



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**" DESARROLLO DE UN MODELO DE OPTIMIZACIÓN
PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE
SUSTITUTOS DE GLUTEN EN PAN DE AMARANTO"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ITZEL SOLÍS GODOY

DIRIGIDA POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Desarrollo de un modelo de optimización para
determinar la concentración óptima de sustitutos de
gluten en pan de amaranto.

por

Itzel Solís Godoy

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQLIN-255491



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"DESARROLLO DE UN MODELO DE OPTIMIZACIÓN
PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE
SUSTITUTOS DE GLUTEN EN PAN DE AMARANTO"**

PROTOCOLO TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ITZEL SOLÍS GODOY

DIRIGIDA POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
DIRECTOR

M.I AXEL ESCAMILLA GARCÍA
CO-DIRECTOR

DR. ALDO AMARO REYES
SINODAL

DRA. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Celiaquía	1
1.2 Pan	1
1.3 Materia prima en la elaboración de pan.....	1
1.3.1 Agua.....	1
1.3.2 Harina.....	2
1.3.2.1 Harina de trigo.....	2
1.3.2.2 Harina de amaranto	2
1.3.3. Azúcar	3
1.3.4 Sal	3
1.3.5 Grasa.....	3
1.3.6 Levadura	4
1.3.7 Gluten.....	4
1.3.8 Aditivos.....	4
1.3.9 Sustitutos de gluten.....	5
1.3.9.1 Clara de huevo.....	5
1.3.9.2 Goma xantana.....	5
1.4 Parámetros de calidad de pan	6
1.4.1 Volumen	6
1.4.2 Textura mediante análisis de imagen.....	6
1.4.3 Digestibilidad del almidón.....	8
1.5 Métodos de optimización	9
2. HIPÓTESIS.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 General.....	12

3.2 Específicos	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Materiales	13
4.2 Métodos.....	13
4.2.1 Formulación y elaboración de pan.....	13
4.2.2 Caracterización de pan.....	15
4.2.2.1 Volumen.....	15
4.2.2.2 Calidad de miga	15
4.2.3 Modelo y optimización del modelo.....	15
4.2.3.1. Modelado	15
4.2.3.2 Optimización del modelo.....	15
4.2.3.3 Validación de modelo	16
4.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	16
4.2.5 Digestión de almidón <i>in vitro</i>	16
4.3 Análisis estadístico.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1 Volumen	18
5.2 Análisis de imagen.....	19
5.3 Modelo de optimización	20
5.4 Validación del modelo de optimización.....	24
5.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	25
5.6 Digestibilidad del almidón (<i>in vitro</i>).....	26
6. DISCUSIÓN.....	28
6.1 Volumen	28
6.2 Análisis de imagen.....	28
6.3 Modelo de optimización	29
6.4 Microscopía electrónica de barrido	30
6.5 Digestibilidad del almidón	30
7. CONCLUSIONES	32
8. REFERENCIAS	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Formulación para masa dulce (base % panadero)	14
2. Volumen de pan de trigo, amaranto con y sin sustitutos de gluten	18
3. Parámetros de textura obtenidos mediante análisis de imagen	20
4. Validación del modelo de optimización	22
5. Digestibilidad <i>in vitro</i> del almidón de las diferentes formulaciones y concentración de maltosa	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Modelo de optimización para el pan de amaranto con sustitutos de gluten	22
2. Superficie de respuesta de las muestras de pan de amaranto con sustitutos de gluten	23
3. Microestructura de la miga de pan de trigo y amaranto con y sin sustitutos de gluten (SEM 500X, 20 000 kV)	26

RESUMEN

El pan es muestra un consumo relevante a nivel mundial, su aceptación por parte de los consumidores depende del aroma, textura, color, volumen, entre otros. La harina de trigo es la más utilizada en la elaboración de pan debido a su composición, conteniendo hasta un 90 % p/p de gluten, el cual desempeña un papel clave en la calidad del pan (textura, cohesividad, viscosidad y elasticidad de la masa). La enfermedad celiaca se presenta como un padecimiento autoinmune, crónico y sistémico, debido a la intolerancia a fracciones proteicas del gluten como la gliadina. Debido a esto se han estudiado cereales libres de gluten para la elaboración del pan, tales como el amaranto. Sin embargo, estos se caracterizan por poseer mala calidad de miga y volúmenes pequeños, entre otros defectos. Es por ello que el objetivo de esta investigación consistió en desarrollar un modelo predictivo para determinar el grado de reemplazo óptimo de sustitutos de gluten, tales como clara de huevo (CH) y goma de xantana (GX), en pan de amaranto para obtener propiedades físicas y organolépticas similares a un pan de trigo. Las propiedades por evaluar fueron: volumen específico, calidad de miga mediante análisis de imagen, propiedades físicas (volumen y textura), así como su digestibilidad *in vitro*. Se obtuvieron tres concentraciones de aditivos, óptimas para obtener un pan libre de gluten (a base de harina de amaranto) con características físicas y de textura similares a un pan de trigo. Estas concentraciones en porcentaje base panadera fueron: 2.32:2.68, 3.03:1.97, 5:0 CH:GX (p/p), respectivamente. De acuerdo con la validación realizada, la relación 5:0 es la que cumple con las mejores características. Sin embargo, deben realizarse experimentos de comprobación para asegurar que es la mejor formulación. El uso de sustitutos de gluten permitirá proporcionar a los consumidores celiacos un producto con propiedades y calidad similares al pan basado en harina de trigo.

1. ANTECEDENTES

1.1 Celiacúa

Las personas afectas por la enfermedad celíaca representan una fracción elevada de la población a nivel mundial (Mir y col., 2016). Es una enfermedad autoinmune, crónica y sistémica, que afecta a individuos genéticamente susceptibles. La respuesta inmune activada es específica para la gliadina, fracción de péptidos tóxicos encontrados en el gluten, y provoca un incremento en la permeabilidad del intestino delgado dañando su mucosa, además de causar inflamación y atrofia de vellosidades (Biesiekierski, 2017; Ludvigsson, 2018). Actualmente, la única acción que se recomienda para estos individuos consiste en mantener ausencia de gluten en la dieta durante toda la vida (Butterworth y Los, 2019).

1.2 Pan

El pan es uno de los alimentos básicos de mayor consumo en muchos países. La demanda de pan está aumentando rápidamente en las regiones en desarrollo del mundo, siendo bastante popular en México (Phongthai y col., 2016). Según la Cámara Nacional de la Industria Panificadora, en México se consumen aproximadamente 33.5 kg de pan al año. El pan se puede definir como un producto perecedero derivado de la cocción de masa generada por una mezcla de harina de trigo, sal comestible y agua potable, la cual se fermenta por microorganismos fermentativos como *Saccharomyces cerevisiae* (Mesas y Alegre, 2002). La fermentación se realiza debido a la respiración aerobia de esta levadura, teniendo este proceso dos funciones: contribuir a la maduración de la masa y generar gas (CO₂) por aireación de la masa (Payehuanca y Matos, 2011).

