizada por su estructura crujiente (AIB, 1994). Esta masa no contiene azúcar ni levadura o algún agente leudante en su formulación, sin embargo es capaz de crecer hasta 8 veces su tamaño original mediante el vapor generado por la humedad de la masa y la grasa atrapada en ésta durante el proceso de horneado (McGill, 1975, citado por Bousquieres, Deligny y Lucas, 2014a).



**Figura 3.** Mecanismo de aumento de volumen de la masa hojaldre durante el horneado. Fuente: Cauvain y



Young, 2000.

En el siguiente cuadro se muestra una fórmula típica de masa de hojaldre industrializada.

**Cuadro 1. Fórmula típica de masa de hojaldre industrializada.**

| Ingredientes                                    | Peso en gramos | Porcentaje panadero (%) |
|---|----------------|-------------------------|
| Harina para pan                                 | 2835           | 100.00%                 |
| Sal   | 21             | 0.75%                   |
| Margarina panadera                              | 454            | 16.00%                  |
| Huevos enteros líquidos                         | 282            | 10.00%                  |
| Agua fría (variable)                            | 1531           | 54.00%                  |
|   |                |                         |
| <b>Peso total de la masa</b>                    | <b>5125</b>    | <b>180.75%</b>          |
| <b>Grasa para laminado de la pasta hojaldre</b> | <b>2381</b>    | <b>84.00%</b>           |

Fuente: Lección trece: Pasteles daneses, hojaldres y croissants, AIB, 1994.

**Cuadro 2. Una fórmula de hojaldre tradicional francés.**

| Ingredientes  | Peso gramos    | Porcentaje panadero (%)   |
|---|----------------|---|
| Harina para pan   | 1000 g         | 100%  |
| Sal   | 15 g           | 1.5%  |
| Agua  | 650            | 65%   |
|   |                |   |
| <b>Mantequilla para llevar a cabo el proceso de laminado.</b> | <b>832.5 g</b> | <b>50% = 100% de grasa utilizado para el proceso de laminación.</b> |

Fuente: Lección trece: Pasteles daneses, hojaldres y croissants, AIB, 1994.



## 1.7 Funcionalidad de la materia prima

La calidad de un buen producto se determina por las interacciones complejas de las materias primas, sus cualidades y cantidades usadas en la fórmula y el método de proceso de la masa.

### 1.7.1 Harina

El principal producto obtenido del trigo es la harina de trigo, ésta harina es utilizada en la elaboración de pan, galletas, pastas, etc., debido a que es un cereal que permite de una manera más adecuada la formación de gluten, sustancia que posee plasticidad y elasticidad, lo que facilita darle a la pasta una forma determinada (AIB, 1994).

### 1.7.2 Composición Química de la Harina

La composición media de una harina de trigo para una tasa de extracción del 76% es la siguiente:

Cuadro 3. Composición de la harina de trigo.

| Componente                            | Porcentaje de composición |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Almidón                               | 60-72%                    |
| Humedad                               | 14-16%                    |
| Proteínas                             | 8-14%                     |
| Otros compuestos Nitrogenados         | 1-2%                      |
| Azúcares                              | 1-2%                      |
| Grasas                                | 1.2-1.4%                  |
| Minerales                             | 0.4-0.6%                  |
| Celulosa, Vitaminas, enzimas y ácidos | -                         |

Fuente: Gil, 2009.

### 1.7.3 Agua

El agua es un ingrediente esencial de la panadería. Durante el proceso de mezclado, su adición contribuye a la distribución entre los componentes de las harinas como el gluten, el almidón y las pentosas; el resto del agua adicionada se mantiene como agua libre, formando una fase acuosa. Los componentes solubles como las sales, azúcares, proteínas solubles, etc., se disuelven y las levaduras se dispersan en esta fase acuosa



(Laaksien, 2001).

La proporción estándar para obtener una masa panadera firme y capaz de airearse bien es de 65 partes en peso de agua por 100 partes de harina (40% del peso total). Menos agua, produce una masa más firme, menos extensible, y un pan más denso, mientras que más agua produce una masa blanda, menos elástica y un pan con textura más agrietada. Las masas tan fluidas que apenas se pueden trabajar – por ejemplo, la *Ciabatta* italiana, pueden contener 80 partes de agua o más por 100 partes de harina (un 45%). Las harinas con alto contenido de proteínas absorben hasta un tercio más de agua que las harinas de uso múltiple. (McGee, 2007)

Así, si se añade poca agua la masa no se desarrolla adecuadamente, lo cual da como resultado un producto duro, mientras que un exceso hace que la masa resulte pegajosa y se afloje el pan quedando aplanado. También hidrata los almidones, que junto con el gluten dan por resultado una masa plástica y elástica, de igual manera, la presencia del agua hace posible la porosidad y buen sabor del pan. Una masa con poca agua daría un producto seco y quebradizo.

Los almidones hidratados al ser horneados se hacen más digeribles. La corteza del pan más suave y crujiente por efectos del agua. La humedad del pan le da esta frescura característica, ya que la pérdida de agua lo vuelve viejo y pesado.

#### 1.7.4 Sal

La sal empleada de forma habitual es la sal de mesa (cloruro de sodio). El promedio de los panaderos emplean entre el 1% - 2% base harina en sus formulaciones. La función principal de la sal en productos fermentados es adicionar un poco de sabor. Algunas de las funciones tecnológicas de la sal son: el incremento de la estabilidad de las masas, la firmeza y la capacidad de retener la fermentación. La sal presenta un efecto muy específico en la fermentación: a una alta concentración de sal, se disminuye la velocidad de fermentación, y con los mismos niveles de levadura sucede el efecto contrario al disminuir la concentración de sal. Además, la sal presenta un efecto muy importante al reforzar las cadenas de gluten durante la fermentación (Laaksien, 2001).

Algunos panaderos también añaden cerca del 10% de huevos enteros líquidos. Los huevos producen un mejor color durante el horneado y también fortalece la estructura de



la masa, especialmente cuando se emplea con harina más débil. Estos también contribuyen con el sabor y la riqueza nutrimental del producto. Otro ingrediente usado frecuentemente es un ácido en pequeñas cantidades, ya sea en forma de crémor tártaro, ácido ascórbico o jugo de limón. Estos ácidos suavizan el gluten y facilitan el laminado de la masa durante el proceso.

### 1.7.5 Grasa

Las grasas y los aceites han sido importantes ingredientes para la panificación por siglos (Stauffer, 1999). La definición de grasa en panificación es un término que comúnmente se le da a la materia que representa la mezcla de aceites y grasas sólidas de diferentes fuentes.

Desde principios del siglo XIX, la expresión “cortar la masa” (*shorten* en inglés) se utilizaba para denominar la acción de agregar grasa o aceite a una masa para debilitar su estructura y con ello obtener un producto final más suave y laminado. Esta característica se hace más evidente en las masas base para pasteles rellenos y en los hojaldres en las que las capas de grasa separan la masa y confieren a dichos productos su textura y estructura características. Es menos evidente, pero igualmente importante para los panes enriquecidos y tartas, en los que las moléculas de grasa y aceite forman enlaces con parte de los bucles de proteína de gluten y evitan con ello que éstas formen un gluten más fuerte (McGee, 2007).

Por lo tanto, la adición de grasas confiere a la masa una estructura fina y homogénea en lo que se refiere al gluten, existiendo la posibilidad de estirla sin romperse, retiene las burbujas de gas evitando la fusión de las mismas con formación de una burbuja más grande.

### 1.7.6 Clasificación de grasas

Existe una gran variedad de aceites y grasas usadas en la industria de la panificación, las cuales ofrecen diferentes cualidades según su aplicación, las propiedades funcionales que se deben tener en cuenta al seleccionar una grasa para un uso específico son: punto de fusión, suavidad o dureza a diferentes temperaturas, sabor y habilidad para formar emulsiones.



- Mantequilla (grasa láctea)

La mantequilla se obtiene mediante el batido y amasado de la nata de la leche. Es una grasa que se obtiene transformando una emulsión de grasa en agua (leche) en una emulsión de agua en grasa (mantequilla). Esto quiere decir que contiene finas gotitas de agua dispersas homogéneamente en su estructura. Esto se comprueba cuando en una sartén se funde un trozo de mantequilla, se producen pequeñas burbujas debidas al agua que se evapora con el calor. Contiene un 15-20% de agua y un 80-85% de grasas.

También se distinguen las mantequillas en función de su proceso de elaboración y su composición: mantequilla batida, mantequilla light o baja en calorías y mantequilla con ingredientes no lácteos (ajos, hierbas aromática). Además si se añade sal en su proceso de elaboración, tenemos la mantequilla salada, o con azúcar la mantequilla dulce (Lai, 2006).

- Margarina

Producto elaborado por la emulsión estabilizada de grasas y aceites vegetales o animales comestibles modificados o sin modificar por hidrogenación, fraccionación o interesterificación, incorporados de agua y adicionados o no de leche, sólidos de leche, ingredientes opcionales y aditivos alimentarios permitidos. El contenido de grasa debe ser mínimo de 60% (NMX-F-016-SCFI-2007).

- Shortening (manteca vegetal)

Es un término empleado para definir la función de una grasa sólida para hacer un efecto de acortamiento o ablandamiento en productos de panificación, después la palabra shortening se utilizó para nombrar un grupo de grasas solidas usualmente blancas e insípidas (mantecas) que han sido especialmente formuladas para panificación. Estas grasas plásticas generalmente consisten de casi 100% de grasa; sin embargo existen excepciones tales como grasas para rollos de pan que contienen humedad. Estas grasas pueden elaborarse con aceites vegetales, grasas animales o ambas, durante su elaboración las grasas son hidrogenadas, debido a que se utilizan en diversos propósitos.



Estas pueden clasificarse en diversas categorías, de acuerdo con la fuente u origen del cuál provienen y el tipo de procesamiento, lo que es un indicador de las características que las hacen apropiadas para aplicaciones específicas. Parte de estas clasificaciones figuran en el siguiente cuadro.

**Cuadro 4. Grasas usadas en panificación**

| Grasa                        | Uso en panificación   |
|------------------------------|---|
| Manteca de cerdo             | Algunos panes tradicionales   |
| Manteca hidrogenada(vegetal) | Hojaldres, pan enriquecido.   |
| Margarina                    | De mesa, y grado panadero, panes refinados, masas laminadas, danés, pasta hojaldre.<br>Repostería y bollería enriquecida. |
| Manteca líquida              | Freír frutos de la sartén, glaseados  |
| Manteca emulsificada         | Pastas dulces, rellenos de galletas.  |
| Mantequilla                  | Panes especiales, pastelería árabe, panes refinados, repostería.  |
| Aceites vegetales            | Freír masas y donas, uso en algunos panes y pasteles.   |

Fuente: Stauffer., 1999.

### 1.7.7 Funcionalidad de las grasas en los productos de panificación

Las grasas juegan un importante papel en el proceso eficiente de muchos productos de panificación. Las contribuciones que las grasas hacen a la calidad final del producto son: suavidad, humedad en la boca, sabor, color y estructura al pan. Además las grasas influyen los pasos del proceso de muchos productos, por ejemplo, la incorporación de aire da volumen a muchos productos; lubricación, y transferencia de calor durante el proceso de horneado (Stauffer, 1999).

Por otro lado, las masas hojaldradas aumentan su volumen en el horneado solamente con el vapor generado por la humedad atrapada en la grasa derretida entre las capas de masa, este vapor se expande y causa una separación física de las capas de masa, inflando el producto.

Esto requiere un proceso de laminado muy cuidadoso. A mayor número de capas de masa y grasa que se puedan crear, mayor será la expansión del hojaldre. Cuando las



capas de grasa son muy gruesas, la grasa se sale de la masa y el vapor puede escaparse. Por otro lado, cuando las capas de grasa son muy delgadas pueden ser fácilmente absorbidas por la siguiente capa de masa, fusionándose y formando una estructura celular, en lugar de una estructura escamosa o de hojuelas.

### **1.7.8 Materia grasa en el proceso de laminado**

La margarina o manteca que se llega a mezclar en la masa, generalmente no es del mismo tipo que la grasa para el proceso de laminado. La grasa de la masa es usualmente una margarina panadera o una manteca para todo uso. Ambas son considerablemente suaves a la temperatura ambiente y la margarina panadera tiene mayor contenido de humedad y de sal, que la manteca o margarina para laminar hojaldres.

Las mantecas para hojaldres contienen hasta un 12% de agua, aproximadamente 1.5% de sal debe ser capaz de mantenerse como una capa continua o película cuando la masa se lamina (AIB, 1994).

### **1.8 Proceso de elaboración de la pasta hojaldre**

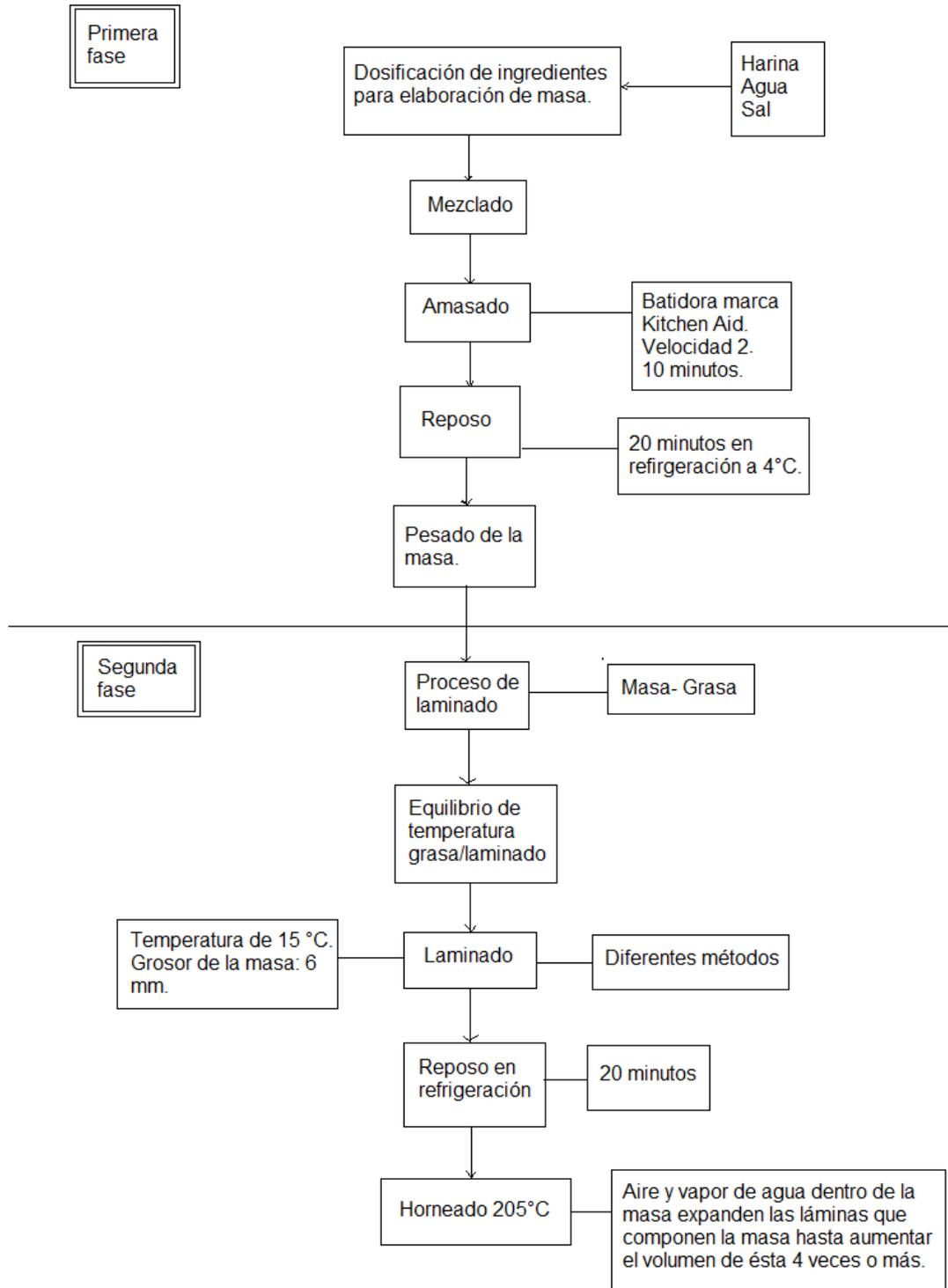
El objetivo del proceso de laminado es crear un gran número de capas de masa separadas. Para evitar la unión de estas capas de masa se coloca grasa entre ellas. A mayor número de capas individuales que se puedan crear, más hojuelas tendrá el pastel.

Recientemente, se ha desarrollado una nueva tecnología que permite la producción continua de masas laminadas para hojaldres franceses y pasteles daneses, con equipos completamente automatizados. Para este tipo de producción masiva de pasteles, la masa y la grasa para el laminado son coextruidos. Luego del extendido y laminado inicial, las dos capas de masa separadas por la grasa, se laminan para formar un gran número de capas de masa y grasa, las cuales se reducen finalmente al grosor apropiado por medio de varios rodillos reductores, que tienden a estirar la masa laminada cuidadosamente (AIB, 1994).

A pesar de que los panaderos mayoristas producen una gran cantidad de pasteles con la nueva tecnología, muchas panaderías minoristas aún utilizan el método tradicional para preparar las masas de hojaldres laminadas. Este proceso consiste en dos fases: elaboración de la masa y laminado de la masa – grasa (figura 4).



### Proceso de elaboración de masa hojaldre



**Figura 4.** Diagrama de flujo de la elaboración de la pasta hojaldre. Fuente: AIB, 1994.

## 1.9 Métodos de laminado de la pasta hojaldre

El método de laminación se divide en dos etapas: la primera consiste en llevar a cabo la incorporación de la grasa en la masa y la segunda en el proceso de laminado.

Existen diferentes métodos para incorporar la grasa en la masa, los cuales son descritos a continuación (AIB, 1994).

### 1.9.1 Método francés o “tradicional”

Es un método muy popular introducido por panaderos franceses. Aquí, la masa se moldea en un cuadrado de un grosor uniforme. La grasa de laminado se esparce (trozos) sobre un área cuadrada en el centro de la masa, en donde sus esquinas están en el punto medio de cada lado del pedazo de la masa. Las esquinas del pedazo de la masa no cubiertas se doblan hacia el centro, traslapando ligeramente. La masa forma un “sobre” con la grasa de laminado adentro. Este “sobre” se alarga luego laminándolo con un rodillo. Se le dan los primeros tres dobleces (media vuelta) para formar cuatro capas de masa separadas por tres capas de grasa, se debe dejar reposar en refrigeración por 20 minutos y darle dos medias vueltas más (ver figura. 5).

Existen dos formas comunes de doblar los pedazos de masa. La primera forma son los tres dobleces o “media vuelta”, mencionados anteriormente. La segunda forma son los cuatro dobleces, que también se conoce como “vuelta completa” o doblez tipo “libro”. Aquí, el pedazo de masa se lamina ligeramente más largo que para los tres dobleces. Luego ambos extremos de juntan ligeramente en el centro.

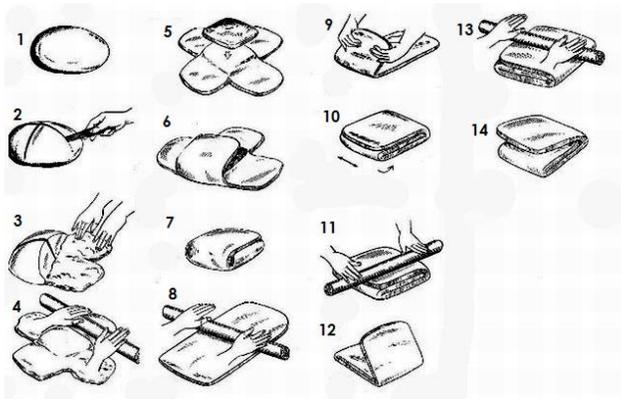


Figura 5. Método laminado francés (AIB, 1994).



### 1.9.2 Método inglés

Aquí la masa se divide en pedazos del mismo peso. Estos pedazos de masa se laminan con un rodillo para obtener el mismo grosor y el tamaño. La grasa de laminado se dispersa luego uniformemente (en trozos) sobre dos tercios de esta área. El tercio restante se dobla hacia dentro, seguido de la parte que ha sido cubierta por la grasa, se han formado ahora tres capas de masa separadas por dos capas de grasa. El pedazo de masa se dobla luego en 90° y se lamina hasta un grosor uniforme con esquinas en escuadra, luego de eliminar el exceso de harina espolvoreada, los dos extremos de la lámina de masa se doblan nuevamente hacia el centro, de tal manera que el pedazo de masa final de masa consista de siete capas de masa separadas por seis capas de grasa. Estos primeros tres dobleces son llamados también “media vuelta” por los panaderos ingleses.

### 1.9.3 Método escocés

El método escocés sólo puede usarse con las grasas más firmes de laminado, empleadas de los hojaldres. Este requiere la división de la grasa en cubos de aproximadamente de 5 cm. Estos se añaden a la harina y se mezclan ligeramente antes que el agua se añada, tal como en las masas para pays. Después que se añade el líquido, hasta formar una masa coherente. Luego de diez minutos de reposo para permitir que la harina se hidrate, la masa está lista para extenderse y laminarse. Para que este método dé los resultados deseados, la grasa debe permanecer en trozos grandes. Es necesaria la experiencia en este método (AIB, 1994).

### 1.9.4 Método “relámpago”

Una variación del método escocés es el método “relámpago” (también conocido como “*flaky pastry*” en Inglaterra, hojaldre “*americano*”, “*blitz*” o “*demi-feuilleté*” en Francia). El éxito de este método, así como del escocés, depende enteramente de la habilidad del panadero y el acondicionamiento de la grasa de laminado.

Este método requiere una masa completamente desarrollada, a la cual se le añade rápidamente para el laminado en trozos pequeños la grasa, mientras que la batidora trabaja a baja velocidad. Este método se debe realizar rápidamente, porque la masa se puede sobre mezclar fácilmente y la grasa se incorpora luego dentro de la masa (McGee,



2007).

### 1.10 Número de láminas de la pasta hojaldre

El número de dobleces durante el laminado es determinado por quien elabora la masa, y depende de la experiencia y el resultado que desee obtener. En primera instancia son obtenidas 5 láminas durante la incorporación de la grasa: 3 de masa y 2 de grasa. Más tarde se llevan a cabo los dobleces deseados, entre más dobleces más láminas de masa, ya que éstas se multiplican por el tipo de dobles que se dé. Si la masa se dobla en 3, será: 5 (láminas) x 3 (dobles) = 15, y así sucesivamente (por ejemplo: 3 x 5= 15, 15 x 3= 45, 45 x 3= 135) (Massi, 2007).

Las masas para hojaldres preparadas con harina fuerte (alto contenido de proteínas) y margarina de alta calidad para hojaldres, pueden recibir hasta cinco dobleces tipo libro (la masa es doblada en 4, 5 veces) después de haberse incorporado la grasa. Esto produce 2,048 capas de grasa. Sin embargo, la mayoría de los panaderos, por una razón u otra, no laminan tanto.

Cuatro dobleces tipo libro (512 capas de grasa) son comúnmente dados por los panaderos minoristas, obteniendo buenos resultados. Sin embargo, los panaderos europeos, quienes deben trabajar con harinas con menor contenido de proteína, pueden limitar sus dobleces a dos medias vueltas, más dos vueltas completas (288 capas de grasa). También los panaderos que reducen la cantidad de grasa para el laminado, para producir la mitad o tres cuartos de pasta, no pueden doblar sus masas tan frecuentemente sin arriesgar la pérdida de expansión (AIB, 1994).

#### 1.10.1 Consideraciones en el uso de la pasta hojaldre

Aunque los negocios grandes de producción automatizada procesan las masas hojaldre en forma continua con equipos especialmente diseñados para extender y laminar, la mayoría de los negocios pequeños laminan la grasa y la masa un día, y elaboran los pasteles al día siguiente, después que la masa ha sido refrigerada durante la noche. Algunos panaderos inclusive dan el último doblado al día siguiente.

Después que la masa se ha refrigerado por varias horas, estará muy fría y su grasa será quebradiza y resistente al laminado. Esta condición requiere la aplicación de mucha



presión por los rodillos de laminado, lo cual puede resultar en la ruptura de las capas de grasa y en la fusión de las capas adyacentes de masa. Esto, a su vez, puede ocasionar una pérdida en el leudado de la masa durante el horneado, reduciendo posiblemente su textura escamosa.

Para evitar este problema, la masa fría debe temperarse a más de 60° F (15.6°C), punto en el cual la grasa recupera su plasticidad.

Una masa debe tener reposo suficiente. Una masa que no ha reposado lo suficiente, tenderá a encogerse durante el cortado o horneado y el pastel será deforme.

Un cuchillo sin filo tiende a sellar los bordes de las capas individuales de masa y lo cual inhibirá su separación durante el proceso de expansión en el horno. Lo que lleva a pasteles deformados y con mala apariencia.

Una temperatura alta del horno no solamente es necesaria para que la masa desarrolle un atractivo color marrón dorado, sino que también es necesaria para la generación rápida de vapor para la acción de leudado. Los pasteles pequeños y sin rellenos se hornean generalmente a 400- 420°F (205°C- 215°C) por 20 minutos. Los pasteles más grandes y con rellenos se hornean a menudo a 380°F (193.3°C), de modo que el relleno alcanza una temperatura mínima de 180°F (82°C) sin la generación de demasiado vapor, lo cual podría producir la explosión del pastel y la filtración del relleno.

Para prevenir que los pasteles franceses pierdan su textura crocante y suavidad rápidamente después del horneado, no deben rellenarse con mermeladas o cremas que tienen un alto porcentaje de agua (actividad de agua (Aw)). La migración de la humedad del relleno hacia la masa del pastel, causa la hidratación y el endurecimiento de la proteína de la masa; en consecuencia, su consumo será menos agradable.

Los mejores rellenos para pasteles franceses se formulan con un bajo porcentaje de agua. Esto se puede lograr empleando la menor cantidad de agua posible y la mayor cantidad de azúcar posible en el relleno. Los rellenos con frutas, bien estabilizados, se inyectan mejor en los pasteles horneados que en los pasteles sin hornear. Sin embargo, la fruta estabilizada puede emplearse para decorados, donde la humedad puede evaporarse fácilmente durante el horneado. Una excepción en esta generalización, es el empleo de manzanas parcialmente deshidratadas (con 24% a 26% de humedad) junto



con las pasas sin remojar, las que absorben algo del vapor generado por el relleno durante el horneado.

Los hojaldres pueden o no bañarse con huevo antes de hornearse. Para obtener mejores resultados, se puede añadir hasta dos partes de leche líquida descremada a los huevos enteros líquidos, junto con una pequeña cantidad de sal que ayuda a dispersar la proteína del huevo. El azúcar de la leche y la proteína del huevo reaccionan durante el horneado para formar la corteza color marrón dorado deseable en el pastel (Reacción de Maillard).

A partir de conocer el proceso de elaboración de la masa hojaldre, se establecerán como parte de la metodología mostrada en la figura 5, y el método de laminado (francés o tradicional), el uso de los procesos de conservación como lo es la congelación y la adición de avena y otros elementos para llevar a cabo una mejora dentro de la masa hojaldre (AIB, 1994).

### **1.11 Tendencias actuales en panificación**

Hoy en día, la modernización en procesos relacionados con esta área, es el resultado de investigaciones realizadas en los últimos 60 años, marcados fuertemente por las tendencias del momento (Martínez, 2006). Recientemente, la tendencia ha sido emplear menos aditivos químicos o aditivos funcionales, ya que los consumidores cada vez buscan más productos saludables (Roepcke y Toledo, 2013) mientras que la industria busca adicionalmente incrementar la vida útil del producto y su disponibilidad para el consumidor sin afectar la calidad del pan.

La adición de enzimas en productos de panificación ha sido estudiada como una alternativa para modificar la funcionalidad de las harinas y mejorar sus características panaderas (Sciarini, 2012).

### **1.12 Tecnología enzimática**

Las enzimas naturales se han utilizado desde tiempos antiguos en la producción de alimentos. Éstas se encuentran presentes en todos los seres vivos y son esenciales en el funcionamiento de nuestro cuerpo (Kirk, Borchert y Fuglsang, 2002) al ser catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos, destacando como principales características su alta especificidad, adaptabilidad y elevada velocidad de reacción



(Piñeiro, 2009).

En la industria, las enzimas se utilizan principalmente como sustitutos de diversas sustancias químicas, debido a que actúan como catalizadores que promueven ciertas reacciones secundarias, forman residuos y permiten conservar ciertos atributos deseables del alimento y sus componentes (Roepcke y Toledo, 2013). Su uso y aplicación se ha extendido a diversos productos y procesos (Cortes, 2004), como el tratamiento de harinas, elaboración e incremento de la vida de anaquel del pan (Tejero, 2009).

Sin el poder catalítico de una enzima todas las reacciones químicas dentro del cuerpo ocurrirían tan lento que la vida no sería posible (Lehninger, 2009). Las enzimas son los catalizadores biológicos de mayor especialización, es decir que acelera un proceso específico dentro de una reacción química.

### 1.13 Enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como biocatalizadores, es decir, se tratan de compuestos naturales de todos los organismos vivos poseen. La vida no es posible sin enzimas ya que muy pequeñas cantidades son capaces de acelerar y multiplicar reacciones químicas específicas.

Las enzimas participan de manera importante en la conversión del alimento en la boca, en el estómago y en el intestino. En la naturaleza hay una gran variedad de diferentes enzimas, cada una con su misión específica.

En la industria alimentaria en general se utilizan más de centenar de enzimas con diferentes y variados efectos. El concepto de enzima se ha ido extendiendo, relacionándolo desde la biotecnología a procesos industriales (detergentes, productos lácteos, zumos de fruta, tratamientos de residuos, procesos textiles y, por supuesto, con el tratamiento de la harina y en los procesos de fabricación del pan).

La tecnología enzimática consiste en encontrar enzimas con características específicas, para aislarlas y producirlas económicamente y utilizarlas con la mayor ventaja. Desde siempre el hombre ha usado enzimas, sin un conocimiento exacto de qué eran y cómo actuaban. La industria produce las enzimas como lo hace la naturaleza. Todos los hongos, levaduras y bacterias contienen gran cantidad de enzimas. Se obtienen por ejemplo a partir de hongos que se pueden encontrar en la naturaleza o de bacterias (*Bacillus subtilis*). Las enzimas, por lo tanto, no son microorganismos, sino que proceden



de aquellos. Las cepas seleccionadas son cultivadas en condiciones controladas o bien en medios de cultivo de gran superficie, incluso en tanques de fermentación. Después de una profunda purificación y tratamiento se mantienen en forma líquida, o bien se liofilizan en el caso de que vayan a ser utilizadas en el tratamiento de la harina o para los mejorantes en polvo para panificación (Tejero, 2009).

#### **1.14 Evolución de las enzimas en la panadería**

El comienzo del uso de las enzimas en la molinería y panadería es a partir del el año 1850, cuando a los panaderos y molineros les va llegando información de que la harina de malta daba color al pan. Entonces la miga era más húmeda y se conservaba más tiempo por lo que la alfa amilasa de la malta de la cebada aumentaba la fermentación con la generación de azúcares fermentables (maltosa) a partir del almidón. Más tarde se descubrió que la enzima activa de la soja blanqueaba la miga y mejoraba la firmeza del gluten a través de la acción de la lipoxigenasa.

Un siglo después se descubre que los hongos y bacterias son fuentes de enzimas alimenticias. La amilasa fúngica se empieza a utilizar remplazando a la harina de malta ya que en ella no era controlable su actividad y porque la harina no siempre tiene el mismo contenido enzimático, ya que esto depende de la humedad del trigo. El principal avance con la utilización de la amilasa fúngica fue la facilidad de regulación de la dosificación de la enzima y de la temperatura: las de la harina de malta prolongan su efectividad en el horno hasta que en el interior de la miga se alcanzan los 75° C, mientras que con tras el nuevo descubrimiento de la amilasas fúngicas se comprueba que su actividad se corta a los 60° C.

La amilasa bacteriana que empezó a utilizarse en las masas fermentadas mostró que la miga era aún más húmeda y que conservaba más tiempo el pan fresco, pero una sobre dosificación de amilasa bacteriana producía una miga excesivamente húmeda, lo que ya no era deseable.

Las proteasas de las plantas (bromelina, papaína, etc.) y las fuentes microbianas aparecen en el mercado de la panadería y se usaban para modificar las propiedades del gluten en ciertas aplicaciones, las cuales en la actualidad se utilizan en la fabricación de galletas y otras aplicaciones como cuando se quiere romper el gluten para que sea más manejable (Tejero, 2009).



Los cereales contienen una serie de enzimas naturales como son las amilasas, proteasas, hemicelulasas y lipasas. Tanto los contenidos en la harina como los adicionados en el molino o en la panadería, actúan en las diferentes partes del proceso de panificación. Su presencia en cantidades superiores o inferiores a las necesarias afectará a la calidad del producto final, tanto a su volumen y aspecto, como a su conservación.

La concentración natural de estas enzimas en los cereales panificables depende en gran medida de las condiciones climatológicas durante las últimas fases del cultivo del trigo. Si madurado el grano, éste estuvo expuesto a un ambiente húmedo, se producirá su germinación. Si por el contrario, la maduración y recolección del trigo se realizó en clima seco, el contenido de enzimas podría llegar a ser insuficiente. Por esta razón y para resolver esta insuficiencia enzimática es necesario añadirlas a la harina o a la masa.

Actualmente, la mayor parte de las enzimas producidas industrialmente para su utilización en los procesos de panificación se producen mediante fermentaciones de microorganismos seleccionados. Antes, la falta de amilasas se corregía habitualmente mediante la adición de malta, que no es más que el producto de la germinación controlada del trigo o de la cebada, según su destino para la fabricación de pan o cerveza, respectivamente (Tejero, 2009).

### **1.15 Las enzimas en los nuevos procesos de panificación**

En panificación para que las enzimas generen su actuación necesitan que la harina esté hidratada. Comienzan a actuar durante el amasado, facilitando el trabajo, regulando la absorción del agua y asegurando la obtención de una masa más fina, extensible y la puesta a punto para su mecanización.

Es durante la fermentación de la masa cuando la acción enzimática resulta más notable, proporcionando alimento a la levadura para que gasifique y levante la masa.

En la cocción, y hasta el momento en que por las altas temperaturas se desactivan, las enzimas actúan a una mayor velocidad de transformación.

Será durante esta fase de cocción cuando se fija el volumen, la greña, el color de conservación, el alveolado de la miga y la blancura de la misma.

Los efectos que se pueden obtener en la masa por la aplicación de las enzimas son los siguientes:

- Reducir el tiempo de amasado.
- Generar azúcares para la fermentación.



- Aumentar o disminuir la extensibilidad de la masa por las oxidasas o proteasas.
- Aumentar la fuerza de la masa.
- Ajustar el equilibrio de la masa.
- Reducir la viscosidad de la masa.
- Mejorar la conservación.

Las enzimas son capaces de regular las características de una harina teniendo en cuenta la aplicación para las que van a ser destinadas.

### 1.15.1 Factores que influyen en la acción de las enzimas

La cantidad de una enzima añadida a la harina reaccionará de forma distinta dependiendo de varios factores. Este hecho va a generar dudas al panadero, porque el comportamiento de las masas será muy distinto dependiendo de la cantidad de mejorante añadido, ya que es en este donde normalmente el panadero adiciona las enzimas a su pan; a través de un conjunto enzimático, que incorpora generalmente también ácido ascórbico y algún tipo de emulsionante. Por ello, otros factores como la acidez de las masas madres, la temperatura de la masa y de la fermentación, así como la temperatura del horno, tendrán una repercusión de reacciones bien distintas cuando estos parámetros cambien.

Casi todas las reacciones químicas de las células son canalizadas por enzimas, con la particularidad de que cada enzima sólo cataliza una reacción, por lo que existen tantas enzimas como reacciones (Tejero, 2009).

### 1.15.2 Sustratos disponibles en la harina.

La actividad de una enzima responde a la concentración del complejo enzima-sustrato. Es muy importante que la cantidad de sustrato y enzima estén relacionados. Cuando éste es limitado la acción de la enzima es lenta y limitada la reacción, y cuando la cantidad de sustrato sea elevada la reacción será rápida y efectiva (Tejero, 2009).

En una reacción catalizada por la enzima (E), los reactivos se denominan sustratos (S), es decir, la sustancia sobre la que actúa la enzima. El sustrato es modificado químicamente y se convierte en uno o más productos (P) (Tejero, 2009).



### 1.15.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas y enzimáticas: por cada 10° C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general.

Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

Las enzimas que se utilizan en la panadería comienzan su actividad desde que sea añada agua en el amasado y terminan en el horno, si por ejemplo la masa sale de la amasadora por debajo de 25°C su actividad es bien diferente a si la masa queda caliente, otro ejemplo es cuando la masa se fermenta a altas temperaturas; si por el contrario es muy fría o también si la temperatura inicial del horno es baja o al contrario muy alta, se va a prolongar o reducir la actividad de las enzimas.

Normalmente las enzimas que se utilizan en la harina y las que el panadero aporta a través del mejorante se desnaturalizan y se desactivan en entre los 60-70° C.

También las enzimas añadidas a las masas de fermentación controlada, aún con actividad reducida debido a la baja temperatura, siguen activas, y tendrán tal repercusión que si bien se paraliza la actividad fermentativa de la levadura, prosigue lentamente la degradación del gluten y del almidón. La repercusión es que a mayor tiempo de fermentación baja la fuerza de la masa y el colorido y la cristalización del pan una vez cocido aumenta (Tejero, 2009).

### 1.15.4 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

El pH es una medida de la acidez relativa de la masa. La acidez en la que la actividad de las enzimas es óptima, en procesos con fermentaciones cortas, se obtiene difícilmente cuando no se añade una porción de masa madre. Los aminoácidos que forman las proteínas pueden estar cargados positivamente o negativamente dependiendo del pH de la masa. A pH neutro (pH=7), la mayor parte de las proteínas tienen en ambos signos positivo y negativo cargas disponibles a lo largo la cadena de aminoácido. Cargas opuestas se atraen y cargas iguales se repelen. Ésta fuerza de atracción/repulsión juega



un papel importante en el sostén de toda la estructura de tridimensional de la proteína, la cual es importante para su funcionalidad. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Éste es el llamado pH óptimo.

La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad (Tejero, 2009).

### 1.15.5 Grupos de enzimas y sus acciones en panificación

En el cuadro 5, se pueden observar los diversos grupos de enzimas, clasificados según el sustrato que utilizan para trabajar, así como las acciones que éstas ejercen en los productos de panificación.

**Cuadro 5. Grupos de enzimas: sustrato que utilizan para trabajar, así como las acciones que éstas ejercen en los productos de panificación.**

| Componentes de la harina | Tipo de enzima   | Reacciones catalizadoras  | Mejora  |
|--------------------------|--|---|---|
| <b>Almidón</b>           | Amilasas de la harina de malta<br>Amilasa bacteriana                               | Desintegración del almidón en:<br>Azúcares<br>Dextrinas<br>Maltosas | Características de la masa:<br>Volumen<br>Alveolado<br>Color de la corteza<br>Equilibrio enzimático de la harina.<br>Acelera la fermentación. |
|                          | Amilasas fúngicas<br>Amilasa<br>Arpesguillus oryzae<br>Almidón -> maltosa+dextrina | Maltosa + dextrina  |   |
|                          | Amilasa del Bacillus amyloliquefaciens<br>Almidón -> dextrinas                     | Dextrina  |   |
|                          | Amiloglucosidasa del Asperguillus niger<br>Almidón -> glucosa                      | Glucosa   |   |
|                          | Amilasa maltogénica del Bacillus amyloliquefaciens<br>Almidón -> maltosa           | Maltosa   |   |



|                            |  |  |   |
|----------------------------|--|--|---|
| <b>Otros polisacáridos</b> | Pentosanas   | Desintegración de pentosanas   | Como consecuencia, se produce una mayor retención de gas y un mayor impulso en el horno debido al retraso en la formación de la miga. |
|                            | Hemicelulasas  | Desintegración de hemicelulasas, Estabilidad de fermentación               | Volumen Conservación  |
|                            | Xilanasas  | Actúa sobre la fracción soluble rompiendo la unión con el gluten           | Aumento de volumen y tolerancia en la fermentación  |
|                            | Proteasas fúngicas, oxidasas (Gox y Sox), Reductasa                | Aflojan la estructura del gluten   | Características de la masa: ablandamiento de la estructura del gluten.  |
| <b>Proteínas</b>           | Proteasas bacterianas  | Acortan las cadenas proteicas hasta la eliminación del gluten.             | Galetas, craker.  |
| <b>Lípidos</b>             | Lipoxigenasas (mediante harina de soja son desgrasar y sin tostar) | Oxidación de carotenoides  | Blanqueado de la miga Mejora del gluten   |
|                            | Lipasas  | Liberan amulgentes a partir de la grasa contenida en la harina (peróxidos) | Aumento de la extensibilidad Conservación del pan Reduce uso de emulgentes  |

Fuente: Tejero, 2011

### 1.15.6 Hidrolasas

Las hidrolasas constituyen un gran grupo de enzimas (Whitaker, 1994) el cual ha sido uno de los más estudiados e importantes en los campos tanto industriales y biotecnológicos, debido a su uso ha permitido el poder reemplazar la hidrólisis química por la enzimática del almidón, el polisacárido más utilizado en la industria biotecnológica a nivel mundial (Bedón G. M., Nolasco C. O., Santa Cruz C. C., Gutiérrez R. A., 2013).

Las hidrolasas así como otras enzimas tienen una actividad máxima sólo dentro de parámetros experimentales muy específicos, incluyendo tiempo de reacción, temperatura, pH, naturaleza y concentración de sustrato, naturaleza y concentración de buffer, y pureza de la preparación enzimática, entre otros (Whitaker, 1994). Muchas enzimas degradadoras de almidón son comúnmente analizadas mediante la cuantificación de la cantidad de azúcares reductores (AR) liberados al final de un periodo de incubación en orden de dar una mejor aplicación y optimizar procesos (S. B. Kevser, Tütem E., Akyüz E., Özen S., Apak R., 2016).



## Amilasas

Las amilasas pertenecen al grupo de las hidrolasas y son esenciales en la producción de alimentos, gasolinas, medicamentos, y detergentes entre otras cosas, con la finalidad de optimizar procesos, “limpiar etiquetas” de aditivos químicos y para ser amigables con el ambiente. (Bedón et al., 2013)

En la industria alimentaria,  $\alpha$ -amilasas son ampliamente utilizadas en diversas áreas como lo es en la producción de cerveza, bebidas destiladas, jarabes, jugos, pasteles y productos panificados, entre otros ejemplos. (A. Sánchez, O. Palacios, S. Batista, Z. Díaz, N.P. Guerra, 2016). Esta industria invierte grandes cantidades de dinero cada año en la producción de alimentos de “etiqueta limpia” debido a las demandas de los consumidores actuales, quienes demandan cada vez más mejores alimentos y libres de aditivos químicos que podrían afectar su salud. (Sánchez et al., 2016).

Las  $\alpha$ -amilasas pueden obtenerse a partir de cereales, hongos (fúngicas) o bacterias.

- **La  $\alpha$ -amilasa de origen cereal (harina de malta).**

Su elaboración consiste en la germinación del trigo o para que se movilicen las  $\alpha$ -amilasas naturales del grano. Hasta la década pasada los mejorantes completos de panificación se formulaban con este tipo de amilasas.

Estas amilasas se inactivan a 75° C, por lo que en una harina con elevada actividad enzimática o en el caso de una sobre dosificación dará mayor estabilidad al calor, lo que podrá ocasionar los mismos problemas que las harinas procedentes de trigo germinado.

- **La  $\alpha$ -amilasa bacteriana.**

Se produce a partir de la bacteria *Bacillus subtilis* y es muy resistente al calor por lo que a temperaturas de 70 a 90° C alcanza su máxima velocidad de reacción. El efecto secundario típico de la amilasa bacteriana es una disminución de la viscosidad del engrudo del almidón.

- **La  $\alpha$ -amilasa de origen fúngico.**



Se produce por fermentación de una cepa de hongo *Aspergillus niger*, y es la más utilizada en la fabricación del pan, como alternativa a la harina de malta. Ello es debido al hecho, entre otros, de que la  $\alpha$ -amilasa fúngica tiene una mayor tolerancia a la sobre dosificación que la de origen cereal, lo que se basa en su desactivación durante la primera fase de la cocción (60-65° C); con ella que no existe el riesgo de que se produzca exceso de dextrinas, lo cual produciría migas pegajosas.

Las amilasas, como todas las enzimas, se inactivan con el incremento de temperatura que se produce al entrar al horno: son proteínas y, por tanto, termolábiles. Las amilasas fúngicas se inactivan a temperaturas en torno a los 60° C, mientras que las naturales del trigo lo hacen por encima de los 75° C.

No sólo la temperatura es condicionante del funcionamiento de las enzimas. También lo es el pH del medio. La acidez en la que la actividad de las enzimas es óptima, en procesos con fermentaciones cortas, se obtiene difícilmente cuando no se añade una porción de masa madre. La capacidad de producción de gas es uno de los parámetros importantes a controlar en las harinas. Depende, por una parte, de los azúcares libres presentes en la harina, que son los inicialmente atacados por la levadura al comienzo de la fermentación de la masa y agotados rápidamente. La continuidad de la fermentación viene asegurada por la obtención de azúcares fermentables a partir del almidón de la harina. El almidón está formado por largas cadenas construidas mediante la unión de múltiples moléculas de glucosa (Tejero, 2009).

El almidón está formado principalmente por dos componentes: cadenas rectas de azúcares simples (amilosa) y de cadenas muy ramificadas (amilopectina). Físicamente se agrupan estas cadenas, formando unas estructuras peculiares llamadas gránulos.

Durante la molienda, parte de los gránulos sufren fisuras y roturas, quedando expuestos a la hidratación masiva así como al ataque progresivo de las amilasas.

La  $\alpha$ -amilasa corta las cadenas en unidades menores, denominadas dextrinas, mientras que la  $\beta$ -amilasa va separando de las dextrinas unidades de maltosa. Este azúcar, formado por la unión de dos moléculas de glucosa, es ya asimilable por la levadura. Pese a todo, el contenido de  $\alpha$ -amilasa no es suficiente para alcanzar el ritmo de fermentación requerido en los procesos actuales. Por eso es imprescindible corregir el contenido enzimático añadiendo un mejorante.

De acuerdo a Parker y Ring (2001) durante el proceso de gelatinización, las moléculas de almidón vibran rompiendo los puentes de hidrógeno intermoleculares de las zonas



amorphas de los gránulos, lo que provoca el hinchamiento por una absorción progresiva e irreversible de agua que finalmente se liga a la estructura, si no se logra una buena hidratación de los gránulos de almidón que es donde comienza el proceso de gelatinización, no se va a tener una masa maleable y suave para poder después empastarla.

Una vez que es agregada la enzima  $\alpha$ -amilasa, se cataliza la adición de una molécula de agua a cada enlace glicosídico, rompiendo así las cadenas de amilosa y amilopectina (García, 1964). Siendo así el efecto principal de las amilasas sobre la masa el aumento de la velocidad de fermentación, facilitada por la mayor producción de gas y por el ligero reblandecimiento de la masa producido por la liberación del agua absorbida por los gránulos de almidón atacados. Una dosificación excesiva de amilasas se traduce en masas pegajosas de difícil manipulación (Tejero, 2009).

Al entrar la masa en el horno, y hasta la inactivación de las enzimas, se produce una aceleración violenta de las diferentes reacciones implicadas en la fermentación, aumentando la producción de gas, dilatándose éste y evaporándose el alcohol y parte del agua de la masa. La gelatinización del almidón, mucho más sensible en ese estado al ataque enzimático, contribuye también. Las dextrinas no consumidas mantendrán a la miga más humectada, pero también determinará la coloración de la corteza (Tejero, 2009).

### **Amiloglucosidasa.**

También denominada glucoamilasa, se obtiene también de un hongo. Actúa sobre las dextrinas produciendo glucosa, lo que se traduce en una aceleración de la fermentación. Se utiliza en procesos rápidos de panificación donde se desea que la masa fermente rápidamente, esto ocurre al liberar glucosas para que la levadura pueda producir el gas desde el inicio de la fermentación (Tejero, 2009).

### **Pentosanasas**

Estas enzimas actúan sobre las pentosanas, que son unos polisacáridos distintos al almidón. Esta reacción de hidrólisis aumenta la absorción de agua en la masa, aumentando la tenacidad y disminuyendo ligeramente la extensibilidad. Como consecuencia, se produce una mayor retención de gas y un mayor impulso en el horno



debido al retraso en la formación de la miga.

Los preparados enzimáticos de pentosanases se añaden con el propósito de frenar el envejecimiento rápido del pan. Se ha podido observar que retardan la velocidad de retrogradación del almidón.

Al mismo tiempo, dichas enzimas retienen agua durante la cocción y posteriormente esta agua puede ser suministrada gradualmente al almidón, lo que permite mantener más tiempo el pan tierno (Tejero, 2009).

### **Hemicelulasas**

Es una pentosanasa cuya acción se debe a los compuestos polisacáridos presentes en la harina. Lo más interesante de esta enzima es que acelera y aumenta la capacidad de coagulación del gluten, lo que es de interés en los panes precocidos ya que la formación de la miga en la etapa de precocción es acelerada siendo el resultado favorable para la formación de la miga y evitar así el colapso del pan precocido. Esta enzima debe siempre estar reforzada por otras ya que acepta bien el sinergismo, por ejemplo lipasa+hemicelulasa; esta combinación aumenta la fuerza en la masa y sobre todo la conservación del producto terminado. Las celulasas actúan igual que la hemicelulasa (Tejero, 2009).

### **Xilanasas**

En una hemicelulasa específica y en particular endo-1,4- $\beta$ -xilanasas se utiliza en la industria de la panificación para mejorar la textura del pan, el color y el volumen de los productos horneados (Tejero, 2009).

### **Proteasas**

Las proteasas de origen fúngico son menos agresivas que las de origen bacteriano y se emplean en las masas fermentadas, exclusivamente cuando son muy fuertes y tenaces, y en la fabricación de magdalenas, bizcochos y plum-cakes.

En la fabricación de galletas y barquillos se utilizan proteasas bacterianas. En estos casos, su efecto se traduce en un debilitamiento del gluten, lo que favorece el laminado de la masa y su expansión sin deformación durante la cocción. La degradación del gluten ayuda a la obtención de galletas más crujientes. En la fabricación de barquillos la



viscosidad o fluidez de la masa aumenta con la adicción de proteasas bacterianas, que ayudan a la evaporación del agua, lo que repercute en una mayor productividad y una menor fragilidad.

La galleta es un producto horneado con un contenido en humedad inferior al 5%. La receta base es grasa, azúcar y harina; a partir de esta receta las variedades son ilimitadas, no solamente en la composición de ésta con otros ingredientes sino también en su formato.

La harina que se utiliza en la fabricación de galletas debe ser de bajo contenido en proteína y con unas propiedades reológicas muy débiles y extensibles. No siempre el industrial galletero tiene este tipo de harina, para ello ha de recurrir a enzimas proteolíticas que tienen la facilidad de romper las largas moléculas de proteína que forman el gluten. Las proteasas de origen bacteriano son las más utilizadas en galletería.

Otros tipos de proteasas fúngicas atacan el gluten pero de forma débil, rompiendo algunos enlaces, se utilizan principalmente en panificación y en la elaboración de craker.

El uso de papaína (enzima obtenida de la papaya) en la elaboración de las galletas es para reemplazar el metabisulfito de sodio, que se utiliza en algunos países para suavizar la masa. En la fabricación de obleas es imprescindible emplear harina con muy poco gluten; lo que se consigue con harinas bajas en proteínas (Tejero, 2009).

### **Lipoxigenasas**

La harina de soja activa es el principal portador de la enzima lipoxigenasa. En la fabricación de pan de molde y pan de hamburguesas y, en general, en aquellos panes que se desee potenciar la blancura de la miga está recomendado el uso de entre 5 y 10 g/kilo de harina de soja activa.

El efecto de la lipoxigenasa sobre el ácido linoleico, es la formación de hidroxiperóxidos, que producen una oxidación acoplada de sustancias lipófilas, como los pigmentos carotenoides.

Esta oxidación ocurre durante la etapa de amasado y da lugar a una miga más blanca y brillante, al mismo tiempo que aumenta el volumen del pan y que su sabor sea más insípido.

Con la adicción de harina de soja activa se puede potenciar el efecto oxidante sin modificar en exceso el equilibrio de la harina, proporcionando ligeramente el aumento de la extensibilidad (Tejero, 2009).



## Lactasas

El azúcar de la leche y sus productos derivados se denomina lactosa, y es un disacárido, es decir, está formada por dos azúcares simples: la glucosa, que es fermentada por la levadura, y la galactosa, que no es fermentada y tiene poco poder edulcorante. La lactosa puede ser hidrolizada a estos tipos de azúcares mencionados por medio de una enzima denominada lactasa. Este fenómeno de degradación del azúcar de la leche produce un aumento en la velocidad de fermentación y contribuye a la coloración del pan. En la fabricación de pan de molde y de hamburguesa, el uso de leche en polvo o suero potenciará el color de la corteza, disminuyendo así el tiempo de cocción y manteniendo el máximo de humedad (Tejero, 2009).

## Lipasas

La lipasa es una enzima que libera emulgentes (mono y diglicéridos de ácidos grasos) a partir de las grasas que contiene la masa. Esto se traduce en un aumento de la fuerza de la masa, de la tolerancia en la fermentación y de la conservación. Suelen contener lipasas los complejos enzimáticos destinados a panes y productos de bollería de larga conservación. También reduce o sustituye los emulgentes. En las masas que van a ser sometidas a un laminado está recomendado el uso de las lipasas debido a que éstas aumentan la capacidad de estiramiento y laminado por la formación de monodiglicéridos, los cuales no solamente actúan sobre la extensibilidad, sino también en el retraso en el envejecimiento del pan o bollo (Tejero, 2009).

## Oxidasas

- **Glucosa-oxidasa (GOX).** La glucosa oxidasa en abreviatura GOX es una enzima que en presencia de agua y oxígeno, cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, es decir, agua oxigenada. Esta transformación favorece la oxidación de las proteínas, aumentando la tenacidad del gluten y reduciendo su extensibilidad. Su efecto es como el del ácido ascórbico: incrementa la retención de gas y aumenta el volumen del pan. Aunque a diferencia del ácido ascórbico, la glucosaoxidasa actúa rápidamente durante el amasado, mientras que el ácido ascórbico sólo lo hace al final del amasado y durante la fermentación; esto conlleva una mayor fuerza desde el



principio y una mayor absorción de agua. Después del amasado la presencia de oxígeno sigue activa en la superficie de la masa. Como ya hemos dicho, la acción de la GOX cuando interviene glucosa y oxígeno produce un compuesto oxidante: el peróxido de oxígeno (agua oxigenada). Esto produce, por un lado, una fuerte oxidación de la masa que repercute en el gluten aumentando la fuerza. Por otro lado, las recetas que contienen alto contenido en grasas, como por ejemplo el croissant y en general las masas fermentadas hojaldradas, son sometidas al proceso de congelación una vez fermentadas (bollería prefermentada), donde la masa esponjada y ya en fase de congelación el oxígeno del túnel mecánico de congelación oxida las grasas en contacto con la Gox y se produce un comienzo de oxidación de las grasas que continuará después en los días siguientes (aunque el producto esté perfectamente envasado), produciéndose un sabor rancio del producto. Por tanto hay que recordar que en la bollería prefermentada cuando se utilizan enzimas oxidasas hay que asegurarse que las grasas estén bien estabilizadas con aditivos antioxidantes para evitar el enranciamiento (Tejero, 2009).

## **1.16 Sinergia de enzimas (sinergismo)**

La acción en la masa y las características del pan de dos o más enzimas añadidas en conjunto es frecuentemente mayor que la suma de los efectos de cada enzima por sí sola, produciendo un interesante sinergismo. El mismo sinergismo es observado en el uso de las enzimas además de otros aditivos, tales como ácido ascórbico y los emulsionantes. Las industrias de fabricación de enzimas se esfuerzan en preparar diferentes complejos enzimáticos capaces de cubrir por sinergismo la carencia de una enzima para suplantarla con otra enzima añadida. Los procesos tan variados y la gran cantidad de panes que fabrica la panadería actual hace que estas combinaciones de procesos enzimáticos se vayan especializando en función de las variedades de panes a los que van dirigidos y al grado de automatismo que requiera la masa, una mayor o menor fuerza o equilibrio (Tejero, 2009).

### **1.16.1 Complejos enzimáticos**

La combinación de diferentes enzimas con los aditivos tradicionales (como el ácido ascórbico o emulgentes) dan lugar a los mejorantes comerciales que normalmente usa el



panadero, esa combinación específica estará formulada según el proceso y el tipo de pan:

#### **Proteasas bacterianas + Hemicelulosa.**

Reduce drásticamente la tenacidad P y alarga la extensibilidad L. Esta combinación de enzimas está dirigida a las harinas destinadas a la fabricación de galletas laminadas para que no se retraiga en el laminado y en troquelado de la galleta. Esta combinación puede remplazar el metasulfito de sodio que tradicionalmente se usa para este fin (Tejero, 2009).

#### **Proteasa bacteriana + Xilanasa.**

Este complejo enzimático es adecuado para las masas batidas de galletas y obleas. Produce una disminución de la viscosidad favoreciendo la dosificación de los moldes (Tejero, 2009).

#### **Xilanasa + $\alpha$ -Amilasa fúngica.**

Recomendado en harinas destinadas a procesos rápidos de panificación (Tejero, 2009).

#### **Glucosa-Oxidasa (GOX) + Hemicelulasa + Lipasa.**

Además de reforzar la masa, la miga del pan es más blanca (Tejero, 2009).

#### **Glucosa-Oxidasa (GOX) + Sulfidriloxidasa (SOX).**

Se utiliza como un fuerte oxidante que además de fuerza en la masa también aumenta considerablemente la capacidad de retención de gas. Las dos enzimas actúan sinérgicamente sobre la masa aumentando la tolerancia en el amasado (Tejero, 2009).

#### **Hemicelulasa + Lipasa.**

Reduce la viscosidad de la masa, aumenta el desarrollo en el horno y mejora la conservación.

#### **Lipasa + Lipoxigenasa.**

Mejora la conservación, miga más blanca (Tejero, 2011).

#### **Complejos comerciales**



*Ultra Fresh® Premium Advantage* es un producto de grado alimenticio formado por una mezcla de enzimas  $\alpha$ -amilasa, el cual es utilizado para mejorar significativamente la calidad de los productos panificados y la vida de anaquel de los productos panificados a través de su ciclo de vida. Este producto le permite además al panadero reducir la cantidad de azúcar y levadura dentro de la receta, así como acortar el tiempo de horneado así como el de horneado mediante el incremento de la temperatura interna del producto durante la cocción (Corbion Caravan, 2015) sin embargo no hay mucha información acerca del comportamiento de la  $\alpha$ -amilasa en productos panificados hechos a base de pasta hojaldre.

Marc (2001) describe las propiedades y aplicaciones de las enzimas que se encargan de hidrolizar el almidón de la familia de las  $\alpha$ -amilasas, misma que comprende un grupo de enzimas de diferentes especificidades, que actúan sobre un tipo de sustrato, siendo residuos de glucosa unidos a través de un enlace glucosídico  $\alpha$ , 1-1,  $\alpha$ -1-4, ó  $\alpha$ -1-6. Los miembros de esta familia comparten una serie de características comunes, encontrándose al menos 21 enzimas con diferentes especificidades dentro de este grupo; estas diferencias se consideran entre otras características, el sitio activo y la estructura general de la enzima. La  $\alpha$ -amilasa puede dividirse en dos subgrupos: las enzimas hidrolizantes y modificadoras de almidón.