1.3 Materia prima en la elaboración de pan

1.3.1 Agua

El agua es importante ingrediente utilizado para la elaboración de pan, ya que afecta mayormente a su textura y la miga (Mondal y Datta, 2008). El fenómeno de retrogradación del almidón promovido por la pérdida de agua, tiene efectos en el

aumento de la firmeza del pan (Monteau y col., 2017). Por ejemplo, panes con contenidos de agua de hasta 50 % resultan en un pan ligero de textura fina, mientras que los que aquellos que poseen porcentajes de agua más altos generan una producción mayor de burbujas de CO₂, ocasionando que la miga de pan sea más gruesa (Mondal y Datta, 2008).

1.3.2 Harina

1.3.2.1 Harina de trigo

Las principales harinas de pan varían y pueden ser de trigo duro, cereales que no sean de trigo, pseudocereales, entre otros (Ficco y col., 2017). El trigo es el cultivo más importante para la panificación, ya que durante el horneado tiene un rendimiento más elevado que el uso de todos los demás cereales y proporciona una cantidad importante de nutrientes, además, forma parte de una dieta equilibrada (Dewettinck y col., 2008). En América del Norte, el pan se hornea principalmente con harina de trigo blanco debido a su composición (Xu y col., 2019). La harina de trigo se compone de 70 % p/p de almidón, el cual le confiere solidez a la miga, 12 % p/p proteínas (de las cuales, alrededor del 80 % p/p son gluten), y 2 % p/p de lípidos (Payehuanca y Matos, 2011). Los lípidos presentes en la harina de trigo, que son de naturaleza no polar, durante la panificación le confieren al pan características positivas de extensibilidad y volumen (Tebben y col., 2018).

1.3.2.2 Harina de amaranto

El amaranto actualmente está ganando popularidad debido a la calidad nutricional que proporciona este pseudocereal, proporcionando mayor calidad nutritiva que la mayoría de los granos de cereales (Cárdenas-Hernández y col., 2016): el grano contiene 61.4 % p/p de almidón, 16.5% p/p de proteína, 5.7% p/p de grasas insaturadas, 2.6% p/p de fibra, vitaminas (E, B2 y C), minerales (calcio, magnesio, zinc y hierro) y compuestos fenólicos. La proteína del amaranto contiene 40 % p/p de albúmina, 20 % p/p de globulina, de 2 a 3 % p/p de prolamina y de 25 a 30 % p/p de glutelina (Inglett y col., 2015; Tamsen y col., 2018). Además, la proteína en el grano, después del proceso de digestión, produce péptidos con actividades antihipertensivas, antioxidantes, antitrombóticas, antiproliferativas y antiinflamatorias, entre otras (Cárdenas-Hernández y col., 2016). Al no

contener la fracción de glutenina del gluten, se convierte en un alimento alternativo para individuos con enfermedad celiaca (Inglett y col., 2015).

1.3.3. Azúcar

Los carbohidratos son fundamentales para producir el pan, entre ellos se encuentran: disacáridos como maltosa y sacarosa, y monosacáridos como glucosa y fructosa (Mondal y Datta, 2008). Estos azúcares tienen un efecto positivo en la actividad fermentativa de la levadura, aumentando el tiempo de vida de anaquel del pan, al proporcionar una mejor retención de la humedad (Tebben y col., 2018). Durante la fermentación, la levadura se alimenta de los azúcares fermentables presentes en el medio y produce rápidamente gas en forma de CO₂, permitiendo que la velocidad de expansión de la masa sea mayor, resultando en menor tiempo de fermentación (Packkia y col., 2019).

1.3.4 Sal

En el caso de la masa para panificación, la sal fortalece la red de gluten ya que logra un incremento en la estabilidad, extensibilidad y resistencia de la masa, mejorando así la textura del pan. Adicionalmente, la sal ayuda a mejorar el sabor y apariencia del mismo (Crucean y col., 2019).

1.3.5 Grasa

Las grasas se emplean frecuentemente en la obtención de productos horneados. Los lípidos proporcionan una variedad de propiedades beneficiosas durante el procesamiento y almacenamiento del pan. Las principales fuentes de lípidos que se incorporan para formular el pan son harina de trigo, manteca y surfactantes (Pareyt y col., 2011). Algunas funciones de los lípidos en el desarrollo del pan es la desestabilización de las burbujas de gas y por lo tanto tienden a la disminución del volumen de la hogaza (Tebben y col., 2018).

1.3.6 Levadura

Varias levaduras tienen una importante contribución como microorganismos en la industria alimentaria. La levadura que se encuentra más en masa fermentada estable es la *Saccharomyces cerevisiae* (Papadimitriou y col., 2019), la cual tiene la capacidad de fermentación de azúcares con la consiguiente producción de dióxido de carbono y etanol (Zhu, 2014). Es quizás la levadura más útil, y comercialmente importante, ya que desde hace mucho tiempo ha sido fundamental para la obtención de productos fermentados como bebidas alcohólicas y pan de levadura (Waites y col., 2009; Tortora y col., 2017).

1.3.7 Gluten

El gluten consiste de una mezcla de fracciones proteicas destinadas al almacenamiento de nutrientes para el embrión, localizándose en los endospermos del grano maduro de trigo y algunos otros cereales como el centeno y la cebada (Drabińska y col, 2020). La mezcla de proteínas de gluten se compone de una mezcla de distintas proteínas que le confieren consistencia al pan. Se encuentran principalmente la gliadina, que se encarga de la extensibilidad y viscosidad, y glutenina que proporciona elasticidad y resistencia a la masa (Phongthai y col., 2016; Biesiekierski, 2017).

La cantidad y calidad del gluten determinan la capacidad de retención de agua, siendo este aspecto muy favorable para lograr una fuerte retención del CO₂ durante la fermentación (Cardoso y col., 2019). Además, son muy importantes en la cocción de los productos que se elaboran con harina de trigo, ya que mejoran textura y calidad del pan (Han y col, 2019).

1.3.8 Aditivos

Algunos aditivos como oxidantes, enzimas y emulsionantes se pueden adicionar a la masa para mejorar el rendimiento de la panificación, facilitar el procesamiento, garantizar la calidad, preservar la frescura y las propiedades del pan (Corral y col, 2017). Muchas enzimas aparecen naturalmente en la harina, pero se agregan algunas otras, específicamente por sus efectos sobre las propiedades de la masa y el pan, debido al mejoramiento del aroma, la calidad y las cualidades nutricionales de éste (Pico y col., 015).

Los emulsionantes se utilizan principalmente para fortalecer la masa, suavizar la miga, e incrementar el volumen del pan (Tebben y col. 2018).

1.3.9 Sustitutos de gluten

Los panes sin gluten son de menor calidad y aceptabilidad en comparación a los que contienen gluten (Naqash y col., 2017). Se ha considerado añadir algunos aditivos para reducir la dependencia del trigo y proponer una alternativa para que las personas que padecen enfermedad celiaca puedan consumir productos elaborados a partir de otros cereales y pseudocereales libres de gluten sin afectar la calidad de los productos (Tamsen y col., 2018).

1.3.9.1 Clara de huevo

La albúmina, coloquialmente conocida como clara de huevo, es una solución acuosa que ocasiona un aumento en el volumen y un mejoramiento en la retención de gas (Naqash y col., 2017). Cuando la clara de huevo se bate, las proteínas se desenrollan y algunas tienen la capacidad de asociarse con aire.

A medida que el batido desnaturaliza las proteínas, la preparación crece, pues el aire aumenta su volumen (Koppmann, 2012), de esta manera se forma la espuma, por lo cual se le conoce como punto de nieve o punto de turrón. Phongthai y col. (2016) comprobaron que el efecto positivo observado sobre la elasticidad de la masa libre de gluten se relaciona principalmente con la función de la albúmina de huevo.

1.3.9.2 Goma xantana

La goma de xantana es un hidrocoloide compuesto por un heteropolisacárido extracelular de alto peso molecular secretado por *Xanthomonas campestris* (Hager y col., 2013). La goma de xantana contribuye a obtener espumas estables a base de proteínas, con propiedades reológicas características de los sólidos viscoelásticos, como lo es el gluten (Encina y col, 2018). Con una dosis alta de goma xantana, el volumen específico de pan disminuye, mientras que en concentraciones bajas (1 % p/p), aumenta el volumen y resistencia de masas elaboradas con harinas diferentes al

trigo (Cajas y col., 2019). Sin embargo, para algunas harinas proporcionan un efecto no deseable para la dureza de la miga (Hager y col., 2013).

1.4 Parámetros de calidad de pan

La producción de todas las masas madre depende del tipo de harina y de su calidad, así como de los parámetros del proceso (temperatura de fermentación, pH, rendimiento de la masa, actividad de agua, duración de la fermentación, entre otros). Lo anterior determina la dinámica y el resultado de procesos de fermentación de masa fermentada (De Vuyst y col., 2017).

Si cada etapa que interviene para obtener el producto final no se realiza correctamente, se tendrán repercusiones en el volumen, consistencia, color, textura, entre otros, que afecten el producto que se deseé elaborar (Bedolla y col., 2004).

1.4.1 Volumen

Durante la cocción de la masa, la expansión de ésta, el volumen y textura del pan después de horneado se deben al crecimiento de burbujas de gas. El límite de expansión de estas burbujas está relacionado directamente con su estabilidad, debido a la coalescencia y la pérdida de gas cuando las burbujas colapsan. El volumen específico (relación volumen a peso) se usa frecuentemente para evaluar la calidad del pan (Silow y col., 2016).

Una reducción del volumen puede ocasionarse por una harina de bajo porcentaje en proteínas, fórmula mal balanceada, exceso de sal, manipulación o una temperatura excesiva del horno. Por otro lado, un exceso de volumen puede deberse a un desarrollo fermentativo excesivo, falta de sal, temperatura de horno muy baja, o masa ligeramente vieja (Bedolla y col, 2004).

1.4.2 Textura mediante análisis de imagen

Las estadísticas de segundo orden de una imagen son valores estadísticos únicos que se utilizan para resumir la matriz de coocurrencia de nivel de gris (GLCM, por sus siglas en inglés). Las estadísticas descriptivas derivadas de GLCM son medidas importantes de textura de imagen y estas son contraste, disimilitud, homogeneidad

(diferencia inversa momento), segundo momento angular (ASM), energía, probabilidad máxima, entropía, media (μ), desviación estándar (σ) y correlación (Zubair & Alo, 2019). El ASM es un parámetro de uniformidad, si se obtienen valores altos, indican una mayor uniformidad direccional en la imagen y se define de acuerdo a la Ecuación (1).

$$\sum_{i,j=0}^{n-1} [P(i, j)]^2 \quad (1)$$

Las variaciones locales de la escala de gris en los pixeles y su vecino de las imágenes, puede medirse mediante el contraste. El rango de contraste se encuentra entre 0 y $[(\text{tamaño (GLCM, 1), -1)]^2$. El contraste también se conoce como varianza e inercia. La Ecuación (2) define este parámetro.

$$\sum_{ij} |i - j|^2 P_{\theta}(i - j) \quad (2)$$

La homogeneidad, también llamada diferencia inversa de momento, es una medida similar a la energía; que también representa la homogeneidad local de la imagen, y está dada por la Ecuación (3).

$$\sum_{ij} \frac{P_{\theta}(i-j)}{1+(i-j)^2} \quad (3)$$

La aleatoridad o desorden de las imágenes puede medirse mediante la entropía (Ecuación 4), la cual puede aplicarse para la caracterización de su textura. Es una indicación de la complejidad dentro de una imagen, por lo que, al aumentar la complejidad de las imágenes, los valores de entropía serán mayores.

$$\sum_{i,j=0}^{n-1} -P_{ij} [\ln(P_{ij})] \quad (4)$$

En cada una de las ecuaciones P representa los recuentos de histogramas utilizados para 256 contenedores de imagen en escala de grises, (i, j) que representan cada elemento en GLCM (Arzate-Vázquez y col., 2012; Hernández-Carrión y col., 2015; Pérez-Nieto y col., 2010)

La redondez o circularidad (relación área:perímetro), excluye las irregularidades locales como la relación entre el área de un objeto y el área de un círculo con el mismo perímetro convexo (Ecuación 5):

$$C_i = 4\pi \frac{A_i}{P_i^2} \quad (5)$$

donde C_i es la circularidad, A_i y P_i son el área y perímetro usado en imageJ respectivamente (Ireti y col., 2018). Un círculo perfecto tendrá una circularidad de 1.0, mientras que un polígono alargado tendrá un valor cercano a 0,0.

Al momento de analizar un material, se deben realizar mediciones sobre el mismo, de modo de ponderar la muestra y agregar objetividad a las observaciones. Para ello existe una amplia gama de herramientas de software; ImageJ está diseñado para el procesamiento de imágenes científicas, desarrollado por Wayne Rasband en el U.S. National Institutes of Health (NIH) (González, 2018).