Uno de los principales usos de este tipo de enzimas es como agente anti-envejecimiento en productos de panadería, al retardar la retrogradación del almidón.

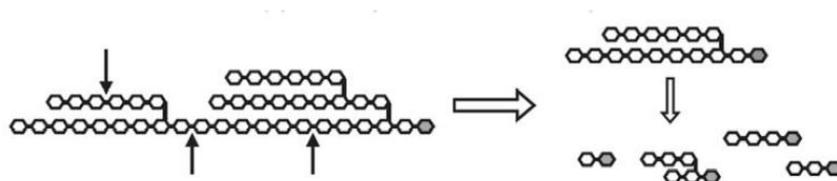
Diversos estudios (Collar, 2004; Caballero, 2006; Patel, 2012) han evaluado los efectos tanto individuales como sinérgicos de diversas enzimas sobre la red del gluten y su interacción con el almidón, encontrando resultados positivos sobre la reducción del envejecimiento del pan.

Moore, Heinbockel, Dockery, Ulmer, Arendt, (2006) demostraron que la incorporación de la enzima  $\alpha$ -amilasa en la harina favorece la formación de una red continua capaz de mejorar la calidad tecnológica del pan y su disminución en la velocidad de endurecimiento de la miga durante su almacenamiento.

Esta enzima hidroliza los enlaces  $\alpha$ -(1-4) del almidón, produciendo dextrinas de bajo peso molecular (Figura 3). Su efecto positivo sobre la calidad del pan se debe a que incrementa el contenido de azúcares fermentables y reductores (Bowles, 1996). Los

azúcares fermentables sirven de nutrientes para las levaduras aumentando la producción de  $\text{CO}_2$ , lo que implica un aumento en el volumen del pan; los azúcares reductores por su parte promueven la generación de los productos de la reacción de Maillard intensificando el sabor, el aroma y el color del pan (Drapron y Godon, 1987; Bowles, 1996).

Por otro lado, la acción de las amilasas que causan modificaciones en la estructura del almidón, altera sus propiedades de reagrupamiento, ya que las dextrinas producidas por la hidrólisis enzimática dificultan la reorganización de las moléculas de amilopectina durante el almacenamiento, evitando la retrogradación (León et al., 1997a; Defloor y Delcour, 1999; Durán et al., 2001).



**Figura 6.** Representación esquemática de la acción de la  $\alpha$ -amilasa sobre los polímeros de almidón (amilopectina). El anillo gris representa el residuo de glucosa con extremo reductor libre. El resultado de la acción enzimática es la obtención de dextrinas lineales y/o ramificadas de bajo peso molecular. (Adaptado de Goesaert et al., 2009).

Por otro lado, existen pocos estudios sobre la pasta hojaldre. Díaz, (2006) realizó un estudio de empacado en atmósfera modificada para productos de panificación tipo hojaldre, donde menciona que este tipo de tecnología es una buena alternativa para alargar la vida útil del producto, sin embargo, si se deseara aplicar a otros tipos de pan como bolillos, con fines comerciales, no sería redituable ya que el precio económico de dichos productos no cubriría los gastos del uso de la misma.

Bousquieres et al. (2014a), examinaron la ruptura de las láminas de grasa en la masa laminada tipo danés utilizando microscopía confocal de barrido láser, demostrando que a medida que se incrementan el número de “dobles” en el laminado, las láminas de grasa aumentan, hasta el punto en que se rompen y quedan espacios vacíos no deseados durante el proceso de horneado, lo que hace que la masa tenga una disminución considerable en el volumen del producto final. Otros estudios sobre masas laminadas (Blonk, 2002; Cauvain y Telloke, 1993; Filloux, 2008; Telloke, 1998), han



reportado propiedades fisicoquímicas de este tipo de masa.

Bousquieres, J., Deliyiny, C., Riaublanc, A., Lucas, T. (2014b) realizaron un estudio en láminas de masa, en cual se refieren a la importancia del proceso de laminado y la retracción elástica que sucede durante el trabajo de la masa. Mediante microscopia confocal de barrido láser, realizaron un conteo de las láminas de masa y grasa que esperaban se desarrollaran durante el proceso, además de que verificaron si el grosor de cada una de las láminas era el mismo. Estos autores concluyeron que las láminas no tuvieron el mismo grosor y que entre más grasa se utilice en el proceso de laminado, menor será la retracción elástica.

La  $\alpha$ -amilasa ejerce efecto sobre la estructura laminar de la masa hojaldre al interactuar con los componentes del almidón, (formado por amilosa y amilopectina) de las láminas de masa (AIB, 1994). La amilosa (25% del almidón) es un polímero de cadena lineal, formado por un número indeterminado de anhidrido -D glucosa unidas por enlaces de  $\alpha$  (1-4) glucosídico, susceptible a la amilasa. La amilopectina (75% del almidón) incluye en su estructura cadenas ramificadas, las cuales a su vez se conforman por cadenas lineales de anhidrido-D-glucosa unidas por enlaces ( $\beta$ -1-6) glucosídicos en una proporción del 4%. En primera instancia, estas cadenas son susceptibles a la acción de las alfa-amilasas, evento que permite la participación posterior de las  $\beta$ -amilasas y la consecuente mejora en la estructura laminar de la masa.

A pesar de diversas investigaciones sobre el uso de esta enzima aplicada a productos de panificación, en la actualidad existen pocos estudios sobre masas laminadas enfocados al estudio del efecto de la aplicación de enzimas en la distribución de la grasa en el proceso de formulación y laminado de la pasta hojaldre. La mayoría de las investigaciones relacionadas con el uso de  $\alpha$ -amilasas se han realizado en pan de caja, hogazas o pan francés, siendo el hojaldre un campo de estudio poco explorado dando pie a la presente investigación.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se calcula que en el mundo existen 300 millones de personas obesas, y más de 1000 millones con problemas de sobrepeso. Además el sobrepeso infantil afecta a un 10% de la población mundial (OMS, 2010). Es considerado que la obesidad es el



sexto factor en importancia que contribuye a la mortalidad mundial, y está demostrado que el sobrepeso reduce la esperanza de vida, incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, hipertensión, y ciertos tipos de cáncer (Conde, 2014).

Dado que el pan es un alimento de alto consumo en México (34 Kg per cápita) (CANAINPA, 2012) y todo el mundo, se considera interesante estudiar la reducción del contenido de grasas en panificados como lo son los que están hechos a base de pasta hojaldre, ya que estos contienen una cantidad considerable en su formulación, con el fin de contar con información que puede ser valiosa para la industria alimentaria, por los efectos antes mencionados con respecto a la salud.

Por otro lado y desde el punto de vista funcional se considera importante realizar los estudios de la aplicación de nuevas tecnologías como lo es la aplicación de enzimas, haciendo frente a las demandas de consumo actuales, ya que en los últimos años los alimentos libres de aditivos químicos han adquirido un lugar muy importante dentro de la demanda de los consumidores, quienes cada vez se preocupan más por saber qué ingredientes contienen los alimentos que consumen. La globalización ha modificado las exigencias de estos consumidores haciendo que adopten formas de vida más saludables, en donde el factor económico, cultural y educativo les permite tener acceso a información calificada acerca de los peligros que conlleva una vida sedentaria y una dieta a base de alimentos procesados con aditivos químicos y muy rica en calorías, y en este sentido, el estudio del efecto de la enzima  $\alpha$ -amilasa en pasta hojaldre es llevado a cabo con el fin de evaluar el efecto que provoca en su microestructura laminar para ver si es posible llevar a cabo una reducción de grasa o los efectos que las amilasas pudieran presentar en este tipo de productos panificados.

Al final esta información podría ser útil y extrapolada a nivel industrial, ya que la reducción de grasa en un producto hojaldrado repercutiría de manera positiva en el costo del producción, ya que es la materia prima más costosa en este tipo de productos, teniendo al mismo tiempo un producto de “etiqueta limpia” es decir libre de aditivos químicos mediante el uso de biotecnología a través de la aplicación de enzimas en el área de panificación.

### 3. HIPÓTESIS

La adición de enzima  $\alpha$ -amilasa en la formulación de pasta tipo hojaldre, provoca



rupturas microestructurales en las láminas, propiciándose una deformación en ellas, ayudando a que el vapor generado durante el proceso de horneado tenga una mejor difusión a través de dichas rupturas, lo que provoca que haya una mejor distribución de la grasa en el sistema, favoreciendo una reducción de ésta en el proceso de elaboración.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar del efecto que tiene la adición de  $\alpha$ -amilasa sobre la microestructura de la pasta hojaldre para llevar a cabo una reducción de grasa en el proceso de laminado.

### 4.2 Objetivos específicos

- Realizar un estudio de cinética enzimática de la enzima a utilizar para conocer su posible comportamiento en la pasta hojaldre.
- Desarrollar diferentes formulaciones de pasta hojaldre variando la concentración de enzima y el porcentaje de grasa.
- Estudiar el efecto de la enzima  $\alpha$ -amilasa sobre la microestructura de las láminas de la pasta hojaldre, mediante microscopía confocal de barrido láser y relacionarlo con parámetros físicoquímicos y de textura.
- Evaluar el efecto de la cantidad de grasa utilizada para el proceso de laminado, tanto en las pastas crudas como en el producto horneado, con respecto a sus propiedades físico-químicas y de textura.
- Encontrar la concentración de enzima y el porcentaje de grasa a utilizar después de llevar a cabo la reducción pertinente sin que las propiedades físicoquímicas y texturales cambien con respecto a la formulación testigo de pasta hojaldre (0% enzima  $\alpha$ -amilasa).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Materiales

La masa para preparar la formulación control de la pasta hojaldre fue preparada usando



una formulación estándar con los siguientes ingredientes:

## 5.2 Ingredientes

La masa para hacer la formulación control de la pasta hojaldre fue preparada utilizando una formulación estándar que se muestra a continuación:

- 60.2% de harina de trigo (la cual contiene por cada 100 g de harina: proteínas: 11.10g; grasa: 1.26 g; hidratos de carbono: 72.80 g; fibra cruda: 0.64 g; cenizas: 0.61%), con un AA (Capacidad de absorción de agua): 63-65%; TD(tiempo de desarrollo de la masa): 12 min, marca Manitoba® adquirida en Molinos Bunge de México S.A. de C.V.
- 39.1% de agua (Bonafont, Danone, México).
- 0.6% de sal (La fina, México).
- 50% de margarina Flex roja (feité, Unilever de México, México). Este porcentaje está basado en el peso de la masa preparada con los primeros 3 ingredientes.

## 5.3 Elaboración de la pasta hojaldre

La masa fue elaborada mezclando los ingredientes en una batidora semi industrial (SP-800 Counter top mixer, Grupo Alpha Simet, México) la cual está equipada con un gancho en forma de espiral vertical (ideal para llevar a cabo tareas como la de batir masas panarias; 132 rpm) durante 12 min a velocidad constante y temperatura ambiente (18°C). De esta manera fue obtenido el 100% de masa. Después de ser amasada, la masa reposó por 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la masa fue laminada con el 50% del peso de la masa en margarina especial para este tipo de pasta, con un punto de fusión de 42°C (Flex roja, feité, Unilever de México). Este procedimiento se llevó a cabo bajo la premisa de que Stauffer (1999) hace referencia a que es necesario contar una margarina que sea capaz de soportar temperaturas de trabajo relativamente altas para la elaboración de este tipo de masas (por ejemplo, el punto de fusión de la mantequilla es de 30°C).

La consistencia y temperatura (18°C, temperatura ambiente) de la grasa utilizada fue ajustada empíricamente (de acuerdo a las prácticas industriales) de esta manera tanto la

masa como la grasa lograron tener consistencias y temperaturas similares con el fin de prevenir que la masa se rompiera durante el proceso de laminación y a su vez hacerlo más fácil.

La laminación de la masa fue llevada a cabo en el mismo lugar (18°C) con una laminadora eléctrica (SSO625, Ecomat, Burgdorf, Switzerland) equipada con un par de rodillos reversibles suaves con medidas iguales (84 mm de diámetro). La técnica de laminación utilizada fue el “método inglés” (figura 7). Fue elegido este método debido a su gran utilización a nivel industrial. (Massi, 2007), así el “libro” (por la forma en la que la masa es doblada, parece un libro, y así es conocido en el argot panadero) original fue compuesto inicialmente de dos capas de grasa entre tres capas de masa. Tres dobleces simples fueron utilizados para producir teóricamente 15, 45 y 135 láminas. Con el fin de evitar en medida de lo posible encogimiento elástico en la masa durante las etapas de laminado, la masa fue gradualmente adelgazada y se dejó en reposo por 5 min entre cada doblés. Antes de cada doblés, la masa fue también espolvoreada ligeramente con harina para evitar que la masa se adhiriera a los rodillos y evitar daños al equipo utilizado. La masa fue progresivamente laminada hasta alcanzar un grosor de 10 mm (con cuatro pasadas a 40, 30, 20 y 10 mm entre los rodillos). El grosor de la masa fue medida con ayuda de vernier (Mitutoyo 6in 150mm 500-196-20 calibrador digital) en los 4 extremos de la pasta (la masa una vez laminada es nombrada pasta, en este caso pasta hojaldre).

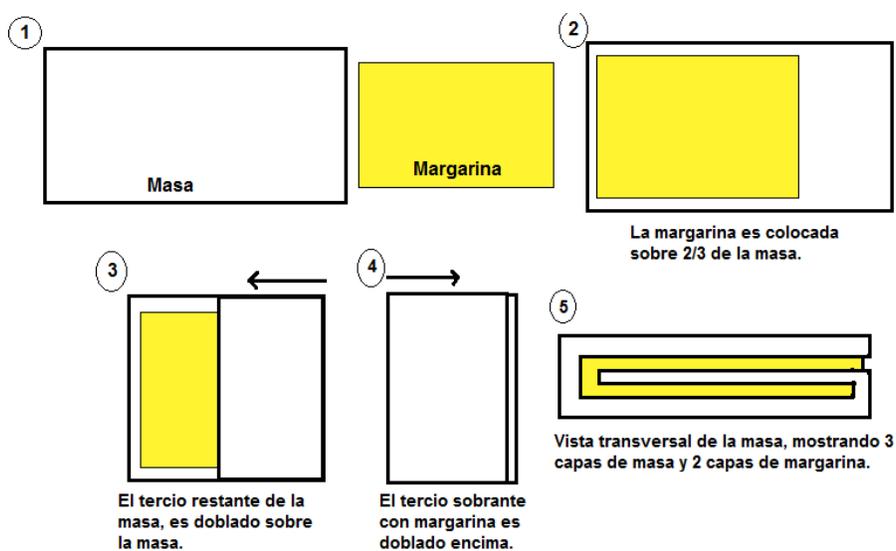


Figura 7. Método de laminación “Inglés” (Massi, 2007).



La pasta hojaldre fue dividida en dos partes con el fin de llevar a cabo los estudios pertinentes. Fue cortado un rectángulo de 20 x 10 cm, después se obtuvieron dos cuadrados de masa de 10 x 10 cm. Uno de ellos fue puesto en una bolsa plástica y conservado en refrigeración (4°C) por 20 min; la otra parte fue horneada en un horno eléctrico de convección (101, Self-cooking Center 5 Senses, Rational, Germany) for 20 min a 21°C con 0% de humedad. La temperatura del horno fue medida utilizando un termopar con el que está integrado el horno. De igual manera el horno permite el control de temperatura con exactitud. La charola con las muestras fue puesta en la zona central del horno. Después de la etapa de horneado, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente (18°C) por 15 min. La caracterización pertinente de este producto tanto crudo como horneado fue hecha.

#### **5.4 Preparación de las muestras experimentales de pasta hojaldre**

Para llevar a cabo el presente estudio, fue preparado el siguiente experimento al agregar 0.5%, 1.0% y 1.5% de una mezcla comercial de  $\alpha$ -amilasas de origen bacteriano, fúngico y maltogénico, de grado alimenticio *Ultra Fresh® Premium Advantage* (Corbion Caravan México) basado en el peso de la harina. Los porcentajes de  $\alpha$ -amilasa fueron seleccionados de acuerdo a la hoja de datos comercial proporcionada por Corbion Caravan México. Al saber cuál fue el mejor porcentaje de enzima a utilizar también los porcentajes de materia grasa fueron modificados de 100% (control) a 80% y 60% basado en el peso de la masa preparada respectivamente. 3 muestras fueron preparadas para cada experimento.

## **6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA**

### **Análisis fisicoquímicos**

La preparación de la pasta hojaldre así como los análisis fisicoquímicos fueron llevados a cabo en el laboratorio de tecnología de cereales, en la planta piloto de ciencia y tecnología de alimentos de la Facultad de Química (Unidad “El Cerrillo”, Piedras blancas, Estado de México) perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Las muestras fueron evaluadas en tres repeticiones.



## 6.1 Cinética enzimática

El objetivo de la medición de la cinética enzimática en el presente estudio fue encontrar las condiciones óptimas de trabajo de un complejo comercial de enzimas  $\alpha$ -amilasas, en orden para determinar el tiempo, la temperatura y el pH óptimo donde se encuentra para una alta actividad enzimática para aplicaciones en productos panificados. Las reacciones enzimáticas fueron monitoreadas mediante la medición de formación de azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis del almidón sobre el tiempo de acuerdo con (A. Sánchez, O. Palacios, S. Batista, Z. Díaz, N.P. Guerra, 2016). Los resultados fueron correlacionados con curvas de temperatura medidas durante el proceso de horneado.

## 6.2 Análisis de curvas de temperatura

Con el fin de saber la temperatura máxima interna de la pasta hojaldre durante el horneado, este parámetro fue medido utilizando un termopar del horno, el cual se colocó en el centro de la muestra de pasta hojaldre desde el inicio hasta el final del horneado. Los resultados fueron correlacionados con los resultados de la cinética enzimática.

## 6.3 Análisis de pH

El pH de las muestras crudas así como de las muestras horneadas fue determinado utilizando el método de la AACC 02-52 (1983), el cual es utilizado para determinar los valores de pH en harina de trigo y productos panificados.

## 6.4 Volumen específico

El volumen específico de las muestras de pasta hojaldre fue determinado de acuerdo a la metodología del AACC, (2000). Las muestras fueron pesadas en una balanza semi-analítica (Ohaus, SP2001, Scout Pro, Parsippany, NJ, USA) y el volumen fue medido mediante el desplazamiento de semillas de mijo. El volumen específico fue calculado a través de la relación de volumen/peso y los resultados fueron expresados en  $\text{cm}^3/\text{g}$ . Aunado a esto, la altura y el tamaño de la masa laminada se midió antes y después del horneado con la ayuda de un vernier (Mitutoyo 6in 150mm 500-196-20 calibrador digital) en cuatro puntos diferentes, tanto de la masa y el producto horneado para obtener un



promedio y determinar el volumen, y realizar una comparación entre la pasta laminada cruda y el producto una vez horneado, calculando el volumen específico con la siguiente fórmula:  $m=p/v$ .

### 6.5 Análisis del perfil de textura TPA: Fracturabilidad y dureza

Las muestras analizadas fueron cuadrados horneados de 10 x 10 x 6  $\pm$ 1 cm por triplicado. La fracturabilidad y la dureza de las muestras de pasta hojaldre fueron evaluadas de acuerdo a la metodología AACC, (2000), utilizando el texturómetro TA-XT2 Stable texture analyzer, junto con el programa Exponent, Stable Micro Systems. Las mediciones de compresión y la fuerza fueron llevadas a cabo. La prueba fue realizada bajo las siguientes condiciones: Velocidad de prueba: 5 mm/s, compresión 30%, tiempo de recuperación de 3 seg, teniendo 2 compresiones con una velocidad de descenso y de ascenso de 1mm/seg., Un émbolo de aluminio cilíndrico de 50 mm de diámetro (P36/R) fue utilizado.

Este análisis se realizó con el fin de llevar a cabo una correlación de los datos obtenidos en cada uno de los parámetros medidos: Fracturabilidad (fracturability, antes llamado brittleness) que es la fuerza en el primer quiebre significativo de la curva durante el primer ciclo de compresión y Dureza (Hardness) que es la resistencia a la deformación. Es la fuerza requerida para romper la muestra en varios pedazos durante la primera mordida. Es la altura (fuerza) del pico más alto logrado durante el primer ciclo de compresión (Bourne, 2002). Se obtuvieron los resultados del parámetro de interés sólo en el producto horneado.

### 6.6 Color

Las mediciones colorimétricas fueron realizadas sobre el centro de la corteza de las muestras utilizando un espectrofotómetro (CR-400, Konica Minolta, Ramsey, NJ, USA) calibrado sobre un plato de calibración con el D65 iluminant (correspondiente al color de la luz del día natural). Los resultados fueron calculados usando la escala internacional del espacio del color CIE  $L^* a^* b^*$ , donde  $L^*$  representa la luminosidad, con valores de 0 (negro) a 100 (blanco). Los componentes cromáticos son representados por  $a^*$  y  $b^*$ . Donde  $a^*$  representa el eje verde-rojo y  $b^*$  el eje azul-amarillo. Los valores positivos de  $a^*$  son rojos y los valores negativos son verdes, mientras que los valores positivos de  $b^*$  son amarillos y los valores negativos son azules (Miñarro B., *et al*, 2012).



## 6.7 Método de extracción Soxhlet

El contenido de grasa de la pasta hojaldre fue medido mediante el método AOAC no. 920.85 (AOAC, 1990) con un aparato automático para extracción Soxhlet (4 piezas, Gerhardt Soxtherm, Königswinter, Germany) siguiendo la guía de uso del fabricante, en el laboratorio de biotecnología de la unidad Cerrillo de la facultad de Química, UARMex. La pasta hojaldre fue molida utilizando un procesador de alimentos (KFP1466CU, KitchenAid, OH, USA) por 1 min para homogeneizar las muestras. Las muestras (3 g) fueron secadas y empaquetadas en un dedal de celulosa y la grasa fue extraída con éter de petróleo (punto de ebullición: 60-90 °C) por 3 h. Una vez completada la extracción, la grasa fue secada a 100°C por 5 h para remover el éter de petróleo residual y evitar errores en la medición. El contenido de grasa de las muestras fue calculado en base al peso de las muestras secas de pasta hojaldre.

## 6.8 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de un factor con el cual se compararon las diversas concentraciones de enzima y grasa para encontrar si existen diferencias significativas en el producto final. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA monofactorial) y sus comparaciones por medio de una prueba de Tukey a un nivel de confianza de 95%, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 24 (Statistical product and service solutions) Software (IBM SPSS, USA) para Windows. La significancia estadística utilizada fue de  $P < 0.05$ .

## 6.9 Caracterización micro estructural

### 6.9.1 Preparación de las muestras

Las muestras fueron analizadas de acuerdo a lo establecido por Bousquieres (2014) con algunas modificaciones, las cuales son descritas a continuación. En cada extremo de un cuadrado de 20 cm x 20 cm congelado de las muestras de pasta hojaldre, un rectángulo pequeño de 10 x 5 cm fue cortado, del cual un cubo de 10 x 10 mm fue cortado a su vez de cada extremo, haciendo un total de 4 muestras por cada formulación, las muestras fueron analizadas para conocer el comportamiento de la enzima en la pasta hojaldre, más



tarde fueron correlacionadas con los otros estudios hechos. Una marca pequeña fue hecha en cada cubo en orden para localizarla espacialmente (x, y, z). Con el fin de visualizar las láminas de masa y grasa separadamente con técnicas de microscopía confocal de barrido láser (CLSM por sus siglas en inglés), tres fluorocromos fueron necesarios para poder teñir la muestra y visualizarla mejor. Los fluorocromos utilizados fueron: fluoresceína al 0.5% (FICT; Sigma Chem Co, St. Louis, MO, USA), rodamina B al 0.5% (Sigma Chemicals solutions) (Díaz-Ramírez et al., 2013). y rojo Nilo (Sigma Aldrich) fue utilizado para visualizar el comportamiento de la grasa en la pasta hojaldre. Para evitar cualquier degradación, los fluoróforos fueron protegidos de la luz y almacenados a -20 °C, y la cantidad de solución requerida fue preparada el día del experimento.

### **6.9.2 Observación con el microscopio confocal de barrido láser (CLSM)**

Las muestras fueron teñidas con FICT (5 mL, 20 min en un lugar oscuro) el cual tiñe principalmente proteínas (verde) y en segundo lugar, Rodamina B (5 mL, 10 min en un lugar oscuro) el cual reacciona más específicamente con almidón (rojo) (Díaz-Ramírez et al., 2013). Después de llevar a cabo el teñido, el exceso fue removido al lavar cuidadosamente la muestra con agua destilada; las muestras fueron ligeramente secadas (10 min, 30°C) y cubiertas (con un cristal). Las ondas de longitud de excitación utilizadas fueron 488 y 518 nanómetros para FICT y rodamina B respectivamente, y la máxima emisión fue a 568 y 625 nanómetros para ambos colorantes. Las muestras fueron estudiadas utilizando un microscopio confocal de barrido láser (LSM 710; Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) con un lente de 20x, con el propósito de observar el comportamiento de la  $\alpha$ -amilasa en las láminas de la pasta hojaldre y ver si se lleva a cabo algún cambio o deformación en la estructura y su efecto sobre la distribución e interacción de los principales componentes, así como los cambios en los gránulos de almidón conforme al aumento del porcentaje de  $\alpha$ -amilasa utilizado en las formulaciones estudiadas. Las imágenes fueron obtenidas a color en formato RGB y guardadas en formato tiff de 1024 x 1024 píxeles (Díaz-Ramírez et al., 2013).

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante la realización del presente proyecto. Fueron llevados a cabo cada uno de los parámetros descritos anteriormente, realizando un análisis comparativo de la muestra testigo con las



formulaciones experimentales, con el fin de conocer si existen diferencias significativas entre dichas formulaciones, siendo así la formulación que menos diferencias muestre la elegida debido al objetivo del presente trabajo.

## 7.1 Cinética enzimática

Las mediciones de la concentración de azúcares reductores en una muestra pueden dar información importante, tal como las concentraciones de azúcar en diferentes alimentos y bebidas, el contenido de lactosa en la leche, la actividad de una enzima en celulosa o almidón. (Wood I. P., Elliston A., Ryden P., Bancro I., Roberts I. N., Waldron K. W., 2012) Los AR son el producto final de muchos procesos biológicos y reacciones enzimáticas. La determinación de los AR totales es frecuentemente realizada mediante procedimientos colorimétricos. La mayoría de ellos involucra la detección colorimétrica basada en la oxidación de los grupos carbonilos, seguido por una reacción con una molécula que absorbe la luz UV visible (C. Melander, E. Andersson, S. Axelsson, 2007) el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) es ampliamente utilizado para estimar la concentración de azúcares reductores es diferentes muestras (Wood et al., 2012). Este método está basado en la reducción del 3, 5-ácido dinitrosalicílico (Color Amarillo) a 3-amino-5-nitrosalicilato (color marrón) en medio alcalino y su presencia puede ser detectada mediante la lectura de la absorbancia a 540 nanómetros. La absorbancia óptica es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores (Kevser et al., 2016).

### I. Reacciones catalizadas enzimáticamente

El progreso de la reacción es monitoreada mediante la medición de la formación de AR de la hidrólisis del almidón sobre el tiempo. En la reacción enzimática es necesario medir la cantidad de azúcares reductores iniciales presentes en el sustrato y en la preparación enzimática.

Para un mejor análisis, este experimento de cinética enzimática fue dividido en 3 partes.

#### I.1. Efecto de la concentración de la enzima en la hidrólisis L-catalizada del almidón

La primera parte del experimento fue evaluar el efecto de la concentración de enzima sobre la hidrólisis del almidón para encontrar la cantidad de enzima para trabajar eficientemente.



## Experimentos con almidón.

Para esta parte del experimento fue utilizada una incubadora especializada *IKA KS 4000*. Las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo con los siguientes parámetros de temperatura (46°C) y agitación (150 rpm). Todos los experimentos fueron llevados por triplicado para seis diluciones de preparación enzimática diferentes (peso/volumen) haciendo esta dilución a partir de una solución preparada con 50g (Sánchez *et al.*, 2016) del complejo enzimático (polvo) en un litro de agua destilada (100%) y preparando a partir de ésta, 6 diluciones diferentes (0.5%, 1.0 % , 1.5% , 5%, 10 % and 30 % ) utilizando como sustrato de la reacción una solución de almidón de papa soluble grado reactivo *Panreac®* en una concentración doble (2%) a la deseada en la reacción (1%) , y una solución buffer 0.15 M de citrato-fosfato con un pH de 5.0 así como es mostrado en el cuadro 6

**Cuadro 6:** Diluciones enzimáticas sobre el tiempo

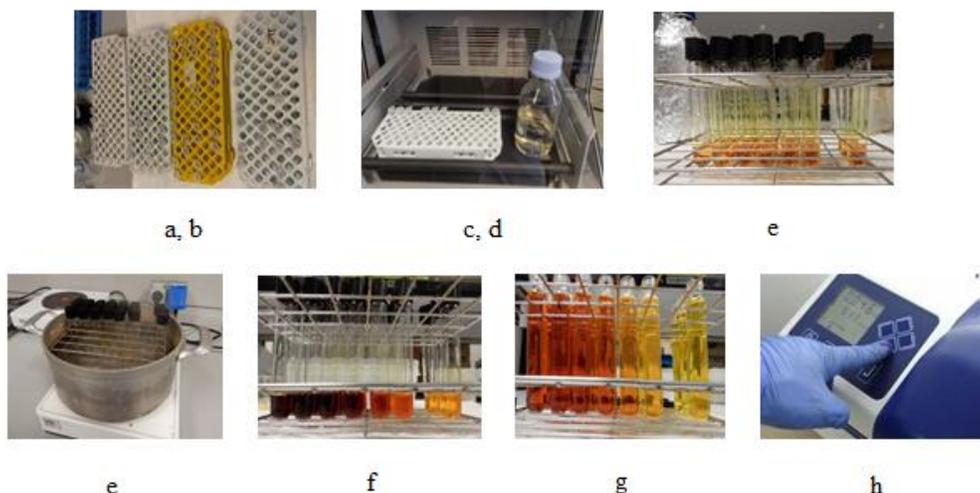
| Tiempos de reacción    | Buffer                  | [Sustrato] | [Enzima]                |
|------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| 1, 2, 4, 6, 8 y 10 min | Citrato-fosfato, pH 5.0 | 1 g/L      | 0.5, 1, 1.5, 5, 10, 30% |

Una vez preparada la solución de almidón, la solución de  $\alpha$ -amilasa y las diluciones solicitadas, y los reactivos: DNS y el buffer de citrato-fosfato, fue iniciada la reacción enzimática como se describe a continuación:

- En un rack de plástico fueron colocados tubos Eppendorf de 2mL de capacidad, y después fueron agregados 400  $\mu$ L del mismo buffer
- Se agregaron 600  $\mu$ L de solución de almidón con una concentración doble (2 g/L) que el deseado en la mezcla de la reacción (1 g/L) en cada tubo y fueron incubados a 40°C por 15 min, con una agitación de 150 rpm.
- Después del tiempo requerido para la incubación del almidón, 80  $\mu$ L de la preparación enzimática convenientemente diluida (0.5%,1%, 1.5%, 5%, 10% y 30%) en buffer de citrato–fosfato 0.15 M, con pH 5.0 fueron agregados contando el tiempo con ayuda de un cronometro, dejando un lapso de 10 segundos entre cada uno de los tubos, mezclando inmediatamente toda la preparación con ayuda de un vórtex por 3 seg, para volver a incubar la mezcla otra vez a 40°C con agitación

de 150 rpm, sin dejar de contar el tiempo.