1.4.3 Digestibilidad del almidón

La calidad nutricional del almidón depende principalmente del procesamiento al cual se haya sometido y de su estado. La digestión da inicio con la hidrólisis del almidón, a partir del cual se obtienen los azúcares utilizados para la fermentación.

Una hidrólisis enzimática del almidón ocurre cuando se agregan dos enzimas: la α -amilasa y luego una amiloglucosidasa (AMG), resultando en la obtención de monómeros de glucosa. Se pasa por etapas intermedias como las dextrinas, posteriormente se genera maltosa y finalmente la hidrólisis completa termina con la liberación de glucosa (Miranda y Molina, 2015).

Con base en el tiempo de liberación de la glucosa y absorción en el tracto gastrointestinal, el almidón se puede clasificar en tres categorías. El almidón de

rápida digestión se caracteriza por ser fácilmente hidrolizado por las enzimas α -amilasa, glucoamilasa y sacarasa-isomaltasa.

Esto ocurre en el intestino delgado, de manera que se produce glucosa libre para su posterior absorción, tardando aproximadamente 20 min (Villarreal y col., 2018). La segunda categoría de almidón es el de baja digestibilidad, su absorción es más lenta llevándose a cabo entre 20 y 120 min y es utilizado principalmente en el desarrollo de alimentos procesados (Suárez y col., 2009; Villarreal y col., 2018).

La tercer categoría de almidón es aquel que presenta una digestibilidad que puede ser parcial o resistente, tardando más de 120 min en ser digerido. Este almidón ocurre en alimentos que durante su elaboración y por el tipo de procesamiento, presenta cambios estructurales. La consecuencia de esto es que existe una inhibición de su hidrólisis por las enzimas digestivas, ya que no pueden penetrar en el almidón, ocasionando resistencia a la digestibilidad (Nugent, 2005).

1.5 Métodos de optimización

Con la finalidad de aumentar la eficiencia y promover la rentabilidad en la industria panadera, se han desarrollado diversos métodos para optimizar los procesos de panificación y obtener productos de características específicas. Un ejemplo de esto es el uso de algoritmos de optimización evolutiva y los métodos de optimización de objetivos múltiples (MOO) (Hecker y col., 2013).

La alta demanda del consumidor por alimentos de buena calidad nutricional y sensorial, ha obligado al desarrollo de otros productos mediante la sustitución de sus ingredientes. Sin embargo, la capacidad sobre cómo combinar de manera óptima las materias primas, el aporte de energía, y producir diferentes tamaños de panes con un beneficio es limitada (Ekechukwu y col., 2011).

MOO es una metodología general destinada a identificar las mejores compensaciones entre varios objetivos en conflicto. Este método consiste en el procesamiento de objetivos múltiples, para transformar el problema original de objetivos múltiples en un problema solucionable. Se cuenta con un algoritmo de optimización, para buscar soluciones de compensación para el problema de objetivos múltiples (Madoumier y col., 2019).

Un método de procesamiento de objetivos múltiples requiere: establecer los objetivos de optimización e indicadores asociados. Estos se cuantifican o describen mediante indicadores de rendimiento y de un modelo de proceso de alimentos predictivo, que consiste en identificar el efecto de diferentes valores de las variables para evaluar las diferentes soluciones de diseño disponibles (Craheix y col., 2015).

Los MOO funcionan de la siguiente manera, mediante algoritmos evolutivos se genera primero un conjunto múltiple de soluciones posibles al azar. Este conjunto múltiple de soluciones posibles se evalúa para determinar su calidad. Un cierto número de soluciones posibles se seleccionan como causas.

Estas son soluciones posibles que se utilizarán para generar nuevas soluciones posibles. Los siguientes pasos son combinar y/o modificar las causas utilizando operadores de variación para generar nuevas soluciones y evaluar estas nuevas soluciones. Se selecciona un conjunto múltiple de soluciones para comprender la población muestral en la próxima creación del algoritmo. Esto se repite hasta alcanzar los objetivos deseados (Menzies y col., 2015).

2. HIPÓTESIS

El desarrollo de un modelamiento matemático permitirá establecer el porcentaje óptimo de adición de sustitutos de gluten (clara de huevo y goma xantana) en pan, utilizando como base harina de amaranto para obtener un producto de panificación con propiedades físicas (textura, calidad de miga, volumen) similares a las de un pan elaborado a base de harina de trigo.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Desarrollar un modelamiento matemático para determinar el grado de sustitución óptimo de sustitutos de gluten en pan a base de amaranto para obtener propiedades físicas similares a un pan de trigo.

3.2 Específicos

- ✓ Determinar las propiedades físicas de los panes de trigo y amaranto.
- ✓ Determinar las propiedades físicas del pan a base de amaranto adicionado con sustitutos de gluten.
- ✓ Desarrollar un modelo de optimización aplicando un método de identificación de sistemas que permita establecer la concentración maximizada de los sustitutos de gluten para obtener pan a base de amaranto con características similares al pan de trigo.
- ✓ Validar el modelo de optimización obtenido.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

Harina refinada de trigo sin aditivos (Campo Vivo, CDMX, México) con 13.17 % de humedad y 10.6% (base seca) de proteína, huevo entero fresco (San Juan, Jalisco, México), leche en polvo desgrasada (Svelty, Vaud, Suiza), grasa vegetal (Inca, Monterrey, México), levadura instantánea (Nevada oro, Marcq-en-Barœul, Francia), sal y azúcar. Harina de amaranto (Sanomundo, CDMX, México), claras de huevo (San Juan, Jalisco, México), goma xantana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)

4.2 Métodos

4.2.1 Formulación y elaboración de pan

La formulación del pan expresado en porcentaje panadero (porcentaje % de la composición de la masa del pan en función de la harina) se muestra en el Cuadro 1.

Se utilizó harina de trigo para la elaboración del pan control. Se realizó un premezclado de los ingredientes secos (sal, azúcar, leche, levadura y harina) en una batidora (Blazer, B25F, San Juan del Río, México) durante un minuto a baja velocidad. Se adicionó la grasa previamente fundida y se mezcló durante 2 min a baja velocidad.

Una vez que se concluyó con el mezclado de la grasa y los materiales secos, se adicionó agua mezclando a velocidad media, deteniendo el mezclado a los 7 y 10 min para realizar limpieza de tazón, finalmente se mezcló hasta el desarrollo óptimo de la masa.

Posteriormente, se procedió a la fermentación en horno a 37 °C (Vulcan & Wolf, VC4ED, Baltimore, MD, EUA) realizando procesos intermedios de eliminación de aire de la masa (80, 120 y 145 min). Se realizó el boleado de la masa, formando muestras de 60 g y dejándolas fermentar 55 min a 37 °C. El pan fue horneado a una temperatura de 180 °C durante 45 min.