- d) La reacción enzimática fue detenida cada 1, 2, 4, 6, 8, and 10 min agregando inmediatamente pasaba el tiempo 480  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS y mezclando con un vórtex por 3 seg.
- e) Utilizando tubos de ensayo, fueron agregados 1000  $\mu\text{L}$  de la mezcla de la reacción enzimática y 1000  $\mu\text{L}$  de DNS, homogeneizándolos con ayuda de un vórtex.
- f) Los tubos de ensayo fueron puestos (junto con las muestras, controles, blancos y estándares de glucosa) exactamente 5 min en un baño de agua hirviendo vigorosamente para poder desarrollar el color marrón. El baño debe contener suficiente agua para cubrir la parte de los tubos de ensayo ocupada por la mezcla anterior. Los tubos fueron tapados con tapa rosca con el fin de evitar la pérdida de líquido por evaporación, lo cual podría influir en la lectura de resultados.
- g) Después de ser hervidos, los tubos fueron enfriados a temperatura ambiente en un baño de agua helada por 15 min. Todos los tubos fueron diluidos (ensayos, blancos, estándares de glucosa y controles) en agua destilada (10 mL de agua destilada para cada 1 mL de mezcla de la reacción).
- h) La formación de color fue determinada mediante la medición de la absorbancia contra el blanco a 540 nm en un espectrofotómetro *UV/ Vis NIR / compact - 190 - 1000 nm | UV-Vis 105*.



**Figura. 8** Proceso de la medición de los azúcares reductores en el efecto de la concentración de la enzima sobre la hidrólisis del almidón catalizada enzimáticamente.



## Cálculos

- a) Se hizo una gráfica linear de glucosa estándar utilizando las concentraciones estándares de glucosa (cuadro 7) graficando sus absorbancias correspondientes a 540 nm. Una línea recta debía formarse con los datos obtenidos de glucosa con un coeficiente de correlación cercano a 1. (Adney, B., Baker, J., 1996)
- b) Determinar la cantidad de glucosa liberada para cada muestra con el uso de la curva de glucosa estándar.

## Análisis y resultados previos

Después de llevar a cabo los ensayos espectrofotométricos por triplicado para cada muestras y estándar de glucosa, los análisis estadísticos correspondientes fueron llevados a cabo utilizando Excel (Microsoft Office 2010) para calcular la media y la desviación estándar y construir una gráfica linear de glucosa estándar con los resultados de la absorbancia mostrados en el cuadro 7. Los resultados fueron expresados como  $y = 0.4182x - 0.0608$  y  $R^2 = 0.999$ . Una línea recta fue elaborada con los datos obtenidos con el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) siendo muy cercano este a 1. Lo que significa que el experimento estuvo bien elaborado. Después de la substracción del blanco de la enzima, fue determinada la cantidad de glucosa liberada para cada dilución enzimática con el uso de una curva estándar, los resultados son mostrados en el cuadro 7 y en la figura 9.

**Cuadro 7:** Construcción de una gráfica linear de glucosa estándar

| mL de 0.15 M buffer de citrate-fosfato, pH 5.0 | mL de solución de glucosa para trabajar | Concentración de glucosa (g/L) | Absorbancia (540 nm) |
|--|---|--------------------------------|----------------------|
| 0  | 1.0                                     | 2.5                            | 0.996                |
| 0.2  | 0.8                                     | 2.0                            | 0.767                |
| 0.4  | 0.6                                     | 1.5                            | 0.567                |
| 0.6  | 0.4                                     | 1.0                            | 0.340                |
| 0.8  | 0.2                                     | 0.5                            | 0.147                |
| 0.9  | 0.1                                     | 0.25                           | 0.057                |
| 0.0  | 0.0                                     | 0.0                            | 0.0                  |

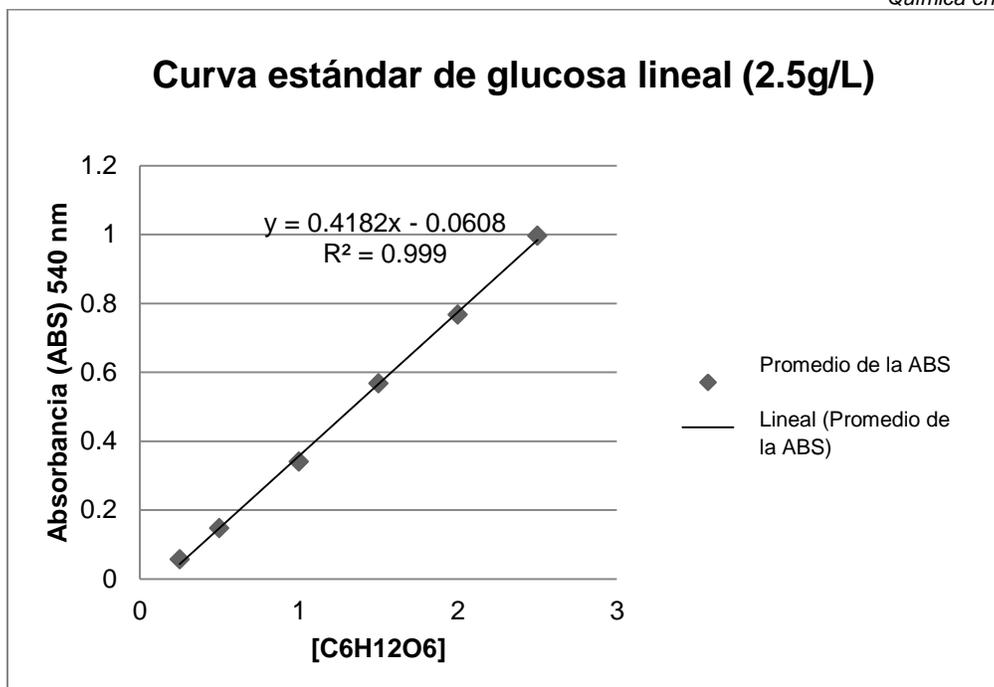


Figura 9. Construcción de una curva estándar de glucosa lineal

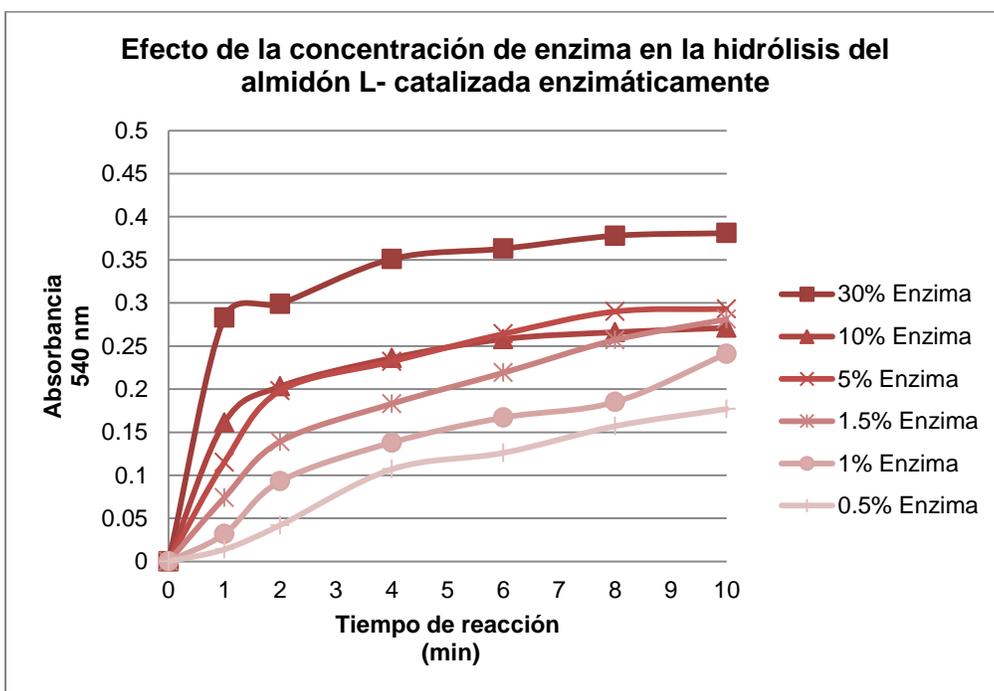


Figura 10. Efecto de la concentración de enzima en la hidrólisis del almidón L-catalizada enzimáticamente.



**Cuadro 8.** Valores de la media de la determinación de la cantidad de glucosa liberada para cada dilución enzimática con el uso de la curva estándar.

| Concentración de la dilución enzimática | Valor de Y | R <sup>2</sup> |
|---|------------|----------------|
| 1%                                      | 0.0995x    | 0.9569         |
| 2%                                      | 0.0256x    | 0.9129         |
| 3%                                      | 0.0329x    | 0.7963         |
| 5%                                      | 0.0374x    | 0.476          |
| 10%                                     | 0.0357x    | 0.0752         |
| 30%                                     | 0.0511x    | -0.236         |

Mejores condiciones de reacción de la solución enzimática son:

- Concentración de enzima: 0.5%
- Tiempo de reacción: 4 min

### I.2. Determinación de la velocidad inicial de la reacción ( $v_0$ )

Después de seleccionar la concentración de enzima apropiada y el tiempo de reacción en el experimento previo, fue necesario determinar la velocidad inicial de la reacción de la hidrólisis del almidón catalizada enzimáticamente con diferentes concentraciones iniciales de sustrato. 6 diluciones diferentes con una concentración doble que la deseada en la mezcla de la reacción fueron preparadas a partir de una solución stock. Estas diluciones son descritas en el cuadro 9.



**Cuadro 9:** Diluciones de almidón, 30 mL cada una.

| Concentración final (g/L) | Concentración doble (g/L) | % Solución de almidón de papa (usando una solución de 240 g/L como solución stock) | Volumen de agua destilada | Solución de almidón de papa (utilizando el doble (120 final) solución de 240 g/L como solución stock) | Total |
|---------------------------|---------------------------|--|---------------------------|---|-------|
| 1                         | 2                         | 0.833%   | 29.751 mL                 | 0.249 mL  | 30 mL |
| 3                         | 6                         | 2.500%   | 29.25 mL                  | 0.75 mL   | 30 mL |
| 5                         | 10                        | 4.1666%  | 28.751 mL                 | 1.249 mL  | 30 mL |
| 10                        | 20                        | 8.3333%  | 27.501 mL                 | 2.499 mL  | 30 mL |
| 15                        | 30                        | 12.50%   | 26.25 mL                  | 3.75 mL   | 30 mL |
| 20                        | 40                        | 16.66%   | 25.002 mL                 | 4.998 mL  | 30 mL |
| 25                        | 50                        | 20.83%   | 23.751 mL                 | 6.249 mL  | 30 mL |
| 30                        | 60                        | 25%  | 22.5 mL                   | 7.5 mL  | 30 mL |
| 40                        | 80                        | 33.33%   | 20.001 mL                 | 9.999 mL  | 30 mL |
| 50                        | 100                       | 41.66%   | 17.502 mL                 | 12.498 mL   | 30 mL |
| 80                        | 160                       | 66.66%   | 10.002 mL                 | 19.998 mL   | 30 mL |
| 100                       | 200                       | 83.33%   | 5.001 mL                  | 24.999 mL   | 30 mL |
| 120                       | 240                       | 100%   | 0 mL                      | 30 mL   | 30 mL |

El procedimiento experimental utilizado es descrito a continuación.

### 2.1 Experimentos con almidón.

- En un rack de plástico fueron colocados tubos Eppendorf de 2mL de capacidad, y después fueron agregados 400  $\mu$ L del mismo buffer
- Fueron agregados 600  $\mu$ L de las diferentes soluciones de almidón (cuadro...) con una concentración doble (2 g/L) que el deseado en la mezcla de la reacción (1 g/L) en cada tubo y fueron conservados a 40°C por 15 min, con una agitación de 150 rpm.
- Después del tiempo requerido para la incubación del almidón, 80  $\mu$ L de la preparación enzimática seleccionada (0.5%) en buffer de citrato-fosfato 0.15 M, pH 5.0 fueron agregados contando el tiempo con ayuda de un cronometro cada 10 segundos en cada uno de los tubos y mezclada toda la preparación con ayuda de un vórtex por 3 seg, para volver a incubar la mezcla de la otra vez a 40°C con agitación de 150 rpm, sin dejar de contar el tiempo.
- La reacción enzimática fue detenida después de 4 min agregando inmediatamente



480  $\mu$ L de reactivo DNS y mezclando con un vórtex por 3 seg.

- e) Utilizando tubos de ensayo, fueron agregados 1000  $\mu$ L de la mezcla de la reacción enzimática y 1000  $\mu$ L de DNS, mezclándolos con ayuda de un vórtex.
- f) Los tubos de ensayo fueron puestos (conteniendo las muestras, controles, blancos y estándares de glucosa) exactamente 5 min en un baño de agua hirviendo vigorosamente para poder desarrollar el color marrón. El baño debe contener suficiente agua para cubrir la parte de los tubos de ensayo ocupada por la mezcla anterior. Los tubos fueron tapados con tapa rosca con el fin de evitar la pérdida de líquido por evaporación, lo cual podría influir en la lectura de resultados.
- g) Después de ser hervidos, los tubos fueron enfriados a temperatura ambiente en un baño de agua helada por 15 min. Todos los tubos fueron diluidos (ensayos, blancos, estándares de glucosa y controles) en agua destilada (10 mL de agua destilada para cada 1 mL de mezcla de la reacción).
- h) La formación de color fue determinada mediante la medición de la absorbancia contra el blanco a 540 nm en un espectrofotometro *UV/ Vis NIR / compact - 190 - 1000 nm | UV-Vis 105*.



Análisis y resultados:

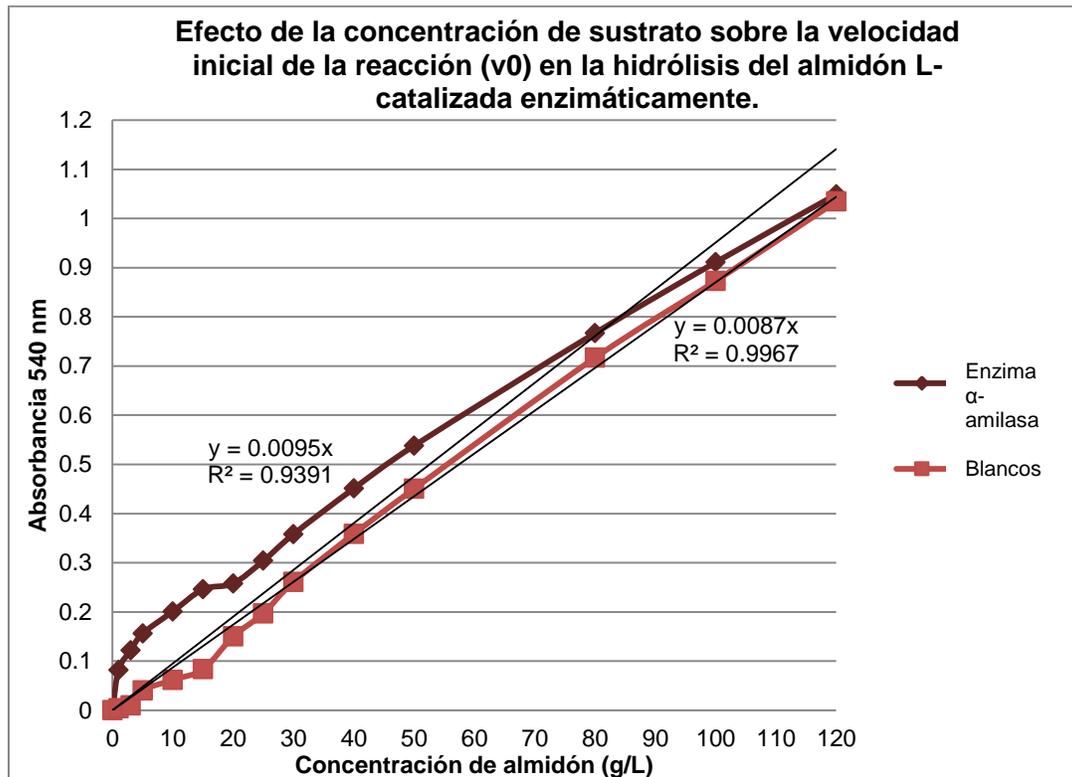
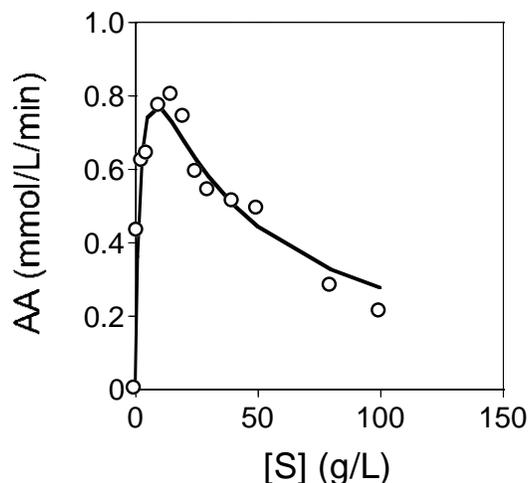


Figura 11. Efecto del incremento de las concentraciones del almidón sobre la actividad enzimática del complejo enzimático **Ultra Fresh® Premium Advantage (Corbion Caravan)**

Los resultados fueron analizados utilizando el módulo del software estadístico Statistica “experimental desing” (Statistica for Windows 5.1, StatSoft Inc. Tolusa, OK, USA) y fue obtenida la gráfica mostrada en la figura 4: que describe un fenómeno muy interesante: la enzima presentó una inhibición por sustrato, presentando la máxima actividad cuando una solución de almidón al 10% fue utilizada para llevar a cabo la reacción enzimática. Después de esa concentración de sustrato, la curva decreció, es decir que la actividad enzimática disminuyó.



**Figura 12.** Curva del progreso de la reacción para diferentes concentraciones de sustrato con la concentración de enzima seleccionada (1%) a un pH de 5.0 y 40°C para el almidón, Presentando una inhibición por modelo de sustrato.

$$AA = \frac{AA_{max} \cdot [S]}{KM + [S] + [S]^2 K_i}$$

### I.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la hidrólisis del almidón L-catalizada enzimáticamente.

Una vez que las condiciones de velocidad de reacción han sido determinadas, la concentración de sustrato deberían ser variadas para obtener una curva de saturación y calcular los valores de los parámetros Michaelianos  $K_M$  and  $V_{max}$ , para la hidrólisis del almidón L-catalizada enzimáticamente. Las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo con la concentración de enzima y tiempo seleccionados en los experimentos previos.

#### Blancos y controles.

Para cada experimento, los siguientes blancos y controles fueron preparados

**Sustrato:** almidón

**1. Blanco:** 1080  $\mu$ L de 0.15 M buffer citrato-fosfato, pH 5.0.

**2. Enzima control:** 1000  $\mu$ L de buffer citrato-fosfato + 80  $\mu$ L de dilución enzimática



seleccionada.

**3. Control de sustrato:** 600  $\mu$ L de diferentes soluciones de almidón + 480  $\mu$ L de 0.15 M buffer de citrato-fosfato, pH 5.0.

#### **I.4 Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad de la hidrólisis del almidón L-catalizada enzimáticamente.**

Para saber el pH y la temperatura óptima, fue elaborado un diseño central, compuesto por un valor  $\alpha = 1.267$  y cinco réplicas en el centro del dominio. La superficie de respuesta fue generada a partir del modelo empírico obtenido con la aplicación del diseño. El rango y el código de las dos variables independientes (Temperatura y pH), así como el diseño de experimentos son mostrados en el cuadro 10.

En este experimento, un volumen de preparación enzimática seleccionada apropiadamente (50 g/L al 0.5%) fue mezclada con 400  $\mu$ l del buffer correspondiente y 600  $\mu$ l de la solución de almidón a una concentración final de 10g/L, preparada con una concentración doble (20 g/L), previamente incubada a 40°C/15 min. Los buffers utilizados para cada pH estudiado fueron:

- Buffer 0.15 M de Hidrogenofteralato - HCL para pH 2.3 y 3.0
- Buffer 0.15 M de Citrato – fosfato para pH 5.5
- Buffer 0.15 M de TRIS – HCl para pH 8.0 y 8.7

Las mezclas de la reacción fueron incubadas por 4 min (Datos experimentales obtenidos a partir de los experimentos previos) a las temperaturas especificadas en el diseño experimental (Cuadro 10). En cada caso, la reacción fue detenida mediante la adición de 480  $\mu$ l de DNS y la glucosa liberada fue determinada utilizando el método de la reacción del 3,5 – ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959)



**Cuadro 10.** Rango y códigos de la variables independientes (temperatura: T° and pH), y matriz del diseño de experimentos.

| No. experimento | Valores codificados |        | Valores reales |     |
|-----------------|---------------------|--------|----------------|-----|
|                 | T(°C)               | pH     | T (°C)         | pH  |
| 0               | 1                   | 1      | 67             | 8   |
| 1               | 1                   | -1     | 67             | 3   |
| 2               | -1                  | 1      | 29             | 8   |
| 3               | -1                  | -1     | 29             | 3   |
| 4               | 1.267               | 0      | 72             | 5.5 |
| 5               | -1.267              | 0      | 24             | 5.5 |
| 6               | 0                   | 1.267  | 48             | 8.7 |
| 7               | 0                   | -1.267 | 48             | 2.3 |
| 8               | 0                   | 0      | 48             | 5.5 |
| 9               | 0                   | 0      | 48             | 5.5 |
| 10              | 0                   | 0      | 48             | 5.5 |
| 11              | 0                   | 0      | 48             | 5.5 |
| 12              | 0                   | 0      | 48             | 5.5 |
| 13              | 0                   | 0      | 48             | 5.5 |

Para el sustrato, fueron utilizadas las fórmulas de Michaelis-Menten (M-M), Lineweaver-Burk (LB), Eadie-Hofstee (EH) y Hanes (H) para poder calcular y comparar los valores de los parámetros Michaelianos,  $v_{max}$  (en mmol/L/min) y  $K_M$  (en g/L), utilizando el software Sigmaplot. Este paquete estadístico permite llevar a cabo una determinación precisa de las constantes Michaelianas, ya que aporta el estimado de los dos parámetros con sus correspondientes errores estándar, su  $t$  asociada y valores de  $P$  así como el coeficiente  $R^2$ . Con esta información es fácil evaluar la significancia de los valores de las dos constantes.

El programa estadístico *SPSS Statistic software* fue utilizado para comparar estadísticamente los valores de  $v_{max}$  y  $K_M$  obtenidas para el almidón, después de haber llevado a cabo las fórmulas correspondientes de las ecuaciones de M-M, L-B, E-H and H para los datos experimentales.

Los programas estadísticos utilizados fueron:

1. SigmaPlot para Windows version 12.0 (Systat Software, Inc., 2011).
2. SPSS Statistics 17.0 para Windows (Release 17.0.1; SPSS Inc., Chicago, IL,



2008).

### Presentación de datos

Presentando los datos experimentales (velocidad 0 (v0) contra [Sustrato]) y sus transformaciones correspondientes (1/v0 contra 1/[S], v0 contra v0/[S] y [S]/v0 contra [S]) en una hoja de Excel. (Microsoft Excel 2010)

### Resultados

$$1) \quad AA = 2.649 + 0.644T - 0.57Ph - 0.492pHT - 0.130T^2 - 0.759pH^2$$

$$\frac{\partial AA}{\partial T} = 0.644 - 0.492pH - 0.26T = 0 \quad (-0.492)$$

$$\frac{\partial AA}{\partial pH} = -0.57 - 0.492T - 1.519pH = 0 \quad (+0.26)$$

$$\frac{\partial AA}{\partial T} = -0.317 + 0.242pH + 0.128T = 0$$

$$\frac{\partial AA}{\partial pH} = -0.149 - 0.128T - 0.396pH = 0$$

$$-0.466 - 0.154pH = 0$$

$$pH = \frac{0.466}{-0.154} = -3.03$$

Una vez dado el coeficiente lineal de T (0.644) y siendo positivo y mayor que el cuadrático (0.130), se puede asumir que el efecto general de T para la actividad enzimática de este complejo es casi lineal. T óptima = 1.267

Reemplazando T=1.267 en I:

$$AA = 2.649 + 0.816 - 0.57pH - 0.624pH - 0.209 - 0.759pH^2$$

$$AA = 3.256 - 1.193pH - 0.759pH^2$$

$$\frac{\partial AA}{\partial pH} = -1.193 - 1.519pH = 0$$

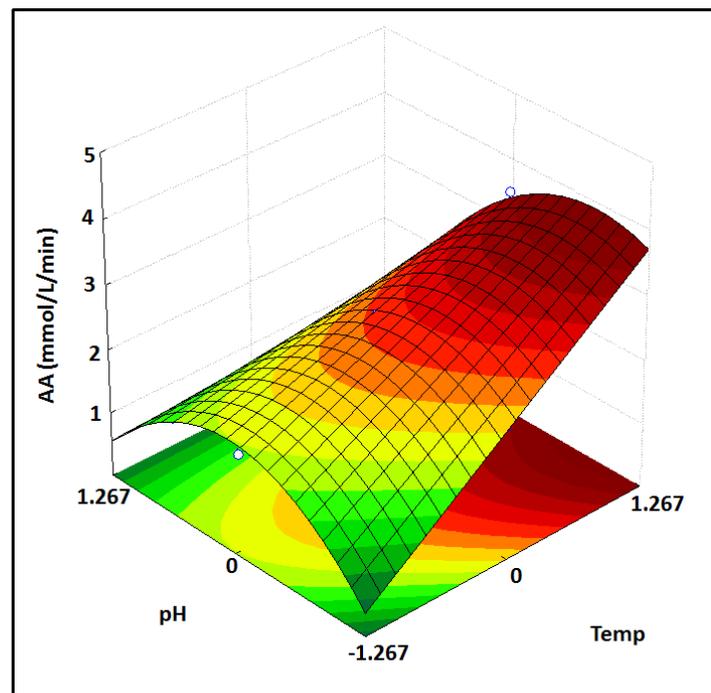
$$pH = \frac{-1.193}{1.519} = -0.786 \text{ (pH codificado) por lo tanto el pH real es } = 3.54$$

$$T = 1.267 = T \text{ Real} = 72^\circ\text{C}$$

$$\therefore AA_{\max} = 2.649 + 0.647(1.267) - 0.57 \cdot (-0.786) - 0.492(-0.786)(1.267)$$

$$AA_{\max} = 3.7248 \text{ mMol/L}$$

**Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática del complejo enzimático de  $\alpha$ -amilasa.**

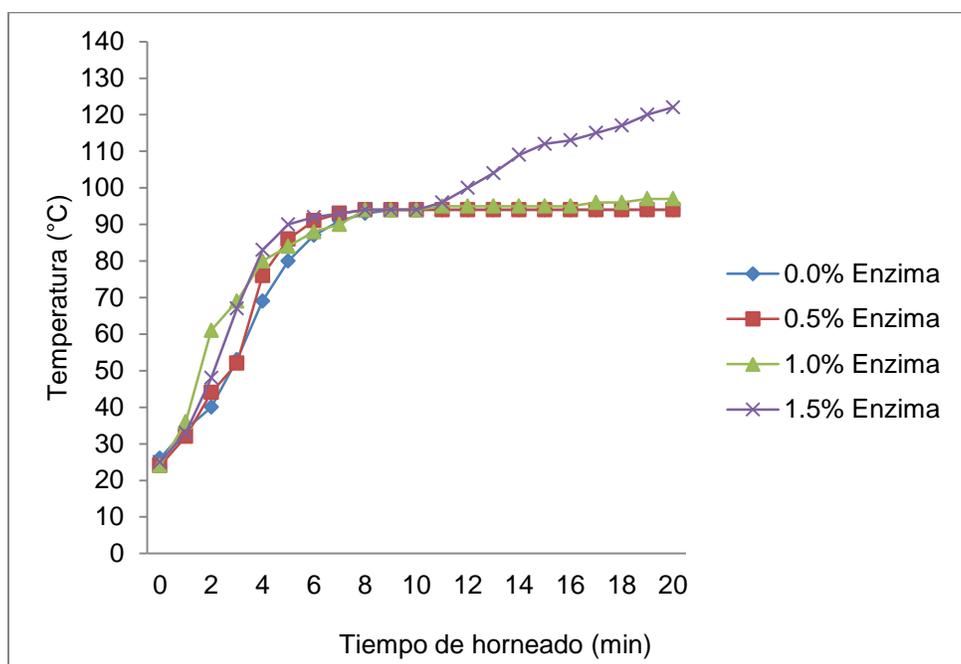


**Figura 13.** Gráfica de superficie de respuesta mostrando el efecto de la temperatura (Temp) y el pH (en valores codificados) sobre la actividad enzimática del complejo enzimático de  $\alpha$ -amilasa *Ultra Fresh® Premium Advantage, Corbion Caravan*.

Los resultados del estudio de la cinética enzimática del complejo enzimático de  $\alpha$ -amilasa contenida en el complejo enzimático de grado comercial *Ultra Fresh® Premium Advantage, Corbion Caravan*, tiene parámetros óptimos de reacción de la solución enzimática con una concentración de enzima: 0.5%, pH (3.54), tiempo (4 min), temperatura (72°C) y máxima actividad enzimática de 3.7248 mMol/L. Estos datos experimentales son información útil que fue correlacionada con los demás parámetros medidos en la pasta hojaldre, con el fin de estudiar su comportamiento en este tipo de sistemas alimenticios.

## 7.2 Curvas de temperatura interna durante el horneado.

En la figura 14 se han representado gráficamente las curvas de temperatura interna durante el horneado de las diferentes formulaciones de pasta hojaldre.



**Figura 14.** Curvas de temperatura interna durante el horneado de las diferentes formulaciones de pasta hojaldre.

La tendencia mostrada en la gráfica de la figura 14 fue que sin enzima la temperatura óptima se alcanzó gradualmente a lo largo del tiempo de horneado, llegando a 92°C al minuto 10 y manteniéndose así hasta el final del proceso de horneado. Después se observó que utilizando la concentración menor de la enzima  $\alpha$ -amilasa propuesta en el



experimento (0.5%), se alcanzó más rápido (6 min) la temperatura interna óptima de horneado en un producto panificado (92 °C), sin embargo cuando existe una mayor concentración de la enzima  $\alpha$ -amilasa ocurre un proceso diferente, el tiempo en el que alcanza la temperatura óptima de horneado es mayor y a su vez la temperatura es mayor, produciéndose una dextrinización mayor llevando a los productos a una sobre cocción, al contener más enzima, se da una hidrólisis mayor y como resultado más azúcar disponible, sin tener levaduras que lo puedan consumir como es en el caso de los productos fermentados, éste se acumula en la pasta produciendo durante el horneado una reacción de caramelización al grado en que el pan hojaldrado tiene una apariencia desagradable de quemado. La velocidad de calentamiento, el tiempo y la temperatura máxima alcanzada internamente en el pan hojaldrado durante la cocción se relacionan con la estructura interna de la matriz celular peculiar de la pasta hojaldrada, ya que ésta al no contener ningún agente leudante en su formulación es capaz de crecer hasta 600% de su volumen inicial. (Telloke G., 1991).

El levantamiento o crecimiento de la pasta hojaldrada se da gracias al agua contenida en las láminas de masa, la cual se convierte en vapor y que es capaz de derretir y hacer que la grasa atrapada entre láminas de masa alcance su punto de ebullición, y al no poder escapar, provoque que ésta se expanda; de esta manera se crean cavidades entre las láminas de un producto hojaldrado. Al hacer uso de un complejo de enzimas  $\alpha$ -amilasas, que trabajan en un rango de temperatura de entre 60°C - 78°C, aunque la estructura de la pasta cambia desde que las enzimas inmersas en la formulación se activan al entrar en contacto con el agua durante el amasado, es a 60-78°C que alcanzan su temperatura óptima de trabajo (72°C). Es por eso que se podría dar con más rapidez el incremento de la temperatura, al tener una mayor difusión de vapor entre las láminas alcanzando rápidamente la temperatura interna del producto. Podría considerarse que el uso de  $\alpha$ -amilasa tendría un efecto positivo en los costos de producción, pues hace más eficiente el proceso de horneado.

El grosor de las láminas de masa cambia muy poco durante el horneado y no hace una contribución significativa al espesor del producto horneado (Cauvain S., Young L., 2000).

Un parámetro clave de la calidad del pan es la temperatura interna final del pan. Una temperatura de 92-95 °C en el centro del pan al final de la cocción, es generalmente aceptada y es necesaria para saber que los componentes del pan han alcanzado su

completa cocción y se tiene un producto de calidad (Quaglia et al., 1991). La mayor parte de la expansión de la pasta hojaldre ocurrió en la primera mitad del tiempo de horneado, pero la mayor parte del agua debe ser expulsada antes de que la pasta sea lo suficientemente firme como para mantenerse estable sin colapsar (Le-Bail, Agrane, & Quevau, 2012; Patel, Waniska, & Seetharaman, 2005; Bosmans et al, 2013). Durante la primera parte del horneado (10 min) se alcanzó una temperatura de 65°C punto en el que se acelera la gelatinización del almidón y su parcial dextrinización. De igual manera este complejo enzimático alcanzó la temperatura óptima de trabajo (72°C como) es demostrado en los estudios de cinética enzimática, teniendo la mayor actividad enzimática a esta temperatura, ayudando así a que se alcanzara en menor tiempo la temperatura interna del pan reduciendo el tiempo de horneado de 20 min a 16 min, puesto que una vez que se alcanza en la temperatura interna, quiere decir que el producto está listo.

Al llevarse a cabo dichos fenómenos junto con la eliminación del agua utilizada en la expansión de las láminas la pasta cambió su consistencia plástica asumiendo una estructura frágil y “hojuelosa” pero estable, característica de este tipos de productos.

El proceso de gelatinización y el tiempo en el que la miga alcanzó la temperatura óptima de horneado (92°C), están directamente relacionados, ya que si la gelatinización del almidón se lleva a temperaturas menores, la estructura de la miga se forma en menor tiempo.



Figura 15. Medición de temperatura interna durante el horneado.

### 7.3 Análisis de pH

En el cuadro 6 se muestran los valores de pH de las masas así como del producto horneado.



**Cuadro 11. Valores de pH de las pastas hojaldre antes de hornear así como del producto horneado.**

| 100% Grasa  | Muestra      | pH masa                 | pH pan                 |
|-------------|--------------|-------------------------|------------------------|
| 0.0% enzima | F1 (control) | 5.7 <sup>a</sup> ± 0.07 | 5.4 <sup>a</sup> ±0.21 |
| 0.5% enzima | F2           | 5.6 <sup>a</sup> ± 0.12 | 5.3 <sup>a</sup> ±0.10 |
| 1.0% enzima | F3           | 5.7 <sup>a</sup> ± 0.12 | 5.5 <sup>a</sup> ±0.12 |
| 1.5% enzima | F4           | 5.7 <sup>a</sup> ± 0.14 | 5.3 <sup>a</sup> ±0.14 |

El pH de productos panificados de 5. 2 (Rosell et al., 2001). En este caso el pH en la pasta hojaldre está relacionado a la reología de la masa, ayudando a tener mayor extensibilidad y plasticidad en la masa, ya que el tener un pH ligeramente ácido fortalece el gluten pues la presencia de agentes oxidantes en la masa aumenta la formación de enlaces disulfuro en los extremos de las cadenas proteicas de glutenina que reaccionan entre sí, formando cadenas de gluten más largas y con ello confieren mayor extensibilidad a la masa, resultando en un beneficio durante el proceso de laminado haciéndolo más fácil (McGee, 2007). Al contrario, tener un pH muy ácido, resulta en un problema de encogimiento o expansión poco uniforme y colapso (dependiendo del producto final para el cual sea utilizada la pasta hojaldre en cuestión) de la pasta durante el horneado. En general, para tener un buen levantamiento de la pasta hojaldre es recomendable tener un pH en la masa de 4.2 – 5.8 (Telloke, 1991).

La formulación control (0.0% enzima) no presentó diferencias significativas con respecto a las otras formulaciones (0.5, 1.0, 1.5% enzima) mientras que las masas tuvieron niveles de pH ligeramente mayores a los productos horneados, se encuentran dentro de un rango aceptable para productos panificados, (5.3- 5.7). El pH también podría repercutir sobre el trabajo óptimo de la enzima dentro de la pasta hojaldre, sin embargo esto no fue así, ya que si bien, según los resultados de cinética enzimática el pH óptimo de la enzima es de 3.5, cabe destacar que esos estudios fueron realizados con almidón de papa, y está enzima está diseñada para trabajar en masas fermentadas. En el presente trabajo la enzima fue probada en un sistema alimenticio completamente diferente, que no es sometido a un proceso de fermentación, y es precisamente eso lo que se quería analizar, las diferencias que podría tener el emplear este tipo de enzimas en la pasta hojaldre con respecto a una masa fermentada. Lo que pasa en la pasta hojaldre es que al no llevarse a

cabo un proceso de fermentación, se encuentran más azúcares reductores disponibles en la pasta y esto tendrá tanto ventajas como desventajas, todo dependiendo de la concentración que se utilice, por ejemplo, al utilizar una concentración de enzima moderada en la pasta hojaldre (0.5%) se aprecia que es más fácil llevar a cabo el proceso de laminado, ya que las dextrinas liberadas gracias a que una vez que es agregada la enzima  $\alpha$ -amilasa, se cataliza la adición de una molécula de agua a cada enlace glicosídico, rompiendo así las cadenas de amilosa y amilopectina (García, 1964). Siendo el efecto principal de las amilasas sobre la pasta hojaldre observado, el ligero reblandecimiento de la masa producido por la liberación del agua absorbida por los gránulos de almidón hidrolizados. Y al haber una concentración mayor (1.5%) de  $\alpha$ -amilasas se observó que las masas se tornaban pegajosas y de difícil manipulación volviendo más lento el proceso de laminado porque habría mayor hidrólisis.

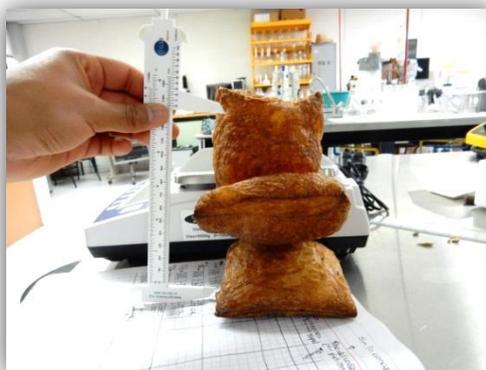
#### 7.4 Volumen específico

El levantamiento o crecimiento de la pasta hojaldre se da por medio de un leudado físico, gracias al agua contenida en la masa y que se encuentra dispersa en las láminas de masa. La grasa contenida en la pasta hojaldre se funde por la temperatura del horneado, esto genera incremento de la temperatura interna de la masa, lo cual hace que el agua contenida en la misma pase a una fase de vapor como consecuencia de la temperatura a la que se lleva el proceso de horneado (205°C), generando la expansión y la laminación en el producto final (Cauvain y Young, 2000).

La Figura 16 muestra el incremento del volumen en las pastas de las diferentes formulaciones durante el horneado.



**Figura 8.** Incremento del volumen en la pasta hojaldre durante el horneado.



**Figura 97.** Formulación 4 (100% grasa, 1.5% enzima  $\alpha$ -amilasa), muestra un volumen específico excesivo, un indicador de mala calidad en productos elaborados con pasta hojaldre.

El cuadro 12 presenta los resultados obtenidos de las mediciones de volumen específico que fueron realizadas a la pasta hojaldre antes y después del horneado. El volumen inicial fue igual tanto en la formulación control como en las formulaciones experimentales. El pan control presentó un volumen específico menor en comparación con las formulaciones adicionadas con la enzima  $\alpha$ -amilasa. Aunque el volumen fue creciendo conforme la concentración de enzima  $\alpha$ -amilasa aumentó, la formulación con 1.0% de enzima  $\alpha$ -amilasa aumentó más su volumen específico en comparación a las demás formulaciones, provocando que la estructura fuera inestable y que al final, durante el enfriamiento, colapsara. La formulación control (F1) no presentó diferencia significativa ( $668.33a \pm 33.11$ ) con respecto a la formulación 2 con 0.5% enzima ( $720.00a \pm 50.99$ ), sin embargo con las otras dos formulaciones (F3 y F4) sí presentó diferencia significativa. A medida que la concentración de la enzima  $\alpha$ -amilasa se incrementó en la masa, el volumen también aumentó. Sin embargo los panes que tenían un volumen mayor no presentaron uniformidad en las cavidades, lo cual resulta en un problema de calidad, porque se vuelven más frágiles y poco manejables. Por lo tanto, un pan con bajo volumen, es un símbolo de baja calidad, así como también lo es un producto con un volumen considerablemente excesivo.

Goesaert (2009) encontró que la adición de la enzima  $\alpha$ -amilasa incrementa el nivel de azúcares fermentables, promoviendo la fermentación de la levadura y en consecuencia mayor expansión de la masa. Sin embargo por la naturaleza de la pasta hojaldre producto que no contiene levadura lo que podría estar ocurriendo es que el volumen haya aumentado conforme a la concentración de enzima  $\alpha$ -amilasa, debido a que se generó



una mayor cantidad de dextrinas, las cuales absorben la humedad y mantienen la masa humectada, evitando que se pierda agua durante el amasado, y al retener agua hasta llegar al proceso de horneado, se produzca una cantidad mayor de vapor generando una mayor expansión entre las láminas de masa logrando que el volumen aumente conforme aumenta la concentración de enzima en la formulación del hojaldre, dejando en claro que un volumen excesivo es sinónimo de mala calidad.

La hidrólisis que genera la enzima en la pasta hace que el vapor generado tenga una mejor difusividad del agua en forma de vapor a través de sus láminas. Lo cual va a permitir que con un menor contenido de grasa (20% menos) haya una mejor distribución, disminuir costos, y obtener productos con un contenido menor de grasa, desde el aspecto salud.

**Cuadro 12. Valores de volumen específico de las diferentes formulaciones de pasta hojaldre antes y después del horneado.**

| 100% Grasa  | Muestra      | volumen de masa (cm <sup>3</sup> ) | volumen pan horneado (cm <sup>3</sup> ) |
|-------------|--------------|------------------------------------|---|
| 0% enzima   | Control (F1) | 100                                | 668.33 <sup>a</sup> ± 33.11             |
| 0.5% enzima | F2           | 100                                | 720.00 <sup>a</sup> ± 50.99             |
| 1.0% enzima | F3           | 100                                | 1271.66 <sup>c</sup> ± 224.26           |
| 1.5% enzima | F4           | 100                                | 896.66 <sup>b</sup> ± 87.78             |

Quaglia et al., (1991) refiere que cuando la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa es mayor al 2% con respecto al peso de la masa, su estructura puede volverse tan fluida que la pieza de pan se colapsará completamente. En este caso, no se volvió fluida, pero si pegajosa y muy difícil de trabajar. Al utilizar 1.5% de enzima, se estuvo de acuerdo con el autor, no es recomendable utilizar esta cantidad o una mayor, en la pasta hojaldre porque se obtendría un resultado no deseado.

En los estudios realizados por Kim (2006), se demostró que al agregar la enzima  $\alpha$ -amilasa obtenida de hongos, al pan, se tienen efectos positivos en el volumen específico. Błaszczak (2004) estudió el efecto de enzimas alfa-amilasas (bacteriana y fungal) en los cambios estructurales de la masa y el pan, midiendo el volumen específico y concluyeron que los panes adicionados con las enzimas presentaron mayor volumen específico con respecto al pan control. Por lo anterior se puede decir que al agregar enzima  $\alpha$ -amilasa en



una concentración moderada (0.5%) se tienen efectos positivos en el volumen específico. No siendo así cuando se agrega un porcentaje elevado (1.0, 1.5%).

### **7.5 Análisis del perfil de textura TPA: fracturabilidad y dureza**

La dureza o firmeza de la miga es el atributo de la textura que ha atraído más atención en la estimación de la calidad de la misma debido, quizás a la estrecha asociación que tiene con la percepción sensorial de frescura (Ordoñez & Osorio, 2013). El cuadro 8 muestra los valores de dureza de las cuatro formulaciones. Los resultados de dureza, presentaron el siguiente efecto: cuando la concentración de  $\alpha$ -amilasa se incrementó, los valores de dureza aumentaron, con respecto al control.

Durante la gelatinización, las cadenas de amilosa y amilopectina se liberan del gránulo de almidón, por el calentamiento al que son sometidas durante el horneado y al agua del sistema; se solubilizan cuando el sistema se enfría y almacena debido a que la amilosa y amilopectina forman dobles hélices y cristalizan (Sahlström & Bråthen, 1997).

Derde (2012) menciona que la cristalización del almidón contribuye a la textura del pan, debido a que con el posterior enfriamiento, la amilosa se cristaliza, y es co-responsable de la firmeza inicial del pan, dando paso a la estructura característica del pan, firme pero desmoronable. Durante el proceso de horneado se lleva a cabo la gelatinización del almidón, donde la amilosa y la amilopectina son hidrolizadas por la enzima  $\alpha$ -amilasa, generándose así cadenas cortas (dextrinas de bajo peso molecular), que participan en las reacciones de caramelización en el pan. En base a esto, a mayor concentración de enzima  $\alpha$ -amilasa adicionada, mayor generación de dextrinas. En consecuencia al final del horneado, el contenido de amilosa retrogradada será mayor, y esto se verá reflejado en un aumento de la firmeza de la miga de pan.

Cuando es agregada una concentración mayor de enzima, ésta hidroliza con más facilidad los gránulos de almidón, teniendo como resultado una mayor cantidad de azúcares reductores (dextrinas) presentes en la pasta hojaldre, los cuales servirían como alimento para levaduras si se tratara de una masa fermentada, sin embargo, en este caso al no haber levaduras, estos azúcares reductores en forma de dextrinas, resultados de la hidrólisis catalizada por la  $\alpha$ -amilasa, permanecen en la masa, “deformándola” al modificar la estructura de las láminas (efecto que puede observarse con claridad en el apartado 7.8 donde se llevó a cabo un análisis de las muestras a través de microscopia confocal de barrido láser) y con las “microrupturas” que se generan al deformarse las láminas por la acción de las enzimas, dándose un reacomodo de las dextrinas pudiendo éstas estarse

reagrupando durante el horneado y el enfriamiento del pan, de tal manera que dicho reagrupamiento afecte la dureza del pan, creando microcapas de (dextrinas) en las láminas de la pasta hojaldre formadas durante el proceso de horneado, volviendo el pan más duro, al mismo tiempo que se podría pensar que si se forma dicha capa en las láminas, también consecuentemente podría ser esa la razón por la que la fracturabilidad aumentó, esta “capa de dextrinas” en las láminas vuelve más frágil la estructura de este tipo de productos panificados, siendo así que se apreciara un aumento en los valores de fracturabilidad directamente proporcional al aumento de la concentración de  $\alpha$ -amilasa.

**Cuadro 13. Dureza del pan hojaldre**

| 100% Grasa  | Dureza pan (gf)          | Fracturabilidad pan (N.mm) |
|-------------|--------------------------|----------------------------|
| 0% enzima   | 16.26 <sup>b</sup> ±0.56 | 6.46 <sup>a</sup> ±1.49    |
| 0.5% enzima | 16.89 <sup>b</sup> ±2.31 | 7.03 <sup>ab</sup> ±0.93   |
| 1.0% enzima | 18.59 <sup>a</sup> ±2.88 | 8.37 <sup>b</sup> ±0.97    |
| 1.5% enzima | 20.17 <sup>c</sup> ±0.75 | 11.98 <sup>c</sup> ±1.13   |



**Figura 18.** Medición de TPA en pasta hojaldre horneada.

El volumen específico es un parámetro importante, relacionado con la textura del pan, ya que estudios anteriores han demostrado que el incremento total en la firmeza de la miga



depende del volumen específico del pan, migas suaves corresponden con panes de volumen específicos más altos. (Armero & Collar, 1998), sin embargo la estructura particular de la pasta hojaldre hace que esto no sea así, al contar una mejor difusión del agua y a que el contenido de enzima más elevado, hace que el pan se reseque volviéndose más duro pero a su vez más frágil y muy fracturable al mismo tiempo.

## 7.6 Color

El cuadro 9 muestra los parámetros de color L\*, a\* y b\* del pan hojaldre obtenido. El pan hojaldre formulado sin la enzima  $\alpha$ -amilasa presentó un valor de luminosidad mayor con respecto a las formulaciones que contienen la enzima  $\alpha$ -amilasa, es decir, a mayor concentración de la enzima  $\alpha$ -amilasa, los valores de luminosidad disminuyen. L\* se puede considerar como equivalente a un miembro de la escala de grises, entre blanco y negro (Granato & Masson 2010; Pathare et al., 2013). El valor a\*, fue positivo en todos los casos, es decir las formulaciones presentaron matices de color rojo. El valor de a\* aumentó conforme la concentración de enzima aumentó, la formulación control resulto significativamente diferente de las 3 formulaciones experimentales, las cuales presentaron valores similares. Los valores de b\* de las cuatro formulaciones, fueron positivos, esto significa que la costra del pan hojaldre presenta matices de color amarillo. El valor mayor de b\* se presenta en la formulación sin la enzima  $\alpha$ -amilasa y el valor menor de b\* cuando la concentración de la enzima  $\alpha$ -amilasa fue de 1.5%.

Cuadro 14. Parámetros de color del pan hojaldre.

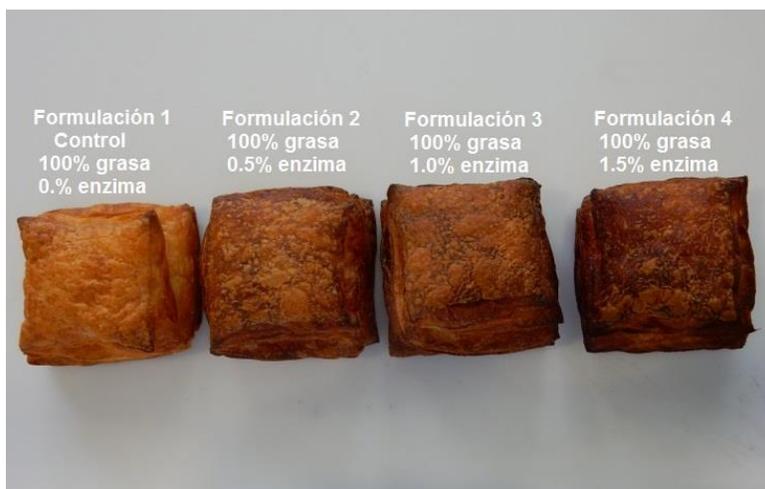
| 100% Grasa  | L* pan                   | a* pan                   | b* pan                   |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0% enzima   | 32.60 <sup>c</sup> ±1.19 | 3.65 <sup>a</sup> ±0.71  | 14.19 <sup>b</sup> ±0.70 |
| 0.5% enzima | 29.47 <sup>b</sup> ±1.27 | 4.30 <sup>ab</sup> ±0.76 | 13.56 <sup>b</sup> ±0.37 |
| 1.0% enzima | 27.82 <sup>b</sup> ±1.16 | 4.56 <sup>ab</sup> ±0.43 | 11.47 <sup>a</sup> ±0.50 |
| 1.5% enzima | 23.51 <sup>a</sup> ±0.41 | 4.86 <sup>b</sup> ±0.86  | 11.22 <sup>a</sup> ±1.37 |

El color deriva principalmente de las reacciones de caramelización, fenómeno físico-químico que implica degradación térmica de azúcares sin la participación de aminos también toma lugar (Hutchings, 2002) las cuales se inician cuando la temperatura de cocción supera los 150°C (Ramírez et al., 2003). La evaporación del agua al interior del

pan hojaldre, hace que la temperatura de la masa no suba de 100 °C. Cuando no llega suficiente humedad a la superficie del pan, ésta se seca y empieza a formar una corteza impermeable. Al tener presente una cantidad considerable de grasa, se da también una reacción de pardeamiento por fritura (Hernandez, 2010).

Diversos factores afectan el grado de pardeamiento que ocurre a través de la reacción de Maillard. En primer lugar, debe estar presente un aldehído (azúcares reductores que se encuentran frecuentemente en los sistemas de alimentos) y una amina (las proteínas constituyen la fuente más importante de estos grupos). Al reaccionar, forman una imina, a través de una serie de complejas reacciones que finalmente produce sabores, complejos aromáticos y pigmentos de color pardo conocidos con el nombre de “melanoidinas”. (Ramírez et al., 2003), responsables del color marrón del pan (Michalska et al., 2008). Una pasta de almidón que gelatiniza, generará dextrinas y, que finalmente, caramelizarán para dar tanto color como brillo. (Cauvaín & Young, 2002)

La Figura 13 presenta la corteza de los 4 panes; se puede observar una distribución del color más uniforme y una corteza que se torna más oscura, conforme el aumento de enzima alfa amilasa en la formulación del pan.



**Figura 19.** Color en la corteza de los panes hojaldrados de las 4 formulaciones distintas.

La formulación 4 (1.5% enzima) produjo una mayor cantidad de azúcares, debido a que presenta una mayor actividad enzimática, esto se ve reflejado en un valor menor de Luminosidad.



Por el contrario, el control (0.0% enzima), tuvo una menor cantidad de azúcares disponibles, debido a que su actividad enzimática fue menor, presentó el efecto contrario. De acuerdo a Primo (1997) poca actividad de  $\alpha$ -amilasa produce una corteza pálida. De esta forma es que el control presenta valores mayores de Luminosidad, pues tiende a blanco, y el valor mayor en  $b^*$  con respecto a las demás formulaciones, es decir que presenta matices amarillentos.

Es perjudicial una cantidad excesiva de dextrinas en el pan durante las últimas fases del horneado. Si se produce un exceso de dextrinas, el pan después de horneado, presentará una corteza oscura y el producto parecerá quemado (Cauvaín, 2002). Las características deseadas de la corteza varían con el producto y, con frecuencia, se estiman subjetivamente. (Cauvaín & Young, 2002). Todo dependerá del consumidor; por lo general, una corteza con un color pálido se asocia con un producto crudo; se prefiere un pan cuya corteza presente una coloración marrón. Sin embargo viene el contraste, ya que si la corteza presenta un color demasiado oscuro, llega a ser rechazado, al ser asociado a un pan quemado o demasiado tostado.

### **7.7 Método de extracción Soxhlet**

El contenido de grasa de las muestras fue calculado en base al peso de las muestras secas de pasta hojaldre. Fue medido el porcentaje de grasa tanto en la pasta hojaldre cruda así como en el pan con el fin de hacer una comparación entre antes y después del horneado para saber si es posible utilizar una cantidad menor de grasa durante el proceso de laminado. La grasa juega un papel crucial en las masas laminadas (McGill, 1975; Alexandersen, 2005; Kirkeby, 2007). Ya que si no se usa una materia grasa adecuada y suficiente, al llevar a cabo el laminado, se rompen las láminas de masa, dañando la “barrera” de vapor que ayuda al levantamiento y a la formación característica de este tipo de productos panificados, teniendo como resultado un producto apelmazado y de mala calidad (Deligny y Lucas, 2014). El que la masa se encoja es un parámetro de mala calidad el cual está directamente relacionado al uso de poca cantidad de grasa durante el laminado (Bousquires, 2014). Los resultados se presentan en el cuadro 15.

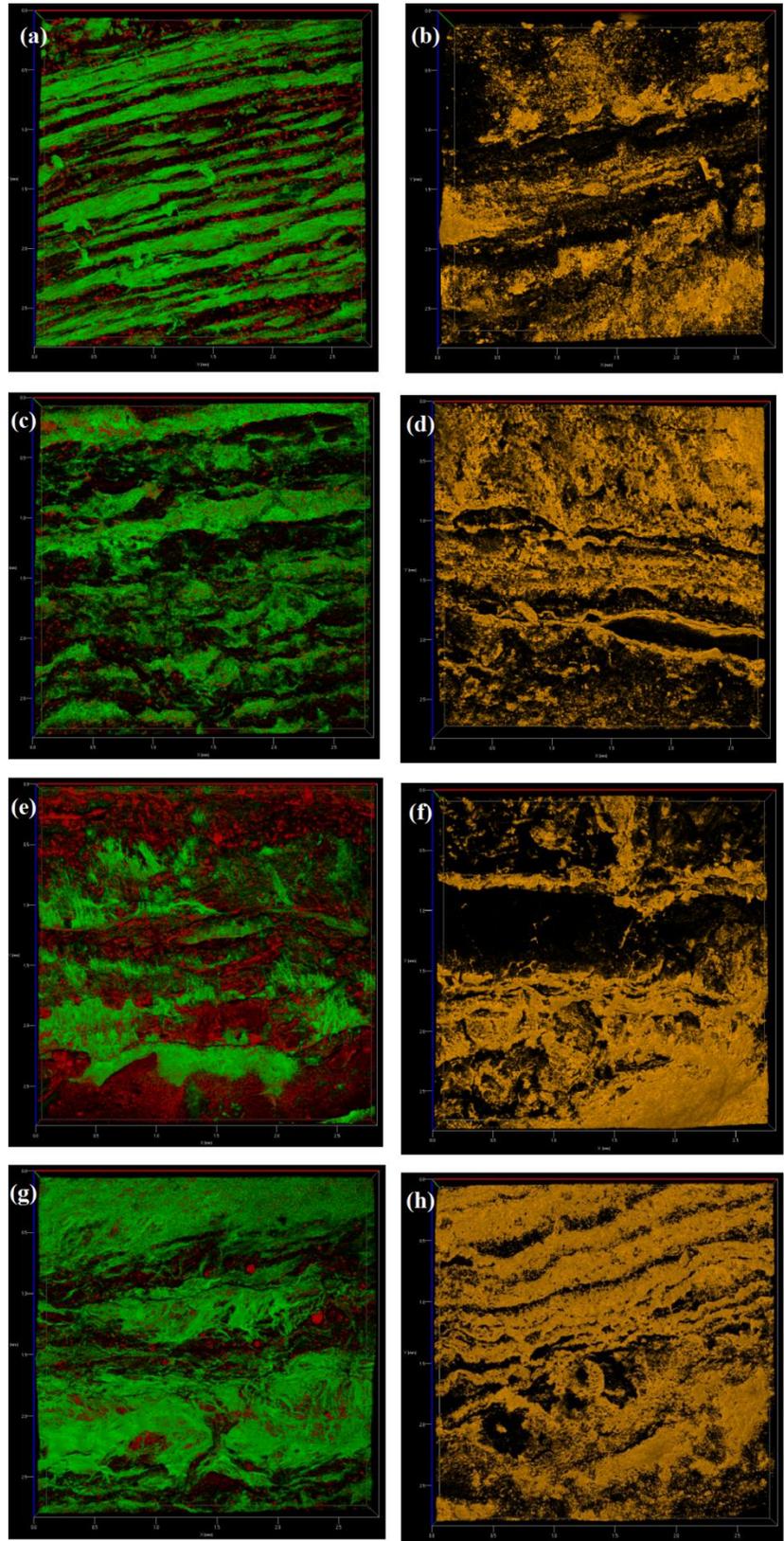


**Cuadro 15. Análisis de la determinación del contenido de extracto etéreo, tanto en la pasta hojaldre antes como después del horneado.**

| <b>100% Grasa</b>  | <b>Soxhlet masa (%)</b>   | <b>Soxhlet pan (%)</b>   |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>0% enzima</b>   | 38.41 <sup>ab</sup> ±0.19 | 36.34 <sup>b</sup> ±0.11 |
| <b>0.5% enzima</b> | 37.75 <sup>b</sup> ±0.16  | 31.56 <sup>a</sup> ±0.38 |
| <b>1.0% enzima</b> | 37.37 <sup>b</sup> ±0.39  | 31.52 <sup>a</sup> ±0.80 |
| <b>1.5% enzima</b> | 37.31 <sup>b</sup> ±0.37  | 31.20 <sup>a</sup> ±0.66 |

Tanto en la formulación control como en las formulaciones experimentales de pasta hojaldre cruda, fue encontrado un porcentaje de 37-38% de grasa, sin encontrar diferencia estadística significativa, esto se debe a que la grasa se encuentra atrapada entre las láminas de masa y no tiene forma de liberarse, como para ser perdida de alguna manera. Mientras que en las muestras de pasta hojaldre horneada si se encontró diferencia significativa en la muestra control (0.0% enzima) comparándola con las formulaciones donde la enzima  $\alpha$ -amilasa se encontraba presente (0.5, 1.0, 1.5%). Lo anterior podría explicarse por la presencia de la enzima  $\alpha$ -amilasa y a la hidrólisis que lleva a cabo en las láminas de masa, puesto que la temperatura que alcanza la grasa permite llevar a cabo dichas reacciones deseadas en el pan gracias a los azúcares reductores y las aminos de las proteínas presentes en la pasta hojaldre.