Cuadro 1. Formulación para masa dulce (base % panadero)

MEZCLA	VOLUMEN (ml)
Trigo (C+)	123.33 ± 1.53 ^a
Amaranto (C-)	110.00 ± 0.00 ^b
Amaranto con CH-GX	
0-5	108.50 ± 0.71 ^b
0.2-4.8	112.33 ± 4.51 ^b
0.4-4.6	106.00 ± 3.00 ^b
0.5-4.5	104.00 ± 1.00 ^b
0.6-4.4	88.50 ± 2.12 ^c
3.6-1.4	104.00 ± 2.83 ^b
3.8-1.2	125.50 ± 2.12 ^a
4.0-1.0	133.00 ± 2.83 ^a
4.2-0.8	136.50 ± 0.71 ^c
4.4-0.6	132.00 ± 1.41 ^a
4.5-0.5	133.50 ± 2.12 ^a
4.6-0.4	124.33 ± 9.19 ^a
4.8-0.2	115.00 ± 9.90 ^{ab}
5.0-0	122.00 ± 1.41 ^{ab}

**Agua considerando los aportes de huevo, grasa y levadura. C+: Control positivo (pan elaborado con harina de trigo); C-: Control negativo (pan elaborado con harina de amaranto, sin sustitutos adicionales); M1: Pan elaborado con harina de amaranto con sustitutos de gluten (clara de huevo y goma xantana) en diferentes concentraciones. El % panadero hace referencia a la masa de harina a 100 g. Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p>0.05$), $n=3$.

4.2.2. Diseño de mezclas

El diseño de mezclas se realizó utilizando el programa Minitab 20.3 (R2010a, Natick, MA, EUA). Se desarrolló un diseño de mezclas reticular simple, considerando que el sustituto de gluten que puede agregarse a la masa es de 5%.

Los sustitutos de gluten que se utilizaron en el presente trabajo son clara de huevo (CH) y goma xantana (GX). El resto de la formulación se realizará de acuerdo con el Cuadro 1 descrita en M1 (Cuadro 1).

4.2.3 Caracterización de pan

Se determinó el efecto de la aplicación de sustitutos de gluten en las propiedades físicas del pan.

4.2.3.1 Volumen

El volumen se determinó utilizando el método estándar de la AACC 10-05.01 (1985), que involucra el desplazamiento de semillas de colza. El volumen específico se calculó por la relación volumen/masa, expresado en ml/g (Corral y col., 2017).

4.2.3.2 Calidad de miga

La calidad de la miga de pan se evaluó mediante análisis de imagen. Los panes elaborados se cortaron en mitades y se capturaron imágenes digitales a escala completa a 600 puntos por pulgada (ppp) (Caputo, 2015) utilizando un escáner de imágenes (EPSON, L4150, Seiko, Japón); las imágenes fueron guardadas en formato TIFF y procesadas en el programa ImageJ 1.53e (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Se evaluaron los siguientes parámetros:

4.2.4 Modelo y optimización del modelo

4.2.4.1. Modelado

Los datos que se utilizaron para el desarrollo del modelo fueron obtenidos de las pruebas de calidad de pan, recolectando un total de 45 datos por prueba. A partir de los resultados obtenidos, se desarrollaron ecuaciones utilizando MINITAB 18 para determinar la relación de los componentes de la formulación con los parámetros de calidad evaluados.

4.2.4.2 Optimización del modelo

La optimización del modelo se realizó siguiendo la metodología de Hecker y col. (2013). Se formó una matriz A, con todas las concentraciones de sustitutos de gluten (SG). Las filas y columnas de la matriz A representan los productos y los parámetros de calidad. Una entrada cero en la matriz A indica que el producto no contiene SG.

La cantidad de SG de todos los productos en todas las etapas se calculó para la secuencia de productos en función de la matriz A y formó una nueva matriz B. Esto se repitió hasta alcanzar los objetivos deseados. Se desarrolló un algoritmo adaptado para el problema de programación de panadería mediante el programa MATLAB, cada eje representa el cambio de cada una de las variables.

4.2.4.3 Validación de modelo

Una vez obtenido el modelo y calculado las concentraciones óptimas de sustitutos de gluten para pan de amaranto, con análisis de imagen se midieron los mismos parámetros físicos y de textura anteriores, así como calidad de la corteza, grado de gelatinización y digestibilidad del almidón para compararlo con los panes control positivo y negativo.

4.2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La modificación en la estructura de la miga de pan de los controles positivo y negativo y las concentraciones maximizadas, obtenidas previamente del modelo de optimización, se evaluó mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (EVO-50, Carl Zeiss UltraPlus, Oberkochen, Alemania).

4.2.6 Digestión de almidón *in vitro*

La digestión del almidón se evaluó utilizando el método *in vitro* reportado por Holm y col (1988). A 500 mg de harina de pan se le añadieron 50 ml de amortiguador de fosfatos, y se incubó a 37°C con agitación constante. Alícuotas de 0.2 ml fueron extraídas para marcar como tiempo cero y posteriormente se agregó la enzima α -amilasa pancreática continuando con la incubación, tomando alícuotas de 0.2 ml a los tiempos de 5, 15, 30 y 60 min. Las alícuotas se colocaron en tubos de ensayo y se les adicionó 0.8 ml de agua destilada y 1 ml de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Los tubos se trasladaron a un baño de agua en ebullición por 10 min. Posteriormente, se agregaron 15 ml de agua destilada y se homogenizó la mezcla. Se leyeron las absorbancias a 530 nm en paralelo con una curva patrón de maltosa. Posteriormente,

el porcentaje de hidrólisis fue calculado como porcentaje de maltosa liberada durante la reacción.

Una preparación de α -amilasa pancreática porcina (27 mg de proteína/ml, 1200 unidades/mg; Sigma-Aldrich) se diluyó 1:20 o 1:400 antes de la incubación. Las muestras tratadas térmicamente se diluyeron con agua destilada a 50 g/L. Cuarentay cinco mililitros de 0.05 mol/L Na, amortiguador de fosfatos (0.025 mol/L KH_2PO_4 y 0.025 mol/L $\text{K}_2(\text{HPO}_4)$ que contiene 0.4 g/L NaCl (pH 6.9) y 1.25 ml de preparación diluida de α -amilasa se agregaron a 10 ml de submuestra correspondiente a 500 mg de almidón.

Se tomaron muestras antes y después de una incubación de 5-60 min (bajo agitación suave a 37 °C) y se analizaron con ácido dinitrosalicílico para determinar el contenido de azúcar reductor. Se preparó una curva estándar usando maltosa.