## 7.8 Análisis de imágenes



**Figura 20.** Imágenes de microscopia confocal de barrido láser (CSLM) de las diferentes formulaciones de pasta hojaldre sin hornear:

- (a,b) formulación control (0.0% enzima)
- (c,d) formualción 2 (0.5%enzima)
- (e,f) formulación 3 (1.0% enzima)
- (g,h) formulación 4 (1.5% enzima)



Las muestras fueron analizadas de acuerdo a lo establecido por Bousquieres et al. (2014). Con el fin de visualizar las láminas de masa y grasa separadamente con técnicas de microscopia confocal de barrido láser (CLSM por sus siglas en inglés), tres fluorocromos fueron necesarios para poder teñir la muestra y visualizarla mejor: fluoresceína al 0.5% (FICT; Sigma Chem Co, St. Louis, MO, USA), rodamina B al 0.5% (Sigma Chemicals solutions) (Díaz-Ramírez et al., 2013) y rojo Nilo (Sigma Aldrich) fue utilizado para visualizar el comportamiento de la grasa en la pasta hojaldre.

Las muestras fueron teñidas con FICT el cual tiñe principalmente proteínas (verde) y en segundo lugar, Rodamina B que reacciona más específicamente con almidón (rojo) (Díaz-Ramírez et al., 2013). Con el propósito de saber el comportamiento de las láminas de masa, si se pueden apreciar las deformaciones de las que se habla en la hipótesis y su efecto sobre la distribución e interacción de los principales componentes, así como los cambios en los gránulos de almidón conforme al aumento del porcentaje de  $\alpha$ -amilasa utilizado en las formulaciones estudiadas.

Arzate et al. (2012) mencionan que los resultados de microscopia dependen del tipo de microscopia y el campo de vista utilizado para evaluar las muestras.

La figura 14 muestra la pasta hojaldre analizada con CLSM, donde se puede observar que la miga de la pasta hojaldre es un sistema complejo formado mediante la interacción entre almidón y proteínas (a,c,e,g) y a su vez, se observa la presencia de la grasa (b,d,f,h). La distribución de los componentes es homogénea en la formulación 1 (a), donde se puede apreciar una red de proteínas con forma de líneas paralelas simétricas (verde) y los gránulos de almidón (puntos rojos) bien definidos y continuos en toda la imagen. En esta imagen el componente principal parece ser el red de proteínas, pero conforme va aumentando la concentración de enzima  $\alpha$ -amilasa, el sistema pareciera que se mezcla, las líneas paralelas ya no parecen simétricas y los gránulos de almidón se disipan hasta parecer que tanto las proteínas como los gránulos de almidón, se encuentran mezclados. Este efecto podría deberse a que las  $\alpha$ -amilasas empiezan a trabajar desde que entran en contacto con el agua (18°C) (Tejero, 2011). A pesar de no haber sido sometidas a cocción, las enzimas ejercen su trabajo hidrolítico sobre los gránulos de almidón afectando así la estructura en general de la pasta hojaldre puesto que la hidrólisis y



pérdida de forma de los gránulos de almidón es reconocible a simple vista. Por otro lado se encuentran las imágenes que fueron captadas al utilizar el fluorocromo Rojo Nilo, el cual tiñe principalmente a los lípidos. En la figura 14 (b,d,f,h) se puede observar la distribución de la grasa, y si bien hubiese sido necesario una tinción de contraste, se puede observar con claridad de igual manera que al darse un incremento de la concentración de enzima  $\alpha$ -amilasa, la grasa tiende a encontrarse más expuesta, más visible y en mayor cantidad conforme la amilasa aumenta. Este fenómeno podría deberse a un reacomodo de todos los componentes de la pasta hojaldre, tanto del gluten, así como de los gránulos de almidón hidrolizados que cambian mucho durante dicha hidrólisis.

Después de determinar la mejor concentración para trabajar con una enzima  $\alpha$ -amilasa al 0,5%, se ensayaron diferentes porcentajes de grasa para el proceso de laminación. Los resultados se discuten a continuación.

### **7.8 Análisis del porcentaje de grasa sobre una concentración de 0.5% de $\alpha$ -amilasa en la pasta hojaldre**

En el cuadro 11 se puede observar que en comparación con el volumen inicial de las masas, el valor más grande es de la muestra que fue elaborada con un porcentaje de grasa mayor, el valor más bajo le corresponde a la muestra con el porcentaje de grasa menor. Lo cual habla de la importancia que representa el utilizar una cantidad considerable de grasa para obtener un mayor volumen, que en este caso de productos panificados, el no tenerlo, se asocia a un apelmazamiento que es igual a una baja calidad por parte del consumidor. Habiendo diferencias significativas entre las tres muestras.

En cuanto a los valores de pH de las masas y las pastas no presentaron diferencias significativas entre sí, sin embargo, después del horneado el pH se reduce en promedio de 0.4, esto se debe a que durante el horneado la composición fisicoquímica del pan se dan cambios químicos importantes.

La luminosidad del pan presenta un incremento conforme el porcentaje de grasa disminuye, esto puede deberse a que la grasa permite alcanzar durante el horneado temperatura llevarse a cabo reacciones de pardeamiento.

Estadísticamente no se aprecian diferencias significativas entre las muestras hechas con



80% de grasa y 60%. Sin embargo las muestras 100% y 80% no muestran diferencias significativas. La muestra 100% muestra diferencias significativas respecto a la muestra 60%. El parámetro  $a^*$  se aumenta de igual manera conforme al porcentaje de grasa aumenta. La muestra 100% ( $4.30^a \pm 0.76$ ) muestra diferencias significativas con respecto a las muestras 80% ( $5.54^b \pm 0.37$ ) y 60% de grasa ( $5.31^b \pm 0.54$ ). A su vez estas últimas no muestran diferencias significativas entre sí. Por otro lado,  $b^*$  aumenta conforme el porcentaje de grasa es menor. Siendo así que la muestra 100% muestra diferencias significativas respecto a 80% y 60%. Estas últimas no representan diferencias significativas.

En cuanto a la fracturabilidad, se puede ver un aumento conforme el porcentaje de grasa es menor. No habiendo diferencias significativas entre la muestra  $f_1$  y  $f_2$ , pero sí con  $f_3$ . La dureza también aumenta. No encontrando diferencias significativas entre  $f_1$  y  $f_2$ , pero sí con  $f_3$ . Esta última presenta un valor muy elevado de dureza, lo cual se debe a que la grasa da suavidad al pan, al disminuir este ingrediente de la formulación, la calidad del producto baja.

Los valores de extracto etéreo son significativamente diferentes estadísticamente. Esto es obvio ya que se utilizaron porcentajes diferentes de grasa, pero al analizar la masa cruda y la pasta hojaldrada horneada se observa que durante el horneado se da una expulsión de grasa del 7.6% para la formulación 2. Siendo esta la más alta en comparación con la muestra 1 y 3.



**Cuadro 16. Análisis del porcentaje de grasa sobre una concentración de 0.5% de  $\alpha$ -amilasa en la pasta hojaldré**

| Muestra | Volumen de masa (cm <sup>3</sup> ) | Volumen pan horneado (cm <sup>3</sup> ) | pH masa                   | pH pan                   | L* pan                     | a* pan                   | b* pan                    | Fracturabilidad pan (N.mm) | Dureza (gf) pan           | Masa soxhlet              | Pan soxhlet               | Grasa perdida durante el horneado (%) |
|---------|------------------------------------|---|---------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| F1      | 100                                | 720.00 <sup>c</sup> ± 50.99             | 5.68 <sup>ab</sup> ± 0.12 | 5.38 <sup>a</sup> ± 0.10 | 29.47 <sup>a</sup> ± 1.27  | 4.30 <sup>a</sup> ± 0.76 | 13.56 <sup>a</sup> ± 0.37 | 7.03 <sup>a</sup> ± 0.93   | 16.89 <sup>a</sup> ± 2.31 | 37.75 <sup>c</sup> ± 0.16 | 31.56 <sup>c</sup> ± 0.38 | 6.2                                   |
| F2      | 100                                | 646.66 <sup>b</sup> ± 16.32             | 5.77 <sup>ab</sup> ± 0.16 | 5.39 <sup>a</sup> ± 0.15 | 33.00 <sup>ab</sup> ± 2.35 | 5.54 <sup>b</sup> ± 0.37 | 14.57 <sup>b</sup> ± 1.10 | 8.59 <sup>a</sup> ± 0.43   | 17.02 <sup>a</sup> ± 3.00 | 30.37 <sup>b</sup> ± 0.42 | 22.77 <sup>b</sup> ± 0.67 | 7.6                                   |
| F3      | 100                                | 398.33 <sup>a</sup> ± 31.88             | 5.89 <sup>b</sup> ± 0.13  | 5.35 <sup>a</sup> ± 0.15 | 35.10 <sup>b</sup> ± 0.95  | 5.31 <sup>b</sup> ± 0.54 | 14.58 <sup>b</sup> ± 1.02 | 10.67 <sup>b</sup> ± 1.41  | 33.95 <sup>b</sup> ± 2.17 | 22.81 <sup>a</sup> ± 0.20 | 16.16 <sup>a</sup> ± 0.50 | 6.7                                   |

F1=100% Grasa utilizada en el laminado (Control), F2 = 80% Grasa utilizada en el laminado, F3= 60% Grasa utilizada en el laminado. Todas las formulaciones fueron elaboradas con 0.5% de enzima  $\alpha$ -amilasa.

Resultados con la misma letra superíndice dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (P>0.05)

Resultados de tres replicas  $\pm$  la desviación estándar



## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación demostraron que al utilizar una mezcla de enzimas  $\alpha$ -amilasa al 0.5% en base al peso de la harina, mejora las propiedades térmicas y fisicoquímicas tanto de la pasta cruda, como del producto final. El adicionar la enzima  $\alpha$ -amilasa, mejora el proceso de horneado, debido a que acelera los procesos de gelatinización del almidón, llevándose a cabo a una temperatura menor en comparación al control. Además las enzimas hidrolizan los gránulos de almidón, crean micro-rupturas en la estructura laminar de la pasta hojaldre, haciendo que el vapor producido durante el horneado tenga una mejor difusión a lo largo de las láminas, Y que a su vez la pasta hojaldrada expulsa 7.6% de grasa durante el horneado, optimizando así el tiempo de horneado y hace que sea posible reducir el porcentaje de grasa utilizado durante el laminado sin cambiar las características fisicoquímicas de la pasta hojaldre de 100% a 80%, es decir se puede reducir 20% de grasa que se utiliza durante el laminado.

## 9. REFERENCIAS

- AACC. (2010). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, Approved Methods Committee 11<sup>th</sup> Ed., St.Paul, Minnesota, E.E. U.U.
- Adney, B., Baker, *Measurement of Cellulase Activities*. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical, Report NREL/TP-510-42628. 1996, 1-8.
- AIB (1994). *Applied Baking Technology*. Manual de capacitación y desarrollo de la panificación. Capítulo 16: Masas laminadas, danés y croissant. The American Institute of Baking. Manhattan, Kansas, E.E. U.U.
- Alexandersen, K.A. (2005). *Margarine processing plants and equipment*. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Fereidoon Shahidi, p. p. 519-523.
- AOAC, (1990). *Methods of the Association of official Analytical Chemist*. 15<sup>th</sup> ed. AOAC, Method No. 920.85, Arlington, VA, USA, pág. 780
- Armero, E., & Collar, C. (1998). *Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives*. *Journal of Cereal Science*, 28(2), 165-174.
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J.J., Calderón-Domínguez, G. et al. (2012). *Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy*



*techniques and texture image analysis*. Carbohydrate polymers, Año 14, Vol.87, p.p.289–299.

- Bedón G. M., Nolasco C. O., Santa Cruz C. C., Gutierrez R. A. (2013) *Partial purification and characterization of alpha amylase from germinated grains from Chenopodium quinoa (Quinoa)*. ECIPerú Magazine Vol. 10, No. 1, p. p. 51- 57.
- Błaszczak, W., Sadowska, J., Rosell, C. M., & Fornal, J. (2004). *Structural changes in the wheat dough and bread with the addition of alpha-amylases*. *European Food Research and Technology*, 219 (4), p. p. 348-354.
- Blonk, J.C.G., (2002). *Viewing food microstructure*. In: Welti-Chanes, J., Barbosa-Canovas, G.V., Aguilera, J.M. (Eds.), *Engineering and Food for the 21st Century*. CRC Press, Boca Raton.
- Bousquieres, J, Deliyiny, C., Riaublanc, a., Lucas, T. (2014<sup>b</sup>). *CLSM study of layers in laminated dough: Roll out of layers and elastic recoil*, *Journal of Cereal Science*. Vol. 13, No. 2, p. p. 345-346.
- Bousquieres, J., Deligny, C., Lucas, T., (2014<sup>a</sup>). *Using Confocal Laser Scanning Microscopy to Examine the Breakdown of Fat Layers in Laminted Dough*. *International Journal of Food Research* Vol. 16, No. 10, pág. 135
- Bowles LK. (1996). *Amylolytic enzymes*. In: *Baked goods freshness: Technology, evaluation and inhibition of staling*. Editado por Hebeda RE y Zobel H.F. Marcel Dekker, New York. EUA.
- C. Gonçalves, R. M. Rodriguez-Jasso, N. Gomes, J. A. Teixeira, I. Belo, *Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates*, *Analytical Methods*, 2, (2010) 2046–2048.
- C. Melander, E. Andersson, S. Axelsson. *Determination of reducing ends with flow injection analysis with amperometric detection: application to enzyme hydrolysed methylcellulose*, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2585–2593.
- Caballero, P. A., Gomez, M., & Rosell, C. M. (2006). *Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour*. *Journal of European Food Research and Technology*. 10(5), 221-225.
- Cauvain, S. P., & Chamberlain, N. (1988). *The bread improving effect of fungal  $\alpha$ -amylase*. *Journal of Cereal Science*, 8(3), 239-248.
- Cauvain, S. P., & Young, L. (2002). *Fabricación de pan*. 1<sup>a</sup>. ed., Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1-79.
- Cauvain, S. P., & Young, L. S. (2009). *Tecnología de panificación*. SP: Manole.



- Cauvain, S.P., Telloke, G.W. (1993). *Danish Pastries and Croissants*. FMBRA Report No. 153. CCFRA, Chipping Campden, UK.
- Cauvain, S.P., Young, L.S., (2001). *Baking problems solved. In: Ch. 8: Laminated Products*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge, UK, p.p. 124-135.
- Conde D. (2014). Estudio de la fermentación en panes funcionales, reducidos en carbohidratos, grasa y sal. Tesis de maestría. Universidad Tecnológica Regional, Argentina. Pág.4. Disponible en: <http://www.frd.utn.edu.ar/sites/default/files/CarrerasPos/Tesis%20Conde%20Molina.pdf> Consultado el 21 de enero de 2017, 7:03 p.m.
- Cortes M. (2004). *Cómo ha incidido la tecnología enzimática en el bienestar de la humanidad*. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XIII, núm.1, 2011, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. pp. 5-7.
- Deligny, C., Collewet, G., Lucas, T., 2014. *Quantitative MRI study of the layers in Danish pastry during proving*. Submitted to Food Biophysics Journal.
- Deligny, C., Lucas, T., 2014. *Effect of the number of fat layers on expansion of Danish pastry during proving and baking*. Submitted to J. Cereal Science.
- Derde, L. J., Gomand, S. V., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2012). *Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable  $\beta$ -amylase, maltotetraogenic and maltogenic  $\alpha$ -amylases*. Food Chemistry, 135(2), 713-721.
- Díaz Ramirez, M., Calderón Dominguez, G., Chanona Pérez J., Janovitz Klapp A., López Santiago R., Farrera Rebollo A., Salgado Cruz M. (2013) *“Modelling sorption kinetic of sponge cake crumb added with milk syrup”*. International Journal of Food Science and Technology 2013, 48, p.p. 1649–1660
- Díaz, M. (2006). *“Estudio de empaqueo en atmosfera modificada para productos de panificación tipo hojaldre”* Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UAEMex.
- Domingues, D.J., Lonergan, D.A., 2007. *Refrigerated, Chemically-leavened Dough in Low Pressure Package*. U.S.P. Office, USA.
- Drapron R, Godon B. (1987). *Role of enzymes in baking. Enzymes and their role in cereal technology*. Edited by Kruger JE, Lineback D y Stauffer CE. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EUA. p.p. 281-324.
- Drapron R, Godon B. 1987. *Role of enzymes in baking. In: Enzymes and their role in cereal technology*. Edited by Kruger, J.E., Lineback D. y Stauffer C.E. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EUA. p. 281-324.



- Duerrenberger, M.B., Handschin, S., Conde-Petit, B., Duran E., Escher, F. (2001). *Visualization of the effect of low molecular weight dextrans on gelatinization and retrogradation of starch*. European Food Research and Technology.
- Durán E., León A. E., Barber B., Benedito C. (2001). *Effect of low molecular weight dextrans on gelatinization and retrogradation of starch*. European Food Research and Technology.
- G.L. Miller (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 31 p.p. 426–428.
- Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., & Delcour, J. A. (2009). *Amylases and bread firming an integrated view*. Journal of Cereal Science, 50(3), 345-352.
- Granato, D., & Masson, M. L. (2010). *Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach*. Food Science and Technology (Campinas), 30(4), 1090-1096.
- Hernandez, G., & Majem, S. (2010). *Libro blanco del pan*. Publicado por editorial médica panamericana, Madrid, p.p. 4-5.
- Hernández, M. E. (2009). “Estudio reológico de batidos para panque en función del comportamiento de diferentes grasas”. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UAEMex.
- Hutchings, J. B., Luo, R., & Ji, W. (2002). *Calibrated colour imaging analysis of food*. Colour in Food, p.p. 352-366.
- I.P. Wood, A. Elliston, P. Ryden, I. Bancroft, I. N. Roberts, K.W. Waldron (2012) Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay, Biomass Bioenergy 44, p.p. 117–121.
- Jekle, M., Becker, T., (2011). *Dough microstructure: novel analysis by quantification using confocal laser scanning microscopy*. Food Res. Int. 44 (4).
- Kim, J. H., Maeda, T., & Morita, N. (2006). *Effect of fungal  $\alpha$ -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours*. Food Research International, 39(1), p.p.117-126.
- Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. (2002) “Industrial Enzyme application”. CurrentOpinion in Biotechnology
- Kirkeby, P.G., 2007. *Margarine and dairy spreads: processing and technology*. Hui, Y.H. (Ed.), Handbook of Food Products Manufacturing. John Wiley & Sons, pp. 705-724.



- Kokawa, M., Sugiyama, J., Tsuta, M., Yoshimura, M., Fujita, K., Shibata, M., et al. (2013). *Development of a quantitative visualization technique for gluten in dough using fluorescence fingerprint imaging*. Journal of Food and Bioprocess Technology. 45(2), p.p.132-136
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., Cuchillo F. C., Suau L. P., Vendrell R. J., (2009) Principios de bioquímica. 5ª Ed. Barcelona. Pág.13
- León, A. E., Durán, E., & Benedito de Barber, C. (2002). Utilization of enzyme mixtures to retard bread crumb firming. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(6), p.p.1416-1419.
- Li, W., Dobraszczyk, B.J., Wilde, P.J. (2004). *Surface properties and locations of gluten proteins and lipids revealed using confocal scanning laser microscopy in bread*. Denton University, Cereal Technology Department.
- Lopes A. E., Kil C. Y. (2012) Effect of the addition of enzymes on the quality of frozen pre-baked French bread substituted with whole wheat flour. San Paulo, Brasil.
- Martínez, A. (2006). *“Nuevos procesos en panificación”*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UAEMex. p. 65
- Massi, N. (2007). *Baking Fundamentals, chapter 10:laminated and steam-leavened dough*. The American Culinary Association.EUA.
- McGee, Harold (2007) La cocina y los alimentos, enciclopedia de la ciencia y la cultura de los alimentos. España. Editorial Debate, (pp. 544-602).
- McGill, E.A., 1975. *Puff pastry production*. Bak. Dig. 49 (1), p.p. 28-38.
- Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H., & del Castillo, M. D. (2008). *Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread*. Journal of Cereal Science, 48(1), p.p. 123-132.
- Moore M.M., Heinbockel M., Dockery P., Ulmer H.M., Arendt E.K. (2006). *Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase*. Cereal Chemistry, 83. 28-36.
- Ordoñez, M. H., & Osorio, D. D. (2013). *Características reológicas del pan de agua producto autóctono de Pamplona (Norte de Santander)*. Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 10(2).
- Parker, R., & Ring, S. G. (2001). *Aspects of the physical chemistry of starch*. Journal of Cereal Science, 34(1), 1-17.



- Patel J., Ng J.H.Y., Hawkins, W., Pitts K., Chakrabarti B. (2012) *Effects of fungal alfa-amylase on chemically leavened wheat flour doughs*. CSIRO Food and Nutritional Sciences, Australia.
- Patel, B. K., Waniska, R. D., & Seetharaman, K. (2005). *Impact of different baking processes on bread firmness and starch properties in breadcrumb*. Journal of Cereal Science, 42(2), 173-184.
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2013). *Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review*. Food and Bioprocess Technology, 6(1), 36-60, Press LLC.
- Piñeiro, E. (2009) *Las enzimas de los alimentos*. Documento electrónico disponible en <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2009/04/21/184759.php>  
Press LLC
- Popper M., Ahrensburg G. (2001) *Enzimas, las mejores amigas de las harinas. Las pequeñas ayudantes de los fabricantes de harinas*. Alemania.
- Primo-Martín, C., van Nieuwenhuijzen, N.H., Hamer, R.J. & van Vliet, T. (2007). *Crystallinity changes in wheat starch during the bread-making process: starch crystallinity in the bread crust*. Journal of Cereal Science, 45, 219–226.
- Quaglia, G. N. A., Grosso, A. L., Franco, D., Pantanelli, A., Pan, L. G., Campana, M. C., & R Tomás, M. C. (1991). *Ciencia y tecnología de la panificación*. Acribia 2° Ed. pp. 1-28.
- R.F. McFeeters, A manual method for reducing sugar determinations with 2,2'-bichinoninate reagent, Anal.Biochem.103(1980)302–306.
- Ramírez, H., Carlos Hernán Bolaños, V., & Nuria Lutz Cruz, G. (2003). *Química de alimentos: Manual de laboratorio*. San José, CR: Universidad de Costa Rica.
- Roepcke, C.; Toledo, A. (2013). “El rol de las enzimas en panificados”. *Enfasis*, Vol. 19. (8)
- Rosell, C. M., Haros, M., Escrivá, C., & Benedito de Barber, C. (2001). *Experimental approach to optimize the use of  $\alpha$ -amylases in breadmaking*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6), 2973-2977.
- S. B. Kevser, Tütem E., Akyüz E., Özen S., Apak R. (2016). *Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction*. Talanta 147 pp.162–168.
- S. B. Kevser, Tütem E., Akyüz E., Özen S., Apak R. Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. Talanta 147 (2016) 162–168.



- S. Honda, Y. Nishimura, M. Takahashi, H.Chiba, K.Takehi, A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide, *Anal. Biochem.* 119(1982)194–199.
- S. Waffenschmidt, L. Jaenicke, Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate, *Anal.Biochem.*165(1987)337–340. [15] M.E. Brown, Ultra-micro sugar determination using 2,9-dimethyl-1,10-phe- nanthroline hydrochloride (Neocuproine), *Diabetes*10 (1961) 60–62.
- Sahlström, S., & Bråthen, E. (1997). *Effects of enzyme preparations for baking, mixing time and resting time on bread quality and bread staling.* *Food Chemistry*, 58(1), 75-80.
- Sánchez, O. Palacios, S. Batista, Z. Díaz, N.P. Guerra (2016). *Simultaneous production of amylases and proteases by Bacillus subtilis in brewery wastes.* *Braz. J. Microbiol.* In proofreading.
- Sciarini, L. S. (2012). *Estudio del efecto de diferentes aditivos sobre la calidad y la conservación de panes libres de gluten.* Tesis de doctorado. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Pág. 130
- Shah, A. R., Shah, R. K., y Madamwar, D. (2006). *Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from Aspergillus foetidus.* *Bioresource Technology.*
- Tejero, F. (2009). *Las enzimas en la panificación.* Asesoría técnica en panificación. Disponible en: <http://www.franciscotejero.com/tecnica/mejorantes/las%20encimas.htm>
- Tejero, F. (2009). *Las enzimas en la panificación.* Asesoría técnica en panificación. 13 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://www.franciscotejero.com/tecnica/mejorantes/las%20encimas.htm>
- Telloke, G.W. (1991). *Puff Pastry I: Process and Dough Ingredient Variables.* FMBRA, Reino Unido.
- Wieser, H. (2003). The use of redox agents. In S. P. Cauvin (Ed.), *Bread making: Improving quality.* Cambridge/Boca Raton: Woodhead Publishing Limited/CRC-Wissenschaft Technology.
- Wood I. P., Elliston A., Ryden P., Bancro I., Roberts I. N., Waldron K. W. (2012) Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Energy* (44), 117- 121.



## 11. ARTÍCULO

**Effect of a food grade commercial complex of  $\alpha$ -amylases on the microstructure of the puff pastry to carry out a fat reduction during the laminating process**

**Effect of a food grade commercial complex of  $\alpha$ -amylases on the microstructure of the puff pastry to carry out a fat reduction during the laminating process**

**Alejandra Mora-Mundo<sup>1</sup>, Jesús Castellón-Jardón<sup>1\*</sup>, Miriam Fabiola Fabela-Morón<sup>2</sup>, Rosa María Gómez-Espinoza<sup>1</sup>, María de Jesús Perea- Flores<sup>3</sup>, Nelson Pérez Guerra<sup>4</sup> & Juan Orozco-Villafuerte<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Chemistry Faculty. Autonomous University of the State of Mexico. Colon Street. 50000 Toluca de Lerdo, State of Mexico, México C.P. 50180.

<sup>2</sup> CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Edo. De Jalisco. Unidad Sureste. Parque Científico Tecnológico de Yucatán. Tablaje Catastral 31264, Km. 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto. C.P. 97302 Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup> Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México 07738, México

<sup>4</sup> Department of analytical and Food Chemistry, University of Vigo (Ourense Campus), As Lagoas, 32004 Ourense, Spain.

\*1 Corresponding author: Jesús Castellón Jardón, Chemistry Faculty. Autonomous University of the State of Mexico. Colon Street. 50000 Toluca de Lerdo, State of Mexico. E-mail: [jesuscastillonjardon@gmail.com](mailto:jesuscastillonjardon@gmail.com) Tel. +52 1 (722) 2041373

### **Abstract**

Laminated doughs are characterized by a structure divided into multiple layers by incorporated fat through a mechanical process called "lamination". There are different doughs of this type, each of them with a different texture, characterized by the way of incorporation of fat. Puff pastry consists of wheat flour with enough water to form a dough of similar consistency to that of the fat used during the laminating process; characterized by its crisp and flaky structure. Puff pastry does not contain sugar or yeast or any leavening agent in its formulation, however it is able to grow up to 600% its original size by



the steam generated by the fat trapped in the dough during the baking process at a high temperature(210°C).

In recent years the use of enzymatic technology in food industry has grown, and in the baking area is also widely used. Especially the amylases, which are used as anti-staling agent, giving softness and texture to baked goods, extending its shelf life. However, there is little research on the effects related to the addition of this type of enzymes in laminated pastes and their interaction with the rolling or laminating process, so it is considered important to extend the studies of the application of this enzyme paste puff pastry. The aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of a commercial enzyme complex (Corbion Caravan Ingredients) of  $\alpha$ -amylases (0.5, 1.0, 1.5) on the puff pastry microstructure and how it affects fat content (100% 80% and 60%) based on the weight of the dough), to carry out a reduction there of. The results obtained showed that using the 0.5%  $\alpha$ -amylase enzyme complex based on flour weight improves the thermal and physico-chemical properties of both raw and final products, improves and optimizes the baking process, because it accelerates the processes of gelatinization of the starch, in addition the enzymes hydrolyze the starch granules, creating micro-ruptures in the laminar structure of the puff pastry, causing that the steam produced during the baking has a better diffusion along and that in turn the pastry paste expels 7.6% fat during baking, thus optimizing the baking time and makes it possible to reduce the percentage of fat used during the rolling without changing the physico-chemical characteristics of the pastry from 100% to 80%, ie it can be reduced 20% of fat used during the rolling process.

**Keywords:** puff-pastry, enzymes,  $\alpha$ -amylase, laminating process, fat-reduction.

## **Introduction**

Enzymes have gained fame in food industry. The hydrolases constitutes a large group of enzymes (Rosell, Haros, Escrivá, & Benedito de Barber, (2001) which has been one of the most studied and important in the industrial and biotechnological fields, because their use has allow to replace the chemical by the enzymatic hydrolysis of starch, the most used polysaccharide in the biotechnological industry worldwide (Bedón G. M., Nolasco C. O.,



Santa Cruz C. C., Gutiérrez R. A., 2013). Amylases are essential in production of food, fuels, medicines and detergents in order to optimize processes, clean labels out of chemicals and to be eco-friendly (Bedón *et al.*, 2013)

In food industry,  $\alpha$ -amylases are widely used in brewing, distilled beverages, syrups, juices, cakes and goods production, among others examples (Sánchez, Palacios, Batista, Díaz, Guerra, 2016). This industry invests millions of money every year in the production of clean label food, because of consumers' demand for better and chemical-free food that could affect their health (Sánchez *et al.*, 2016).

Hydrolases as most of other enzymes have maximum activity only within narrow ranges dependent on a number of experimental parameters, including time of reaction, temperature, pH, nature and concentration of substrate, nature and concentration of buffer, and purity of enzyme preparation, among others (Rosell, Haros, Escrivá, & Benedito de Barber, 2001). Many polysaccharide-degrading enzymes are commonly assayed by quantifying the amount of reducing sugars (RS) released at the end of an incubation period in order to give a better application and optimize processes (Kevser, Tütem, Akyüz, Özen, Apak, 2016).

Puff pastry is a light flaky pastry formed by alternating layers of fat and dough so that, upon baking, steam collects between dough layers causing them to expand and form cavities between the thin pastry layers (Massi, 2007) and it is characterized by a unique original alveolar structure with large, irregular bubbles nearly always distributed horizontally (Deligny, 2014). This structured system is made by repeated sheeting (or rolling) steps forming a finer grain texture due to fragmentation of trapped air which acts as a nuclei for the initiation of bubble formation during baking (Bousquires, 2014).

Flaky pastry results from alternating dough and fat to form many thin layers, obtained by successive steps of sheeting and folding with 90° rotation (lamination process). This pastry presents many elongated thin cavities, resulting in a light flaky texture. These have been attributed to the many thin layers of fat which act as an impermeable barrier to vapor produced in dough layers during baking (McGill, 1975).

Primo-Martín, van Nieuwenhuijzen, Hamer, & Van Vliet, (2007). describes the properties and applications of the enzymes that are responsible for starch hydrolysis of the  $\alpha$ -amylases family, as they are a group of enzymes of different specificities, acting on a type of substrate, which are the residues Glucose linked through a glycosidic bonds  $\alpha$ , 1-1,  $\alpha$ -1-4,  $\alpha$ , 1-6. The members of this family share a number of common characteristics, at least



21 enzymes with different specificities within this group; these differences are considered among other characteristics, the active site and the general structure of the enzyme.  $\alpha$ -Amylase can be divided into two subgroups: hydrolyzing and starch-modifying enzymes.

One of the main uses of this type of enzymes is as an anti-aging agent in bakery products; it delays the starch retrogradation.

Several studies (Collar, 2004; Caballero, 2006; Patel, 2012) have evaluated the individual and synergistic effects of various enzymes on the gluten network and their interaction with starch, finding positive results on the reduction of bread aging.

Lopes & Kil (2012) demonstrated that the incorporation of the  $\alpha$ -amylase enzyme into the flour favors the formation of a continuous network capable of improving the technological quality of the bread and its decrease in the rate of hardening of the crumb during storage.

This enzyme hydrolyzes the  $\alpha$ - (1-4) bonds of the starch, producing low molecular weight dextrans. Its positive effect on bread quality is due to the fact that it increases the content of fermentable and reducing sugars (Bowles, 1996). Fermentable sugars serve as nutrients for yeasts by increasing CO<sub>2</sub> production, which implies an increase in bread volume; the reducing sugars in turn promote the generation of the products of the Maillard reaction by intensifying the flavor, aroma and color of the bread. (Drapron & Godon, 198; Bowles, 1996).

On the other hand, the action of the amylases that cause changes in the structure of the starch alters its regrouping properties, since the dextrans produced by enzymatic hydrolysis make difficult the reorganization of amylopectin molecules during storage, avoiding retrogradation (Durán, León, Barber & Benedito, 2001).

There are few studies on puff pastry. Diaz, (2006) carried out a modified atmosphere packaging study for puff-type bakery products, where he mentions that this type of technology is a good alternative to extend the useful life of the product, however, if it is desired to apply to other types of bread as french bread, for commercial purposes, would not be profitable since the economic price of such products would not cover the expenses of using the same.

Bousquieres, Deligny & Lucas, (2014<sup>a</sup>). examined the rupture of the fat sheets in the Danish laminated dough using confocal laser scanning microscopy (CLSM), showing that



as the number of "folds" in the lamination increases, the sheets of fat increase, up to the point at which they break and empty spaces become undesirable during the baking process, which causes the dough to have a considerable decrease in the volume of the final product. Other studies on laminated doughs (Blonk, 2002; Cauvain and Telloke, 1993; Telloke, 1998) have reported physico-chemical properties of this kind of products.

Bousquieres, Deliyiny, Riaublanc, Lucas, (2014<sup>b</sup>) performed a study in laminated dough, which refer to the importance of the sheeting process and the elastic retraction that happens during work of the dough. By means of confocal laser scanning microscopy, they performed a count of the dough and fat sheets that were expected to be developed during the process, as well as verifying if the thickness of each sheet was the same. These authors concluded reporting the sheets did not have the same thickness and that the more grease used in the rolling process, the less elastic recoil the dough performed.

The  $\alpha$ -amylase exerts an effect on the laminar structure of the puff pastry when interacting with the starch components (amylose and amylopectin) of the dough sheets (American Institute of Baking, 1998). Amylose (25% of starch) is a straight-chain polymer, formed by an indeterminate number of D-glucose anhydride linked by  $\alpha$  (1-4) glycosidic bonds, susceptible to amylase. Amylopectin (75% of the starch) includes in its structure branched chains, which in turn are formed by linear chains of D-glucose anhydride linked by  $\beta$  (1-6) glycosidic bonds in a proportion of 4%. In the first instance, these chains are susceptible to the action of alpha-amylases, an event that allows the subsequent participation of  $\beta$ -amylases and the consequent improvement in the laminar structure of the mass.

In spite of several investigations on the use of this enzyme applied to baking products, there are currently few studies on laminated masses focused on the study of fat. Most of the investigations related to the use of alpha-amylases have been made in fermented doughs, loaves or french bread, it is thought the puff pastry is a field of study little explored giving rise to the present investigation.

The aim of the present study was to evaluate the effect of a food grade complex of  $\alpha$ -amylases on the microstructure of puff pastry to carry out a fat reduction during the laminating process.

## **Material and methods**

### **Ingredients**



The dough to make the puff pastry control formulation was prepared using a standard recipe: 60.2% of Manitoba wheat flour (Bunge, México), 39.1% of water (Bonafont, Danone, México), 0.6% of salt (Sal La Fina, México).

### **Production of laminated dough**

Dough was made mixing the ingredients in a semi-industrial mixer (SP-800 Counter top mixer, Grupo Alpha Simet, México) equipped with a vertical spiral hook (132 rpm) for 12 min at constant speed and ambient temperature (18°C). In this way it was obtained 100% of dough. After mixing, the dough was rested for 20 min at room temperature. Then the dough was laminated with the 50% dough's weight of a special fat for this kind of pastry with a melting point 42°C (Flex roja, feité, Unilever de México). The consistency and temperature of fat before lamination was adjusted empirically (i.e. according to the industrial practices) so as the dough and the fat had similar consistencies and temperatures to prevent the dough from breaking and to make easier the sheeting process. Sheeting was performed in the same room (set at 18°C) with a reversible Rondo (SSO625, Ecomat, Burgdorf, Switzerland) sheeter equipped with a pair of smooth rollers of equal size (84 mm in diameter). The laminating technique used was "The English method". The original "book" was composed initially of two fat layers between three dough layers. Three fold turns were used to produce 15, 45 and 135 layers theoretically. To limit elastic recoil of the dough between sheeting steps, the paste was gradually thinned and it was rested for 5 min between each turn. Before each turn the dough was also lightly sprinkled with flour to avoid dough sticking to the rollers. The dough was progressively sheeted down to 10 mm – with four passages at 40, 30, 20 and 10 mm. Height was measured with a caliper at 4 points. The puff pastry was divided in two parts; it was cut a rectangle of 20 cm x 10 cm, to get two pieces of 10 cm x 10 cm. one of them was set in a sealed bag and kept at 4°C for 20 min, and the another part was baked in an electrical convection oven (101, Self-cooking Center 5 Senses, Rational, Germany) for 20 min at 210°C with 0% humidity. The oven temperature was measured using a thermocouple integrated in the oven. The oven allows controlling temperature with accuracy. The tray with the samples was placed in the central zone of the oven. After baking the samples were cooled at room temperature (17° C) for 10 min. Physico-chemical characterization was made.

### **Puff pastry experimental samples preparation**



To carry out the present study was prepared the next experiment by adding 0.5%, 1.0% and 1.5% of a Ultra Fresh® Premium Advantage, a food grade commercial mixture of  $\alpha$ -amylases (Corbion Caravan México) based on weight's flour. The  $\alpha$ -amylase percentages were selected according to the commercial data sheet. Then the fat percentage was modified from 100% (control) to 80% and 60% based on dough's weight respectively. 3 samples were prepared for each experiment.

## **Physico-chemical characterization**

### **Physicochemical analyses**

The preparation of puff pastry samples as well as their physicochemical analyses, were performed at the Laboratory of Cereals Technology, at the Food Science and Technology Department of the Faculty of Chemistry (Unidad "El Cerrillo", Piedras blancas, Estado de México) belonging to the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Samples were evaluated in three repetitions.

### **Enzyme kinetics**

Enzyme kinetics were measured to find the optimal working conditions of the commercial  $\alpha$ -amylase enzyme used in this study, in order to determine the optimum time, temperature and pH for high enzymatic activity. The enzyme reactions were monitored by measuring the formation of RS from hydrolysis of starch over the time according to Sánchez et al., (2016). The results were correlated to temperature curves measured during baking process.

### **Temperature curves analysis**

In order to know the maximum internal temperature of puff pastry during baking, this parameter was measured using an oven thermocouple stuck in the center of puff pastry from the beginning to the end of baking. The results were correlated to the results of enzyme kinetics.

### **pH analysis**



The pH of raw and baked puff pastry samples was determined using the AACC 02-52 method (2010) which is used to determine pH values in wheat flour and by products.

### **Specific Volume**

The specific volume of the puff pastry samples was determined according to AACC methodology (AACC, 2010). The samples were weighed in a semi-analytical balance and the volume measured by millet seed displacement. The specific volume was calculated from the relationship of volume/weight, and results were expressed as  $\text{cm}^3/\text{g}$ .

### **TPA analysis: Fracturability and hardness**

The fracturability and the hardness of the puff pastry samples was evaluated according to AACC methodology (AACC, 2010) using the TA-XT2 texture analyzer and the program Exponent, Stable Micro Systems. The measurement of compression and force was carried out. The test was performed under the following conditions: test speed: 5 mm/s, compression 30%, time 3 sec. A cylindrical aluminum probe of 36 mm diameter (P36/R) was used.

### **Color**

Colorimetric measurements were achieved on the center of the crust of the puff pastry samples using a spectrophotometer (CR-400, Konica Minolta, Ramsey, NJ, USA) calibrated on a calibration plate with the D65 illuminant (corresponding to standard daylight). Results were calculated using the international color space CIE  $L^* a^* b^*$ , where  $L^*$  stands for lightness,  $a^*$  represents the green-red axis and  $b^*$  the blue-yellow axis.

### **Soxhlet extraction method**

Puff pastry fat content was measured by AOAC method no. 920.85 (AOAC, 1990) with an automatic Soxhlet apparatus (4 places, Gerhardt Soxtherm, Königswinter, Germany) following the manufacturer's guidelines. The puff pastry was ground using a food processor (KFP1466CU, KitchenAid, OH, USA) for 1 min to homogenize it. The dried puff pastry sample (3 g) was packed in a thimble and the fat was extracted with petroleum ether (boiling point: 60-90 °C) for 3 h. upon completion of the fat extraction, the fat was dried at 100°C for 5 h to remove residual petroleum ether. The fat content of the samples was calculated on the basis of dry weight of the puff pastry samples.



## Statistical analyses

Statistical treatment of the physicochemical, textural and Color data was performed using IBM SPSS Statistics V 24.0 (2006, SPSS Ibérica 165 S.L.U. Madrid, Spain), one way ANOVA was used to find statistical differences, Tukey post-hoc test, performed with a significant level of ( $p > 0.05$ ).

## Micro structural characterization

### Sample preparation

The samples were carried out as stated by Bousquieres et al. (2014<sup>a</sup>) with some modifications. At each corner of a frozen rectangle of puff pastry, a smaller rectangle of 10 x 5 cm was cut off from which a cube of 10 x 10 mm were sampled, making a total of 4 samples for each formulation. In this case, only the first four formulations were sampled, in order to know the enzyme's behavior in puff pastry, the results were correlated to the other studies made. A small mark was made on each cube in order to locate it spatially (x, y, z). In order to visualize fat and dough layers separately with CLSM, two dyes were added to the sample. Fluorescent probes: 0.5% fluorescein 5-isothiocyanate (FICT; Sigma Chem Co, St. Louis, MO, USA) and 0.5% rhodamine B (Sigma Chemicals) solutions, both in water, were used to stain the samples (Díaz, Calderón, Chanona, Janovitz, López, Farrer, & Salgado, 2013). Additionally, red Nile (Sigma Aldrich) was used to visualize fat behavior in puff pastry. To avoid any degradation, fluorophores were protected from light and stored at -20 °C, and the required amount of solution was prepared on the day of experiment.

### Observation with Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

The samples were dyed with FICT (5 mL, 20 min in a dark place) which stains proteins (green) and secondly, Rhodamine B (5 mL, 10 min in a dark place) which reacts more specifically with starch (red) (Díaz *et al.*, 2013). After staining, the excess of dye was removed by rinsing the sample with deionized water; the samples were slightly dried (10 min, 30°) and covered (glass cover). The excitation wavelengths were 488 and 518 nm for FICT and Rhodamine B, respectively, and the maxima emission were at 568 and 625 nm for both dyes. The samples were studied using a confocal scanning laser microscope (LSM 710; Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) with 20 x lenses, with the purpose of knowing the behavior of the  $\alpha$ -amylase and its effect on the main



components distribution and interactions, along with the changes in the granules of starch by increasing the amount of enzyme. Fields were acquired in RGB color and stored in tiff format of 1024 x 1024 pixels.

## Results and discussion

With the enzyme kinetics results related to the food grade complex of enzymes *α*-amylase Ultra Fresh<sup>®</sup> Premium Advantage, Corbion Caravan were found the optimum parameters of pH (3.54), time (4min), temperature (72°C) and maximum amylase activity of 3.7248 mMol/L. This experimental data are valuable information that it will be correlated to data of the enzyme applications in puff pastry, and to study its behavior in this kind of food complex.

The temperature curves over baking time are presented in Fig.1, where internal temperatures behavior of the different puff pastry formulations was observed.

The demonstration was that without the enzyme the optimum temperature was reached gradually throughout the baking time, up to 92 ° C to the minute 10 and remaining thus until the end of the baking process. After observing that the lower concentration of the enzyme *α*-amylase proposed in the experiment (0.5%), faster (6 min) the optimum internal baking temperature was reached in a baked product (92 ° C), this fact could be related to de optimum work temperature found in the enzyme kinetics experiment. However when there is a higher concentration of the *α*-amylase enzyme a different process occurs, the time in which it reaches the optimum baking temperature is higher and so the temperature is higher, it produces a greater dextrinization leading to the products an overcooking, the more enzyme is added to the formulation, the more hydrolysis occurs getting more reducing sugars available. Without using yeast in the formulation (that consumes it in the case of the fermented products) there is an accumulation in the puff pastry which produces during baking an excessive reaction of caramelization, and the bread has an unpleasant burnt appearance. The heating rate, time and temperature reached internally in bread during cooking relate to the internal structure of the peculiar cell matrix of puff pastry, which is capable of growing up to 600% of its initial volume. (Telloke, 1991). The raising or growth of puff pastry is given thanks to the water contained in the dough and which is dispersed in the dough sheets, then is converted into steam and it is able to melt and make the fat trapped between sheets of dough reaches its boiling point, when it cannot escape, it causes the expansion of dough layers, thus creating cavities between the



sheets of a baked product. By making use of a complex of  $\alpha$ -amylases enzymes, which work temperature range is between 60°C - 78°C, although the structure of the paste changes since the enzymes immersed in the formulation are activated upon contact with water during kneading, it is at 72°C that they reach their optimum working temperature. That is due to the increase of the temperature could be given more quickly because of enzymes, having a greater diffusion of steam between the sheets reaching quickly the internal temperature. The temperature at the center of the bread will gradually increase regardless of the temperature of the oven and will approach the boiling point of the water present in the product, and depends on the bread size. A key parameter of the bread quality an oven operator should monitor is the final internal temperature of the bread. A temperature of 92-95°C in the center of the bread at the end of cooking process is generally accepted and is necessary to know that the components of the bread have been completely and have a quality product (Quaglia, Grosso, Franco, Pantanelli, Pan, Campana, & Tomás, 1991).

Most of the expansion of puff pastry occurs in the first half of the baking time, but most of the water must be expelled before the pasta is firm enough to remain stable without collapsing (Deligny, & Lucas, 2014). During the first baking period (10 min) a temperature of 65 ° C was reached at which the starch gelatinization and its partial dextrinization began. In the same way this enzymatic complex begins to work optimally reaching its optimum temperature to 72 ° C.

When these phenomena are carried out together with the removal of the water used in the expansion of the sheets, the paste loses the plastic consistency and causes it to assume a fragile and "flaky" but stable structure (Quaglia *et al.*, 1991).

The gelatinization process and the time at which the crumb reached the optimum baking temperature (92 ° C) are directly related, because although the gelatinization of the starch is given at lower temperatures and the crumb structure is formed in smaller weather are joint processes. Making all a complex sistem. However, the puff pastry added with 1.5% of the  $\alpha$ -amylase enzyme did not fulfill the above, due to the mass absorbs a greater amount of water in its structure, becoming more soft and sticky, therefore, taking more time to evaporate the water during baking (Dogan 2003).

Table 1 shows the pH values of the dough as well as the baked product. The pH of baked goods is generally 5. 2 (Rosell *et al.*, 2001). In puff pastry the pH is related to the rheology



of the mass, helping to have greater extensibility and plasticity in the dough, since having a slightly acidic pH strengthens gluten, resulting in a benefit during the laminating process, making it easier. On the other hand, having a very acidic pH results in a problem of shrinkage or uneven expansion and collapse (depending on the final product for which the puff pastry in question is used) of the pasta during baking.

In general, to have a good lifting of the puff pastry it is recommendable to have a pH in the dough of 4.2-5.8 (Telloke, 1991). The control formulation (0.0% enzyme) showed no significant differences respect to the other formulations (0.5, 1.0, 1.5% enzyme) while the raw puff pastries had slightly higher pH levels than baked products, both of them are within acceptable range for baked goods, (5.3 - 5.7) (Deligny, 2014). The pH could also affect the optimal work of the enzyme inside the puff pastry. However, this was not so, since although according to the results of enzymatic kinetics the optimum pH of the enzyme is 3.5, it is noteworthy that these studies were made with pure potato starch, and this enzyme is designed to work in fermented dough, which could reach a very acidic pH. In the present work, the enzyme is tested in a completely different food complex, which is not subjected to a fermentation process, and it is precisely the main point of this study, the differences that could have in using this type of enzymes in the puff pastry about to fermented dough.

Puff pastry is very different from fermented baked goods since it does not contain any leavening agent in its formulation, it is able to grow up to 600% its initial volume. (Telloke, 1991). The raising or growth of puff pastry is due to the water contained in the dough and which is dispersed in the dough sheets, which is converted into water vapor and is able to melt and make the fat trapped between sheets Of dough serves as a barrier against water, when it cannot escape, causes the pastry to expand, thus creating cavities between the sheets, creating the stable but fragile and "flaky" structure of the puffed products. The thickness of the dough sheets changes very little during baking and does not make a significant contribution to the thickness of the baked product (Cauvain & Young, 2000).

As the concentration of the  $\alpha$ -amylase enzyme increased in puff pastry, the volume also increased. However, the baked products that had a greater volume did not present uniformity in the cavities, which results in a quality problem. Because they become more fragile and less manageable. Therefore, a bread with low volume, is a symbol of low quality, as is a product with a considerably excessive volume.



Goesaert (2009) found that the addition of the enzyme alpha-amylase increases the level of fermentable sugars, promoting fermentation of the yeast and consequently greater mass expansion. However, because of the nature of puff pastry, which does not contain yeast what could be happening is that the volume has increased as the enzyme alpha-amylase was higher, because a greater amount of dextrans was generated. According to Parker and Ring (2001) during the gelatinization process, the starch molecules vibrate by breaking the intermolecular hydrogen bonds of the amorphous zones of the granules, which causes swelling by a progressive and irreversible absorption of water that finally becomes connects to the structure. Once the  $\alpha$ -amylase enzyme is added, it catalyzes the addition of one water molecule to each glycosidic bond, thereby breaking the amylose and amylopectin chains (Chen, & Rosenthal, 2015). As there is a higher enzyme concentration, consequently there will be a greater hydrolysis, with which ruptures in said chains of the starch components could occur within the structure of the dough sheets and lead to a greater diffusion of water present in the dough, causing the generated steam to be larger and to escape slightly through the " micro-ruptures" of the amylopectin chains, making the higher concentration of enzyme, the greater volume in baked puff pastry.

Table 2 presents the results obtained from the specific volume measurements that were made to the puff pastry before and after baking. The initial volume was the same both in the control formulation and in the experimental formulations. The control bread had a lower specific volume compared to the formulations added with the enzyme  $\alpha$ -amylase. Although the volume was increased as the  $\alpha$ -amylase enzyme concentration increased, the formulation with 1.0% alpha-amylase enzyme increased its specific volume very much in comparison to the other formulations, causing the structure to be unstable and that at the end, during the cooling , it collapsed. The control formulation (F1) presented no significant difference ( $668.33a \pm 33.11$ ) respect to formulation 2 with 0.5% enzyme ( $720.00a \pm 50.99$ ); however, with the other two formulations (F3 and F4) there was a significant difference.

Quaglia et al. (1991) reports that when the activity of the alpha-amylase enzyme is high, the dough structure can become so fluid that the bread piece will completely collapse.

In studies by Kim, Maeda, & Morita (2006), it was shown that adding fungal  $\alpha$ -amylase to bread, have positive effects on the specific volume. Błaszczak, Sadowska, Rosell, & Fornal (2004) studied the effect of  $\alpha$ -amylases (bacterial and fungal) on the structural changes of the dough and bread, measuring the specific volume and concluded the loaves



added with the enzymes had a higher specific volume with respect to the control pan. From the above it can be said that to add  $\alpha$ -amylase enzyme in a moderate concentration (0.5%) present positive effects in specific volume. Not so when a high percentage (1.0, 1.5%) is added.

The parameters analyzed with a TPA were fracturability and hardness by the nature of the product to be studied. The texture parameters were obtained using the TA-XT2 Stable texture analyzer texturometer, together with the Exponent program, Stable Micro Systems. The results of the parameter of interest were obtained only in the baked product.

Table 3 shows the hardness values of the four formulations. The results of hardness had the following effect: when the concentration of  $\alpha$ -amylase was increased, the hardness values increased, with respect to the control. However formulation 3 (1.0% enzyme) did not follow this trend.

The hardness or firmness of the crumb is the attribute of the texture that has attracted more attention in the estimation of the quality of the crumb due to its close association with the sensory perception of freshness (Ordoñez & Osorio, 2013).

During gelatinization, the amylose and amylopectin chains are released from the starch granule by the heating during baking and to the water of the system, they are solubilized again when the system cools and stores because the amylose and amylopectin form double helices and crystallize (Sahlström & Bråthen, 1997).

Derde (2012) mentions that the crystallization of starch contributes to the texture of the bread, because with the subsequent cooling, the amylose crystallizes, and is co-responsible for the initial firmness of the bread.

During the gelatinization process the amylose and the amylopectin are hydrolyzed by the enzyme  $\alpha$ -amylase, thus generating short chains (low molecular weight dextrans), which will participate in the Maillard and caramelization reactions. Based on this, at higher enzyme concentration  $\alpha$ -amylase added, higher generation of dextrans. Consequently at the end of the baking, the retrograded amylose content will be higher, and this will be reflected in an increase in the firmness of the bread crumb.

The specific volume is an important parameter, related to the texture of the bread. Previous studies have shown that the total increase in the firmness of the crumb depends



on the specific volume of the bread; soft crumbs correspond to higher specific volume loaves. (Armero & Collar, 1998). However, the particular structure of the puff pastry makes this not so, when counting a better diffusion of the water since the higher enzyme content, makes the bread is dried up becoming harder but to be more fragile and fracturable at the same time.

Table 4 shows the color parameters  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  obtained from baked puff pastry. the puff pastry formulated without the enzyme  $\alpha$ -amylase showed a higher luminosity value with respect to the formulations containing the  $\alpha$ -amylase enzyme, i.e., at higher concentration of the enzyme  $\alpha$ -amylase, the values of luminosity decrease.  $L^*$  can be considered as equivalent to a member of the grayscale, between black and white (Granato & Masson 2010; Pathare, Opara, & Al-Said, 2013). The value  $a^*$ , was positive in all cases, ie the formulations presented nuances of red color. The  $a^*$  value increased as the enzyme concentration increased, the control formulation was significantly different from the 3 experimental formulations, which showed similar values. The values of  $b^*$  of the four formulations were positive, this means that the crust of the puff pastry presents shades of yellow color. The highest value of  $b^*$  is presented in the formulation without the enzyme  $\alpha$ -amylase and the lower value of  $b^*$  when the concentration of the  $\alpha$ -amylase enzyme was 1.5%.

The color derives mainly from the Maillard reactions, which start when the cooking temperature exceeds  $150^\circ\text{C}$  (Ramírez, Hernán & Lutz 2003). Caramelization, a physical-chemical phenomenon involving thermal degradation of sugars without the participation of amines also takes place (Hutchings, 2002). The evaporation of the water inside the puff pastry causes that the temperature of the mass does not rise of  $100^\circ\text{C}$ . When sufficient moisture does not reach the surface of the bread, it dries and begins to form a waterproof rind. Considering a considerable amount of fat, there is also a browning reaction by frying (Hernandez, 2010).

Several factors affect the degree of browning that occurs through the Maillard reaction. First, an aldehyde (reducing sugars often found in food systems) and an amine (proteins are the most important source of these groups) must be present. When reacted, they form an imine, through a series of complex reactions that finally produce flavors, aromatic complexes and brown pigments known as "melanoidines". Which are responsible for the brown color of the bread (Michalska, Amigo-Benavent, Zielinski, & Del Castillo, 2008). A



starch paste that gelatinizes will generate dextrins and, finally, will caramelize to give both color and luster. (Cauvaín & Young, 2002)

A more uniform color distribution and a darker crust can be observed, as the increase of alpha amylase enzyme in the bread formulation.

By increasing the enzyme content in the formulations, we favor the generation of sugars, following the trend: At higher concentration of alpha amylase, higher generation of sugars. Consequently the brown color formed by the reactions of Caramelization and Maillard will be more intense, coupled with the fat that participates in the process.

When alpha amylase is added, low molecular weight sugars are generated, and according to Ramírez et al. (2003) the small sugars react with greater speed than the big ones.

Formulation 4 (1.5% enzyme) produced a greater amount of sugars, due to its higher enzymatic activity; this is reflected in a lower luminosity value.

In contrast, the control (0.0% enzyme), had a lower amount of sugars, because its enzymatic activity was lower, had the opposite effect. According to Primo-Martín, Van Nieuwenhuijzen, Hamer & van Vliet (2007), low activity of  $\alpha$ -amylase produces a pale crust. In this way, the control has higher Luminosity values, as it tends to white, and the highest value in  $b^*$  with respect to the other formulations, that is to say that it has yellowish shades.

An excessive amount of dextrins in the bread during the last baking phases is detrimental. If excess dextrins occur, bread after baking will have a dark crust and the product will appear to be burnt. The desired characteristics of the cortex vary with the product and are often subjectively estimated. (Cauvaín & Young, 2002). Everything will depend on the consumer; usually a crust with a pale color is associated with a crude product; A bread is preferred when its crust has a brown coloration. However the contrast comes, when the crust is too dark, it becomes rejected, when associated with burned or too toasted bread.