El grado de hidrólisis (la proporción de almidón degradado a maltosa, o porcentaje de equivalentes de maltosa) se calculó como 100 mg de equivalentes de maltosa multiplicado por 0.95 dividido por mg de almidón en la muestra (Holm y col., 1988).

4.3. Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas entre los promedios de los factores experimentales se usó análisis de varianza de dos factores (two-way ANOVA). Para comparar los resultados contra los controles positivo y negativo, se utilizó el programa SigmaPlot, las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se reportaron como promedio \pm desviación estándar.

5. RESULTADOS

Los resultados que se muestran corresponden a las mezclas que presentaron las mejores propiedades con respecto al pan de amaranto sin sustitutos de gluten.

5.1 Volumen

En el Cuadro 2 se presenta el volumen de los panes, en donde se puede observar que al pan que obtuvo el mayor volumen es el pan de amaranto con la mezcla de sustitutos de gluten 4.2-0.8 (CH-X) con un valor de 136.50 ± 0.71 ml.

Cuadro 2. Volumen de pan de trigo, amaranto con y sin sustitutos de gluten.

MEZCLA	VOLUMEN (ml)
Trigo (C+)	123.33 ± 1.53^a
Amaranto (C-)	110.00 ± 0.00^b
Amaranto con CH-GX	
0-5	108.50 ± 0.71^b
0.2-4.8	112.33 ± 4.51^b
0.4-4.6	106.00 ± 3.00^b
0.5-4.5	104.00 ± 1.00^b
0.6-4.4	88.50 ± 2.12^c
3.6-1.4	104.00 ± 2.83^b
3.8-1.2	125.50 ± 2.12^a
4.0-1.0	133.00 ± 2.83^a
4.2-0.8	136.50 ± 0.71^c
4.4-0.6	132.00 ± 1.41^a
4.5-0.5	133.50 ± 2.12^a
4.6-0.4	124.33 ± 9.19^a
4.8-0.2	115.00 ± 9.90^{ab}
5.0-0	122.00 ± 1.41^{ab}

C+: Control positivo; C-:Control negativo, CH: Clara de huevo, GX: Goma xantana. Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p>0.05$), n=3.

De los resultados se puede observar que el volumen de los panes aumenta al utilizar la mezcla de los sustitutos de gluten en comparación a su uso de manera individual, sin embargo, este parámetro presenta valores más altos cuando la concentración de CH es mayor que la de GX.

El valor más bajo obtenido en este parámetro fue el pan libre de gluten (pan de amaranto) con un valor de 110.00 ± 0.00 ml.

Los panes con mayor proporción de goma xantana, presentaron resultados significativamente diferentes respecto al pan de amaranto; sin embargo, no presentaron diferencias significativas con el pan de trigo.

Los resultados muestran que después de alcanzar un volumen máximo, el aumento de la CH en la mezcla provoca una disminución en el volumen de los panes. Presentando valores sin diferencia significativa con el control negativo.

5.2 Análisis de imagen

Los parámetros de textura de miga (circularidad, solidez, segundo momento angular y entropía) de los diferentes panes elaborados se muestran en el Cuadro 3.

La circularidad no presenta diferencia significativa entre el pan de trigo y los panes de amaranto con sustitutos de gluten, sin embargo, el pan de amaranto sin sustitutos de gluten mostro el valor más bajo en este parámetro (0.63 ± 0.02).

De acuerdo con los resultados, la solidez no presenta diferencia significativa entre las muestras con valores entre 0.98 y 0.99. El segundo momento angular no mostró diferencia significativa con los panes con la mayor proporción de GX, mientras que los panes con mayor cantidad de CH no fueron significativamente diferentes respecto al pan de amaranto sin sustitutos.

El valor más alto de segundo momento angular lo obtuvo el pan de amaranto sin sustitutos de gluten (0.018 ± 0.010).

El pan que presentó la mayor entropía fue el elaborado con harina de trigo, mientras que el pan con menor entropía fue el pan de amaranto con una proporción 5:0 (p/p)

CH-GX, observándose que al aumentar la concentración de CH, la entropía de las muestras disminuye.

Cuadro 3. Parámetros de textura obtenidos mediante análisis de imagen.

MEZCLA	CIRCULARIDAD	SOLIDEZ	SEGUNDO MOMENTO ANGULAR	ENTROPIA (J/°C)
Trigo (C +)	0.83 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.01 ^a	0.0003 ± 0.00 ^a	9.23 ± 0.05 ^a
Amaranto (C-)	0.63 ± 0.02 ^b	0.98 ± 0.01 ^a	0.018 ± 0.010 ^b	8.03 ± 0.23 ^a
Amaranto con CH-GX				
0-5	0.73 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.02 ^a	0.002 ± 0.004 ^a	7.95 ± 0.11 ^{ab}
0.2-4.8	0.80 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.01 ^a	0.0003 ± 0.00 ^a	7.79 ± 0.12 ^{ab}
0.4-4.6	0.76 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.01 ^a	0.002 ± 0.004 ^a	7.81 ± 0.09 ^{ab}
0.5-4.5	0.77 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.01 ^a	0.007 ± 0.005 ^a	7.73 ± 0.11 ^c
0.6-4.4	0.88 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.01 ^a	0.0001 ± 0.00 ^a	8.47 ± 0.05 ^a
3.6-1.4	0.82 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.01 ^a	0.003 ± 0.002 ^a	7.82 ± 0.14 ^a
3.8-1.2	0.76 ± 0.03 ^a	0.98 ± 0.01 ^a	0.011 ± 0.003 ^a	7.55 ± 0.12 ^c
4.0-1.0	0.79 ± 0.01 ^a	0.98 ± 0.004 ^a	0.011 ± 0.003 ^a	7.41 ± 0.11 ^c
4.2-0.8	0.82 ± 0.01 ^a	0.98 ± 0.01 ^a	0.010 ± 0.002 ^a	7.66 ± 0.13 ^c
4.4-0.6	0.87 ± 0.02 ^a	0.99 ± 0.01 ^a	0.011 ± 0.002 ^a	7.34 ± 0.11 ^c
4.5-0.5	0.76 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.01 ^a	0.013 ± 0.003 ^b	7.10 ± 0.11 ^c
4.6-0.4	0.79 ± 0.01 ^a	0.98 ± 0.01 ^a	0.014 ± 0.004 ^b	7.61 ± 0.04 ^c
4.8-0.2	0.74 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.004 ^a	0.015 ± 0.004 ^b	7.35 ± 0.01 ^c
5-0	0.88 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.004 ^c	0.052 ± 0.016 ^b	7.21 ± 0.16 ^b

C+: Control positivo; C-:Control negativo, CH: Clara de huevo, GX: Goma xantana. Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p > 0.05$)

5.3 Modelo de optimización

El modelo estadístico utilizado para observar el efecto de los componentes sobre la respuesta, fue el diseño experimental por mezclas simplex reticular (q, m).