The fat content of the samples was calculated based on the weight of the dried samples of puff pastry. The percentage of fat in both, raw puff pastry as well as in baked puff pastry was measured in order to make a comparison between before and after baking to know if it is possible to use a smaller amount of fat during laminating process. Fat plays a crucial role in laminated dough. (McGill 1975, Alexandersen 2005, Kirkeby 2007). Since a suitable and sufficient fat is not used, when rolling or laminating, the dough sheets are



broken, damaging the steam "barrier" that helps the lifting and the characteristic formation of this type of baked goods, having as a result, a poor quality product (Deligny and Lucas, 2014). The fact that the dough shrinks is a parameter of poor quality which is directly related to the use of low amount of fat during laminating process (Bousquiere et al., 2014<sup>b</sup>).

The Soxhlet extraction results are presented in table 5. Both in the control formulation and in the experimental formulations of raw puff pastry, a percentage of 37-38 fat was found, without finding significant statistical difference, this is because the fat is found trapped between the sheets of dough and has no way of being released, to be lost in some way. While in the baked puff pastry samples, a significant difference was found in the control sample (0.0% enzyme) compared to the formulations where the  $\alpha$ -amylase enzyme was present (0.5, 1.0, 1.5%). Thus, the control formulation presented  $36.35\% \pm 0.11$  of ethereal extract, and the formulations 2,3 and 4:  $31.56\% \pm 0.38$ ,  $31.52 \pm 0.80$  and  $31.20\% \pm 0.66$  respectively, having a difference of 5% ethereal extract. This could be explained by the presence of the enzyme  $\alpha$ -amylase and the hydrolysis it performs in the dough sheets creating microstructural breaks in the dough. By which a better diffusion of the steam that is generated during the baking, that in turn could be related to the specific volume, which supposes that to a greater quantity of enzyme there will be a greater specific volume. By having a better diffusion of steam thanks to such ruptures in the structure of the dough sheets, a smaller amount of fat could be used to carry out the rolling. The presence of the enzyme  $\alpha$ -amylase in the dough causes it to become softer and more elastic, having no problems if one wishes to reduce the fat in the rolling process.

### Images analysis

The samples were analyzed according to the established by Bousquieres *et al.* (2014<sup>a</sup>). In order to visualize the mass and fat sheets separately with confocal laser scanning microscopy (CLSM) techniques, three fluorochromes were necessary to be able to dye the sample and visualize it better: 0.5% fluorescein (FICT; Sigma Chem Co, St. Louis, MO, USA), 0.5% Rhodamine B (Sigma Chemicals solutions) (Díaz-Remírez *et al.*, 2013) and Nile red (Sigma Aldrich) was used to visualize fat behavior in puff pastry.

The samples were stained with FICT which mainly stained proteins (green) and secondly, Rhodamine B that reacts more specifically with starch (red) (Díaz-Ramírez *et al.*, 2013). In order to know the behavior of  $\alpha$ -amylase and its effect on the distribution and interaction of



the main components, as well as the changes in the starch granules according to the increase of the percentage of  $\alpha$ -amylase used in the formulations studied.

Arzate, Chanona & Calderón (2012), mention that the results of microscopy depend on the type of microscopy and the field of view used to evaluate the samples.

Figure 5 shows puff pastry samples analyzed with CLSM, where it can be observed that the puff pastry is a complex system formed by the interaction between starch and proteins (a, c, e, g) and in turn, the presence of fat (b, d, f, h). The distribution of the components is homogeneous in formulation 1 (a), where a network of proteins in the form of symmetrical parallel lines (green) and starch granules (red dots) can be seen clearly and continuously throughout the image. In this image the main component appears to be the protein network, but as the enzyme concentration increases, the system appears to be mixed, the parallel lines no longer appear symmetrical and the starch granules dissipate until both Proteins such as starch granules are mixed. This effect could be due to the fact that  $\alpha$ -amylases start working since they come into contact with water (18 ° C) (Tejero, 2011). Although not subjected to cooking, the enzymes exert their hydrolytic work on the starch granules thus affecting the overall structure of the puff pastry since the hydrolysis and loss of shape of the starch granules is recognizable to the naked eye. On the other hand are the images captured when using the Red Nile fluorochrome, which mainly stains the lipids. The distribution of fat can be observed in Figure 3 (b, d, f, h), and although a contrast dye may had been necessary, it can be clearly observed in the same way as an increase in the concentration of enzyme  $\alpha$ -amylase, the fat tends to be more exposed, more visible and in greater quantity as the amylase increases. This phenomenon could be due to the addition of  $\alpha$ -amylase enzyme in the formulation of puff pastry where it may causes microstructural ruptures in the dough sheets, helping the steam generated during the baking process to be evenly distributed through the dough sheets, leading to a better distribution of fat in the system, favoring a reduction of this in the elaboration process.

After determining the better concentration to work with was 0.5%  $\alpha$ -amylase enzyme, different percentages of fat for the laminating process were tested. The results are discussed below.

### **Analysis of different fat percentages used during laminating process in puff pastry**



In table 6 it is shown the analysis of different fat percentages used during laminating process in puff pastry. Comparing the initial volume of the raw puff pastries with the baked ones, the largest value is the one that was made with a higher fat percentage; the lower value corresponds to the sample with the lower fat percentage. This speaks of the importance of using a considerable amount of fat in order to obtain a greater volume, a feature of this kind of baked goods. If a puff pastry bread has no volume, it is associated to bad quality in products by consumers. There were significant differences between the three samples.

As for the pH values of the raw puff pastries and the baked puff pastries did not show significant differences between them, however, after baking the pH is reduced by an average of 0.4, this is because during baking the physicochemical composition of the bread. The lightness of the bread increases as the fat percentage decreases, because the fat represents an important component to carry out browning reactions during baking. Statistically no significant differences were observed between samples made with 80% fat and 60%. However, 100% and 80% samples show no significant differences. The 100% sample shows significant differences from the 60% sample. The parameter  $a^*$  is increased in the same way as the percentage of fat increases. The 100% sample ( $4.30a \pm 0.76$ ) showed significant differences with respect to samples 80% ( $5.54b \pm 0.37$ ) and 60% fat ( $5.31b \pm 0.54$ ). In turn the latter two do not show significant differences with each other. On the other hand,  $b^*$  increases as fat percentage get lower. Thus, the 100% sample shows significant differences from 80% and 60%. The latter do not represent significant differences.

As for fracturability, an increase can be seen as the percentage of fat is lower. There were no significant differences between sample f1 and f2, but with f3. The hardness also increases. Not finding significant differences between f1 and f2, but if with f3. The latter has a very high hardness value, which is due to the fact that the fat softens the bread, as this ingredient of the formulation decreases the low-fat product quality. Ethereal extract values are statistically significantly different. This is obvious since different percentages of fat were used, but when analyzing the raw dough and the baked puff pastry it is observed that during baking gives a fat expulsion of 7.6% for the formulation 2, being the highest in comparison with sample 1 and 3.

## Conclusions



When using the commercial complex of enzymes  $\alpha$ -amylase at 0.5% enzyme based on flour's weight, the enzymes hydrolyze the starch granules to create micro-breaks in the laminar structure of puff pastry, causing the steam produced during the baking has a better diffusion along the sheets, and that in turn the puff pastry expels 7.6% of fat during baking, thus optimizing the baking time and makes it possible to reduce the percentage of fat used during the rolling without changing the physicochemical characteristics of the puff pastry from 100% to 80%, ie it is possible to reduce 20% of fat that is used during the rolling process.

### Acknowledgments

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors; however Miss Alejandra Mora-Mundo wishes to thanks the National Council of Science and Technology (CONACYT) and UAEMex for the study grants.

### References

- AACC. (2010). *Approved Methods of The American Association of Cereal Chemists*, 11th Ed., Approved Methods Committee, St.Paul, MN.
- Alexandersen, K.A.(2005). *Margarine processing plants and equipment*. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Fereidoon Shahidi, pp. 519e523.
- AOAC, (1990). *Methods of the Association of official Analytical Chemist*. 15<sup>th</sup> ed. AOAC, Arlington, VA, USA, pp. 780, Method No. 920.85
- Armero, E., & Collar, C. (1998). *Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives*. *Journal of Cereal Science*, 28(2), 165-174.
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J.J., Calderón-Domínguez, G. et al. (2012). *Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis*. *Carbohydrate polymers*, 87, 289–299.
- Bedón G. M., Nolasco C. O., Santa Cruz C. C., Gutierrez R. A. (2013) *Partial purification and chacarterization of alpha amylase from germinated grains from Chenopopdium quinoa (Quinoa)*. ECIPerú.Magazine Vol. 10, No. 1, 51- 57.



Błaszczak, W., Sadowska, J., Rosell, C. M., & Fornal, J. (2004). *Structural changes in the wheat dough and bread with the addition of alpha-amylases*. *European Food Research and Technology*, 219(4), 348-354.

Blonk, J.C.G., (2002). *Viewing food microstructure*. Welte-Chanes, J., Barbosa- Canovas, G.V., Aguilera, J.M. (Eds.), *Engineering and Food for the 21st Century*. CRC Press.

Bousquieres, J, Deligny, C., Riaublanc, a., Lucas, T. (2014<sup>b</sup>). *CLSM study of layers in laminated dough: Roll out of layers and elastic recoil*, *Journal of Cereal Science*.

Bousquieres, J., Deligny, C., Lucas, T., (2014<sup>a</sup>). *Using Confocal Laser Scanning Microscopy to Examine the Breakdown of Fat Layers in Laminted Dough*. *Food Research International*.

Bowles LK. (1996). *Amyolytic enzymes. Baked goods freshness: Technology, evaluation and inhibition of staling*. Edited by Hebeda RE y Zobel HF. Marcel Dekker, Nueva York, EUA.

Cauvain, S. P., & Chamberlain, N. (1988). *The bread improving effect of fungal  $\alpha$ -amylase*. *Journal of Cereal Science*, 8(3), 239-248.

Cauvain, S. P., & Young, L. (2002). *Fabricación de pan*. 1<sup>a</sup>. ed., Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1-79.

Cauvain, S. P., & Young, L. S. (2009). *Tecnología de panificación*. SP: Manole.

Cauvain, S.P., Telloke, G.W. (1993). *Danish Pastries and Croissants*. FMBRA Report No. 153. CCFRA, Chipping Campden, UK.

Cauvain, S.P., Young, L.S., 2001. *Baking problems solved*. In: *Ch. 8: Laminated Products*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge, UK, pp. 124e135.

Chen, J., & Rosenthal, A. (Eds.). (2015). *Modifying food texture: Novel ingredients and processing techniques*. Woodhead Publishing.

Deligny, C., Collewet, G., Lucas, T., 2014. *Quantitative MRI study of the layers in Danish pastry during proving*. Submitted to *Food Biophysics*.

Deligny, C., Lucas, T., 2014. *Effect of the number of fat layers on expansion of Danish pastry during proving and baking*. Submitted to *J. Cereal Science*.

Derde, L. J., Gomand, S. V., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2012). *Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable  $\beta$ -amylase, maltotetraogenic and maltogenic  $\alpha$ -amylases*. *Food Chemistry*, 135(2), 713-721.



Díaz, M. (2006). “*Estudio de empackado en atmosfera modificada para productos de panificación tipo hojaldre*” Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UAEMex.

Díaz-Ramírez M., Calderón-Domínguez G., Chanona-Pérez J. J., Janovitz-Klapp A., López-Santiago R., Farrera-Rebollo R. R. & Salgado-Cruz M. P., (2013). *Modelling sorption kinetic of sponge cake crumb added with milk syrup*. International Journal of Food Science and Technology 2013, 48, 1649–1660

Drapron R, Godon B. (1987). *Role of enzymes in baking. Enzymes and their role in cereal technology*. Edited by Kruger JE, Lineback D y Stauffer CE. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, EUA. pp. 281-324.

Durán E., León A. E., Barber B., Benedito C. (2001). *Effect of low molecular weight dextrans on gelatinization and retrogradation of starch*. European Food Research and Technology.

Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., & Delcour, J. A. (2009). *Amylases and bread firming an integrated view*. Journal of Cereal Science, 50(3), 345-352.

Granato, D., & Masson, M. L. (2010). *Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach*. Food Science and Technology (Campinas), 30(4), 1090-1096.

Hernandez, G., & Majem, S. (2010). *Libro blanco del pan*. Publicado por editorial médica panamericana, Madrid, 4-5.

Hutchings, J. B., Luo, R., & Ji, W. (2002). *Calibrated colour imaging analysis of food*. Colour in Food, 352-366.

Kim, J. H., Maeda, T., & Morita, N. (2006). *Effect of fungal  $\alpha$ -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours*. Food Research International, 39(1), 117-126.

Kirkeby, P.G., 2007. *Margarine and dairy spreads : processing and technology*. Hui, Y.H. (Ed.), Handbook of Food Products Manufacturing. John Wiley & Sons, pp. 705-724.

León, A. E., Durán, E., & Benedito de Barber, C. (2002). Utilization of enzyme mixtures to retard bread crumb firming. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(6), 1416-1419.

Li, W., Dobraszczyk, B.J., Wilde, P.J. (2004). *Surface properties and locations of gluten proteins and lipids revealed using confocal scanning laser microscopy in bread*.



Lopes A. E., Kil C. Y. (2012) Effect of the addition of enzymes on the quality of frozen pre-baked French bread substituted with whole wheat flour. San Paulo, Brasil.

Massi, N. (2007). *Baking Fundamentals, chapter 10:laminated and steam-leavened dough*. The American Culinary Association.EUA.

McGill, E.A., 1975. *Puff pastry production*. Bak. Dig. 49 (1), 28e38.

Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H., & del Castillo, M. D. (2008). *Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread*. Journal of Cereal Science, 48(1), 123-132.

Ordoñez, M. H., & Osorio, D. D. (2013). *Características reológicas del pan de agua producto autóctono de Pamplona (Norte de Santander)*. Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 10(2).

Parker, R., & Ring, S. G. (2001). *Aspects of the physical chemistry of starch*. Journal of Cereal Science, 34(1), 1-17.

Patel J., Ng J.H.Y. , Hawkins, W., Pitts K., Chakrabarti B. (2012) *Effects of fungal alpha-amylase on chemically leavened wheat flour doughs*. CSIRO Food and Nutritional Sciences, Australia.

Patel, B. K., Waniska, R. D., & Seetharaman, K. (2005). *Impact of different baking processes on bread firmness and starch properties in breadcrumb*. Journal of Cereal Science, 42(2), 173-184.

Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2013). *Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review*. Food and Bioprocess Technology, 6(1), 36-60, Press LLC.

Primo-Martín, C., van Nieuwenhuijzen, N.H., Hamer, R.J. & van Vliet, T. (2007). *Crystallinity changes in wheat starch during the bread-making process: starch crystallinity in the bread crust*. Journal of Cereal Science, 45, 219–226.

Quaglia, G. N. A., Grosso, A. L., Franco, D., Pantanelli, A., Pan, L. G., Campana, M. C., & R Tomás, M. C. (1991). *Ciencia y tecnología de la panificación*. Acribia 2º Ed. pp. 1-28.

Ramírez, H., Carlos Hernán Bolaños, V., & Nuria Lutz Cruz, G. (2003). *Química de alimentos: Manual de laboratorio*. San José, CR: Universidad de Costa Rica.

Rosell, C. M., Haros, M., Escrivá, C., & Benedito de Barber, C. (2001). *Experimental approach to optimize the use of  $\alpha$ -amylases in breadmaking*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6), 2973-2977.



S. B. Kevser, Tütem E., Akyüz E., Özen S., Apak R. (2016). *Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction*. *Talanta* 147 pp.162–168.

Sahlström, S., & Bråthen, E. (1997). *Effects of enzyme preparations for baking, mixing time and resting time on bread quality and bread staling*. *Food Chemistry*, 58(1), 75-80.

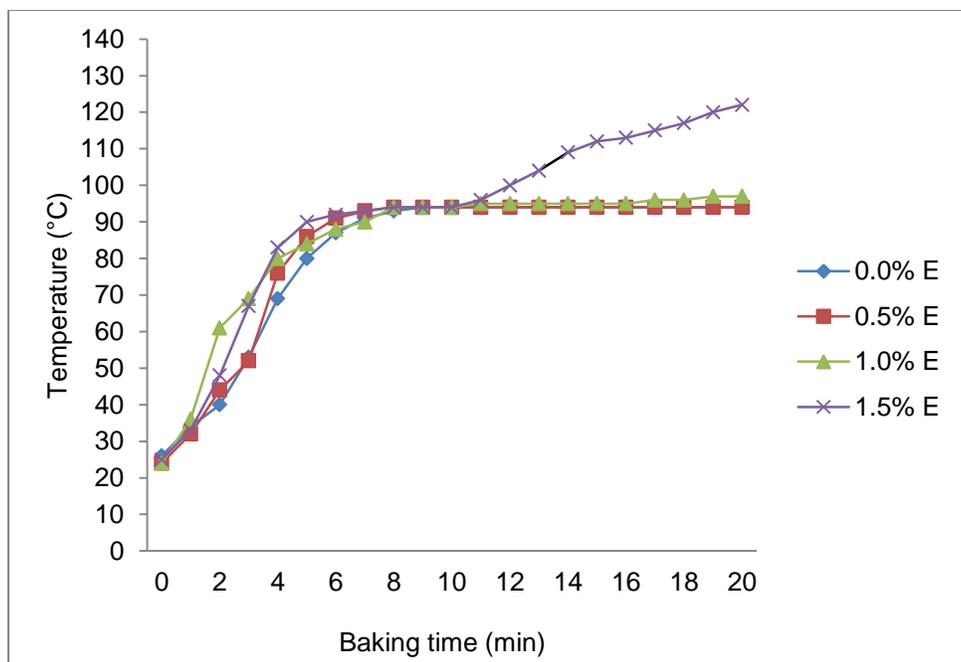
Sánchez, O. Palacios, S. Batista, Z. Díaz, N.P. Guerra (2016). *Simultaneous production of amylases and proteases by Bacillus subtilis in brewery wastes*. *Braz. J. Microbiol.* In proofreading.

Tejero, F. (2009). *Las enzimas en la panificación*. Asesoría técnica en panificación. Disponible en: <http://www.franciscotejero.com/tecnica/mejorantes/las%20encimas.htm>

Telloke, G.W. (1991). *Puff Pastry I: Process and Dough Ingredient Variables*. FMBRA UK.

Wieser, H. (2003). *The use of redox agents*. In S. P. Cauvin (Ed.), *Bread making: Improving quality*. Cambridge/Boca Raton: Woodhead Publishing Limited/CRC.

**Figure 1: Curves of internal temperature during baking process of the different puff pastry formulations over time.**





**Table 1: pH analysis**

| Sample | Specific volume | Specific volume in |
|--------|-----------------|--------------------|
|--------|-----------------|--------------------|

| Sample | pH raw puff pastry      | pH baked puff pastry   |
|--------|-------------------------|------------------------|
| F1     | 5.7 <sup>a</sup> ± 0.07 | 5.4 <sup>a</sup> ±0.21 |
| F2     | 5.6 <sup>a</sup> ± 0.12 | 5.3 <sup>a</sup> ±0.10 |
| F3     | 5.7 <sup>a</sup> ± 0.12 | 5.5 <sup>a</sup> ±0.12 |
| F4     | 5.7 <sup>a</sup> ± 0.14 | 5.3 <sup>a</sup> ±0.14 |

F1=0.0% enzyme  $\alpha$ -amylase (Control), F2 = 0.5% enzyme  $\alpha$ -amylase, F3= 1.0% enzyme  $\alpha$ - amylase, f4=1.5% enzyme  $\alpha$ -amylase. All formulations were performed with 100% of fat.

Means with the same superscript letters within a column are not significantly different ( $P > 0.05$ )

Means of three replicates  $\pm$  Standard deviation

**Table 2: Specific volumen analysis**



|    | <b>in raw puff pastry (cm<sup>3</sup>)</b> | <b>baked puff pastry (cm<sup>3</sup>)</b> |
|----|--|---|
| F1 | 100  | 668.33 <sup>a</sup> ± 33.11               |
| F2 | 100  | 720.00 <sup>a</sup> ± 50.99               |
| F3 | 100  | 1271.66 <sup>c</sup> ± 224.26             |
| F4 | 100  | 896.66 <sup>b</sup> ± 87.78               |

F1=0.0% enzyme  $\alpha$ -amylase (Control), F2 = 0.5% enzyme  $\alpha$ -amylase, F3= 1.0% enzyme  $\alpha$ - amylase, f4=1.5% enzyme  $\alpha$ -amylase. All formulations were performed with 100% of fat.  
 Means with the same superscript letters within a column are not significantly different (P > 0.05)  
 Means of three replicates  $\pm$  Standard deviation

**Table 3. Texture profile analysis**

| <b>Sample</b> | <b>Hardness in baked puff pastry (gf)</b> | <b>Fracturability in baked puff pastry (N.mm)</b> |
|---------------|---|---|
| <b>F1</b>     | 16.26 <sup>b</sup> ± 0.56                 | 6.46 <sup>a</sup> ± 1.49                          |
| <b>F2</b>     | 16.89 <sup>b</sup> ± 2.31                 | 7.03 <sup>ab</sup> ± 0.93                         |
| <b>F3</b>     | 11.59 <sup>a</sup> ± 2.88                 | 8.37 <sup>b</sup> ± 0.97                          |
| <b>F4</b>     | 20.17 <sup>c</sup> ± 0.75                 | 11.98 <sup>c</sup> ± 1.13                         |

F1=0.0% enzyme  $\alpha$ -amylase (Control), F2 = 0.5% enzyme  $\alpha$ -amylase, F3= 1.0% enzyme  $\alpha$ - amylase, f4=1.5% enzyme  $\alpha$ -amylase. All formulations were performed with 100% of fat.  
 Means with the same superscript letters within a column are not significantly different (P > 0.05)  
 Means of three replicates  $\pm$  Standard deviation

**Table 4: Color analysis in baked puff pastry**



| Sample | L*                        | a*                        | b*                        |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| F1     | 32.60 <sup>c</sup> ± 1.19 | 3.65 <sup>a</sup> ± 0.71  | 14.19 <sup>b</sup> ± 0.70 |
| F2     | 29.47 <sup>b</sup> ± 1.27 | 4.30 <sup>ab</sup> ± 0.76 | 13.56 <sup>b</sup> ± 0.37 |
| F3     | 27.82 <sup>b</sup> ± 1.16 | 4.56 <sup>ab</sup> ± 0.43 | 11.47 <sup>a</sup> ± 0.50 |
| F4     | 23.51 <sup>a</sup> ± 0.41 | 4.86 <sup>b</sup> ± 0.86  | 11.22 <sup>a</sup> ± 1.37 |

F1=0.0% enzyme α-amylase (Control), F2 = 0.5% enzyme α-amylase, F3= 1.0% enzyme α- amylase, f4=1.5% enzyme α-amylase. All formulations were performed with 100% of fat.

Means with the same superscript letters within a column are not significantly different (P > 0.05)

Means of three replicates ± Standard deviation

**Table 5: Fat content analysis**

| Sample | Fat content in raw puff pastry (%) | Fat content in baked puff pastry (%) |
|--------|------------------------------------|--------------------------------------|
| F1     | 38.41 <sup>ab</sup> ± 0.19         | 36.34 <sup>b</sup> ± 0.11            |
| F2     | 37.75 <sup>b</sup> ± 0.16          | 31.56 <sup>a</sup> ± 0.38            |
| F3     | 37.37 <sup>b</sup> ± 0.39          | 31.52 <sup>a</sup> ± 0.80            |
| F4     | 37.31 <sup>b</sup> ± 0.37          | 31.20 <sup>a</sup> ± 0.66            |

F1=0.0% enzyme α-amylase (Control), F2 = 0.5% enzyme α-amylase, F3= 1.0% enzyme α- amylase, f4=1.5% enzyme α-amylase. All formulations were performed with 100% of fat.

Means with the same superscript letters within a column are not significantly different (P > 0.05)

Means of three replicates ± Standard deviation

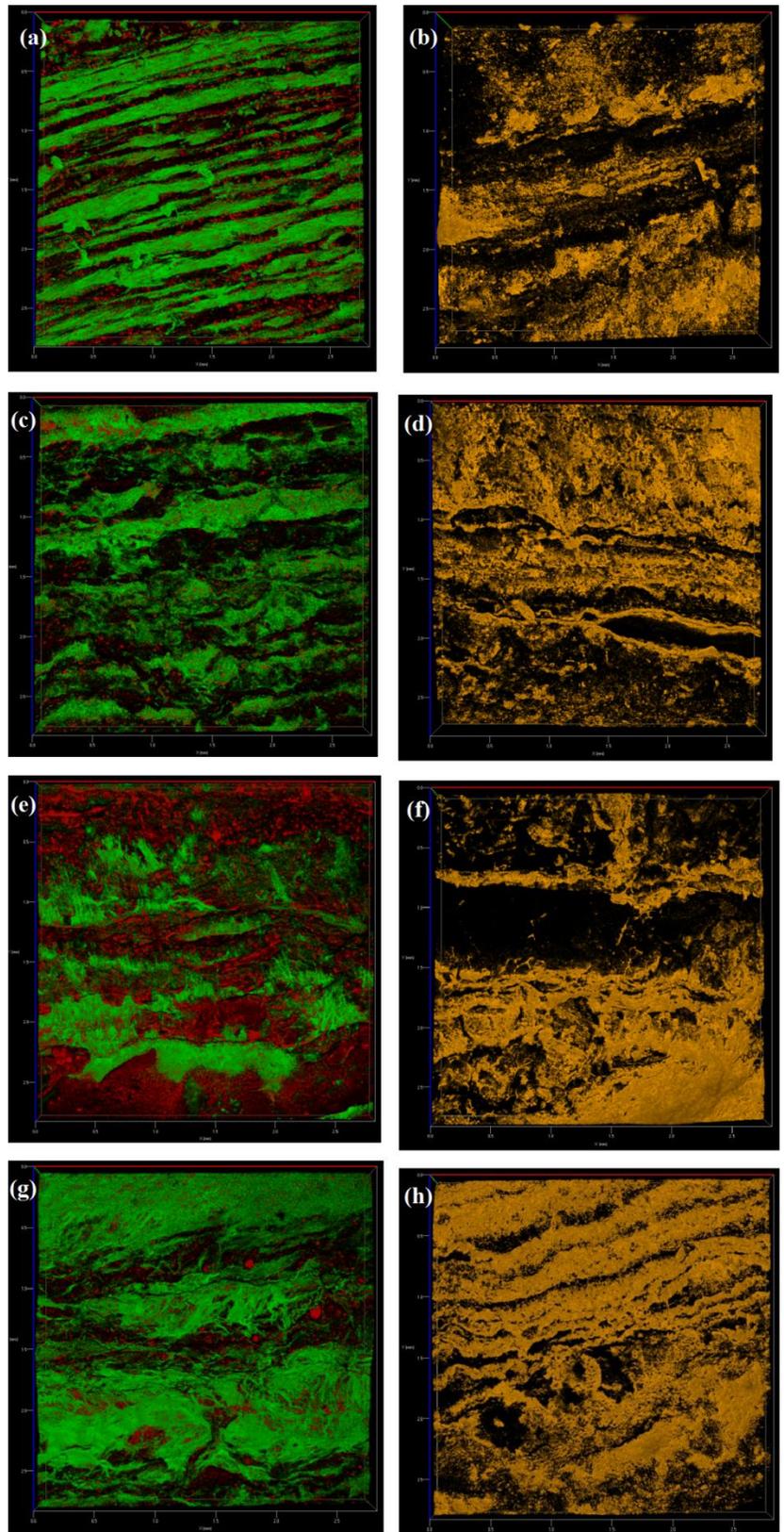


**Table 6: Analysis of different fat percentages used during laminating process in puff pastry**

| Sample | Specific volume in raw puff pastry (cm <sup>3</sup> ) | Specific volume in baked puff pastry (cm <sup>3</sup> ) | pH raw puff pastry | pH baked puff pastry | L* baked puff pastry | a* baked puff pastry | b* baked puff pastry | Fracturability in baked puff pastry (N.mm) | Hardness in baked puff pastry (gf) | Raw puff pastry Fat content by Soxhlet extraction | Baked puff pastry fat content by Soxhlet extraction | Lost fat during baking (%) |
|--------|---|---|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--|------------------------------------|---|---|----------------------------|
| F1     | 100   | 720.00c ± 50.99   | 5.68ab ± 0.12      | 5.38a ± 0.10         | 29.47a ± 1.27        | 4.30a ± 0.76         | 13.56a ± 0.37        | 7.03a ± 0.93                               | 16.89a ± 2.31                      | 37.75c ± 0.16                                     | 31.56c ± 0.38                                       | 6.2                        |
| F2     | 100   | 646.66b ± 16.32   | 5.77ab ± 0.16      | 5.39a ± 0.15         | 33.00ab ± 2.35       | 5.54b ± 0.37         | 14.57b ± 1.10        | 8.59a ± 0.43                               | 17.02a ± 3.00                      | 30.37b ± 0.42                                     | 22.77b ± 0.67                                       | 7.6                        |
| F3     | 100   | 398.33a ± 31.88   | 5.89b ± 0.13       | 5.35a ± 0.15         | 35.10b ± 0.95        | 5.31b ± 0.54         | 14.58b ± 1.02        | 10.67b ± 1.41                              | 33.95b ± 2.17                      | 22.81a ± 0.20                                     | 16.16a ± 0.50                                       | 6.7                        |

F1=100% laminating fat (Control), F2 = 80% laminating fat, F3= 60% laminating fat. All formulations were performed with 0.5% enzyme  $\alpha$ -amylase.  
 Means with the same superscript letters within a column are not significantly different ( $P > 0.05$ )  
 Means of three replicates  $\pm$  Standard deviation

## Images analysis



**Figure 2:** Microscopy images of raw puff pastry by CSLM of the different formulations.

- (a,b) Formulation 1 (0.0% enzyme)
- (c,d) Formulation 2 (0.5% enzyme)
- (e,f) Formulation 3 (1.0% enzyme)
- (g,h) Formulation 4 (1.5% enzyme)