Este modelo considera q componentes y permite ajustar un modelo estadístico de orden (m); lo cual consiste en todas las posibles combinaciones de componentes o mezclas que se puedan formar al considerar que las proporciones puedan tomar los (m + 1) valores entre cero y uno.

Una primera aproximación fue ajustada con un modelo de primer orden (Ecuación 6).

$$E(y) = \sum_{i=1}^{q-1} \beta_i x_i \quad (6)$$

Donde β_i es la constante calculada por el modelo de optimización y x_i son los componentes bajo las cuales fue realizada la mezcla.

Además, se ajustó el modelo bajo un modelo cuadrático incorporando restricciones $x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$, utilizando los componentes de goma xantana y clara de huevo (Ecuación 7).

$$E(y) = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum_{j=2}^q \beta_{ij} x_i x_j \quad (7)$$

Donde β_{ij} representa la constante de interacción de los valores de x_i y x_j .

En la Figura (1) se muestra la gráfica de optimización de concentración de sustitutos de gluten, cuyo modelo presentó un valor de r^2 de 0.9.

En la gráfica de optimización se ven líneas rojas las cuales representan la mezcla actual, mientras que las líneas azules representan los valores a nivelar.

Los parámetros a la izquierda de la gráfica son aquellos que mostraron diferencia significativa (entropía, volumen, segundo momento angular) en las muestras de pan evaluadas, tanto con sustitutos de gluten como en panes sin sustitutos.

De esta manera se obtuvieron tres concentraciones de aditivos, óptimas para obtener un pan libre de gluten con propiedades físicas y de textura similares a un pan de trigo. Estas concentraciones en porcentaje base panadera son: 2.32:2.68, 3.03:1.97, 5:0 CH:GX respectivamente.

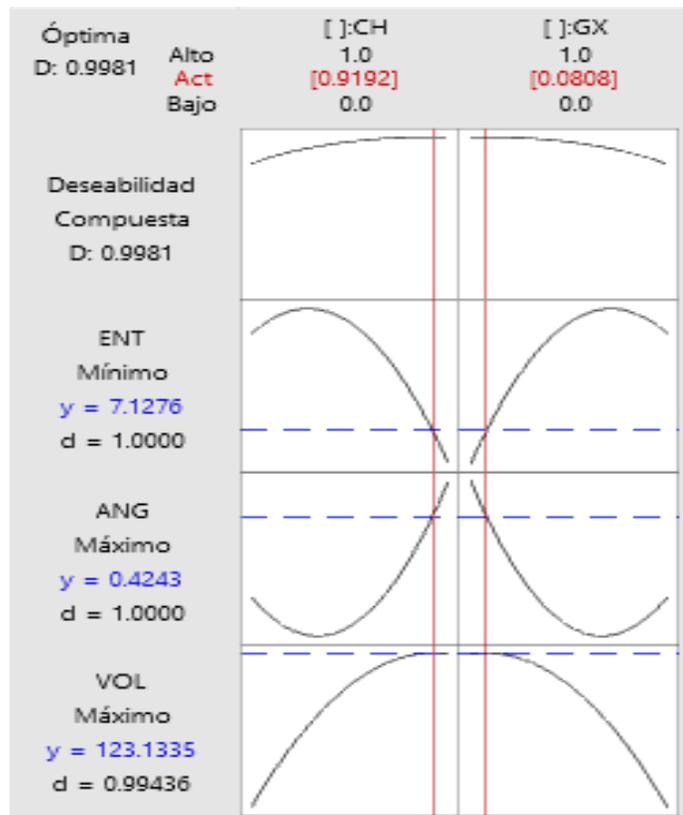


Figura 1. Modelo de optimización para el pan de amaranto con sustitutos de gluten.
Ent: entropía, Ang: segundo momento angular, Vol: volumen

En la Figura (2) se puede observar el efecto de los sustitutos de gluten en las propiedades de volumen, entropía, segundo momento angular y circularidad del pan.

Se puede observar que entre mayor sea la concentración de clara de huevo, se obtienen volúmenes mayores (Figura 2A).

Sin embargo, la entropía presenta un punto máximo en la sustitución 0.6:4.4 (CH:GX) lo cual se puede observar en la Figura 2B. Este mismo comportamiento se observa para circularidad (Figura 2C), solidez (Figura 2D) y segundo momento angular (Figura 2E), no obstante, no existe diferencia significativa en la solidez.

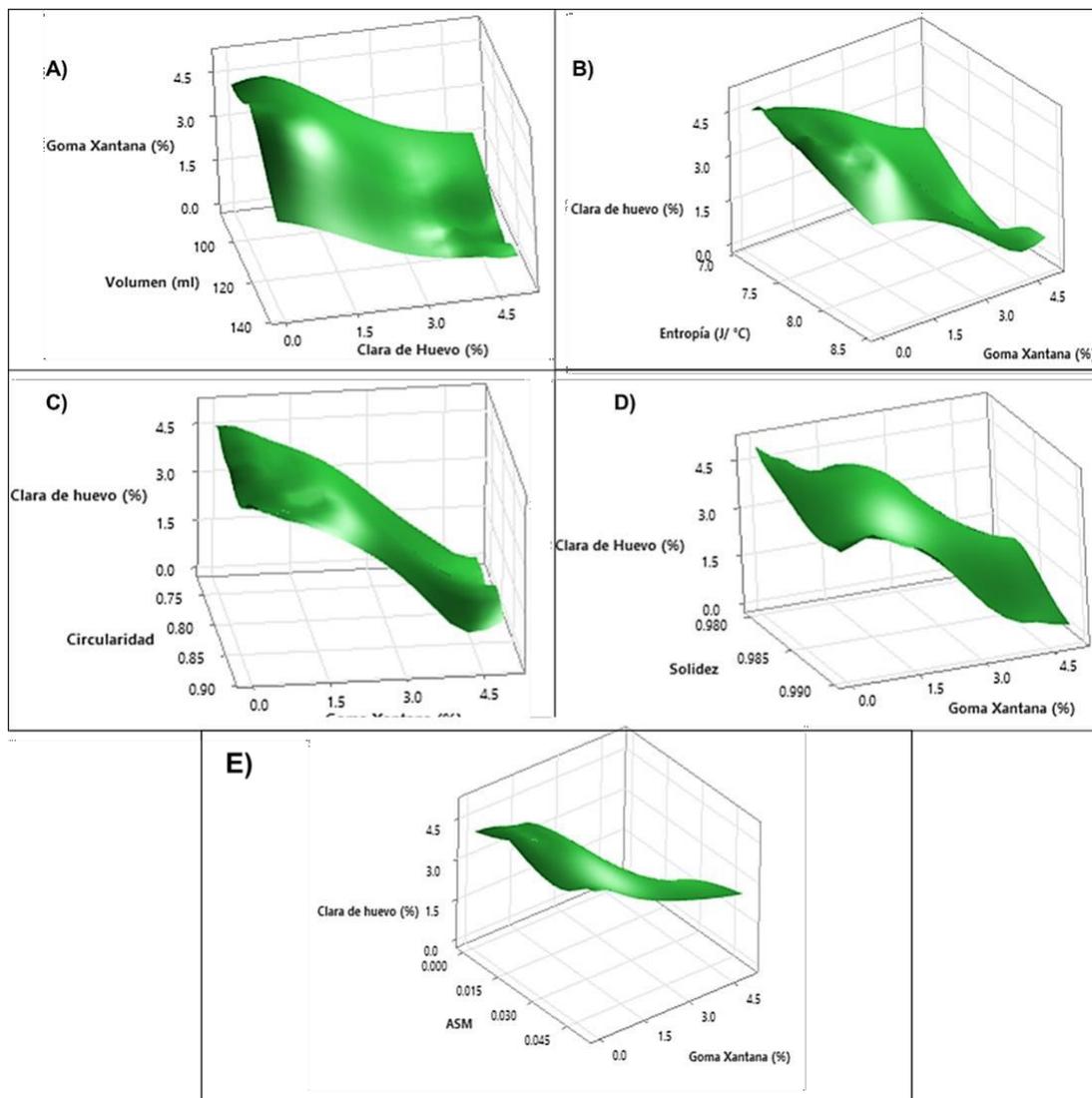


Figura 2. Superficie de respuesta de las muestras de pan de amaranto con sustitutos de gluten. A) Volumen; B) Entropía; C) Circularidad; D) Solidez; E) Segundo momento Angular

Es importante establecer los porcentajes de sustitutos de gluten que se utilizarán para obtener un pan con las mejores propiedades.

Es por lo anterior que, a partir de los resultados obtenidos, los modelos de predicción en base al porcentaje de sustitución de clara de huevo (x1) y goma xantana (x2), se presentan en las Ecuaciones (8) a (12).

$$\text{Volumen} = 25.786x_1 + 20.617x_2 - 0.244x_1x_2 \quad (8)$$

$$\text{Entropía} = 1.437x_1 + 1.579x_2 - 0.0628x_1x_2 \quad (9)$$

$$\text{Circularidad} = 0.161x_1 + 0.156x_2 + 0.0018x_1x_2 \quad (10)$$

$$\text{Solidez} = 0.196x_1 + 0.197x_2 + 0.00128x_1x_2 \quad (11)$$

$$\text{Segundo momento angular} = 0.00618x_1 + 0.000142x_2 - 0.000436x_1x_2 \quad (12)$$

Estas ecuaciones permitirán de acuerdo con las propiedades deseadas establecer los porcentajes de sustitución.

Cabe destacar que estos modelos sólo son aplicables para el rango de 0 a 5% de sustitución, sería necesario realizar un diseño de mezclas diferente, así como otro método estadístico para poder obtener un modelo que prediga la calidad del pan fuera del porcentaje de sustitución estudiado.

5.4 Validación del modelo de optimización

Del modelo de optimización se obtuvieron 3 concentraciones de CH:GX de acuerdo a los parámetros a optimizar (2.32:2.68; 3.03:1.97; 5:0 CH-GX p/p). Se puede observar que con estas mezclas, el pan de amaranto con sustitutos de gluten presentó circularidad similar a la del pan de trigo, sin embargo, la mezcla de sustitutos de gluten 5:0 p/p (CH:GX) obtuvo el mayor valor (0.88 ± 0.01).

En el parámetro de solidez no se observan diferencias significativas entre las muestras. El pan de trigo mostró la mayor entropía ($9.23 \pm 0.05 \text{ J } ^\circ\text{C}^{-1}$), mientras que las muestras con sustitutos de gluten mostraron los valores más bajos de entropía.

El volumen del pan de amaranto aumentó al adicionar los sustitutos de gluten, presentando el valor más alto el pan de amaranto con CH como sustituto de gluten ($128.0 \pm 2.00 \text{ ml}$).

Cuadro 4. Validación del modelo de optimización.

MEZCLA	CIRCULARIDAD	SOLIDEZ	SEGUNDO MOMENTO ANGULAR (kg.m ² /s)	ENTROPÍA (J/°C)	VOLUMEN (ml)
Trigo (C+)	0.83 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.01 ^a	0.0003 ± 0.00 ^a	9.23 ± 0.05 ^a	123.33 ± 1.53 ^a
Amaranto (C-)	0.63 ± 0.02 ^b	0.98 ± 0.01 ^a	0.018 ± 0.010 ^b	8.03 ± 0.23 ^b	110.00 ± 0.00 ^b
Amaranto con CH-GX					
2.32-2.68	0.81 ± 0.015 ^a	0.98 ± 0.006 ^a	0.040 ± 0.004 ^b	7.43 ± 0.09 ^c	116.0 ± 0.00 ^b
3.03-1.97	0.82 ± 0.018 ^a	0.99 ± 0.006 ^a	0.036 ± 0.011 ^b	7.45 ± 0.14 ^c	111.67 ± 1.53 ^b
5-0	0.88 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.004 ^a	0.052 ± 0.016 ^b	7.21 ± 0.16 ^c	128.0 ± 2.00 ^c

C+: Control positivo; C-:Control negativo, CH: Clara de huevo, GX: Goma xantana. Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p > 0.05$)

5.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la Figura (3) se presentan las micrografías obtenidas de las muestras de pan de trigo y amaranto con las proporciones óptimas de CH:GX. En la Figura (3 A) se observa la microestructura del pan de trigo donde se observan estructuras circulares las cuales son representativas del almidón mientras que en el pan de amaranto (Figura 3 B) se observan estructuras irregulares, pero con una mayor cristalinidad.

El pan de harina de trigo se observa una estructura lisa y con forma esférica, mientras que en el pan de amaranto sin aditivos se observan relieves y picos en su estructura.

Al adicionar los sustitutos de gluten a los panes elaborados a partir de harina de amaranto, se encuentra una estructura más parecida a la del control positivo (Figuras 3 C y 3 D), sobre todo el pan con concentración optimizada CH-GX (5:0) (Figura 3 E), aunque aún presenta formas irregulares (como el control negativo).

La Figura 3 (C, D y E) muestra cómo los sustitutos de gluten (goma xantana y clara de huevo) modifican la estructura del pan de amaranto mostrando una superficie más lisa y regular que el pan de amaranto sin adicionarle sustitutos.

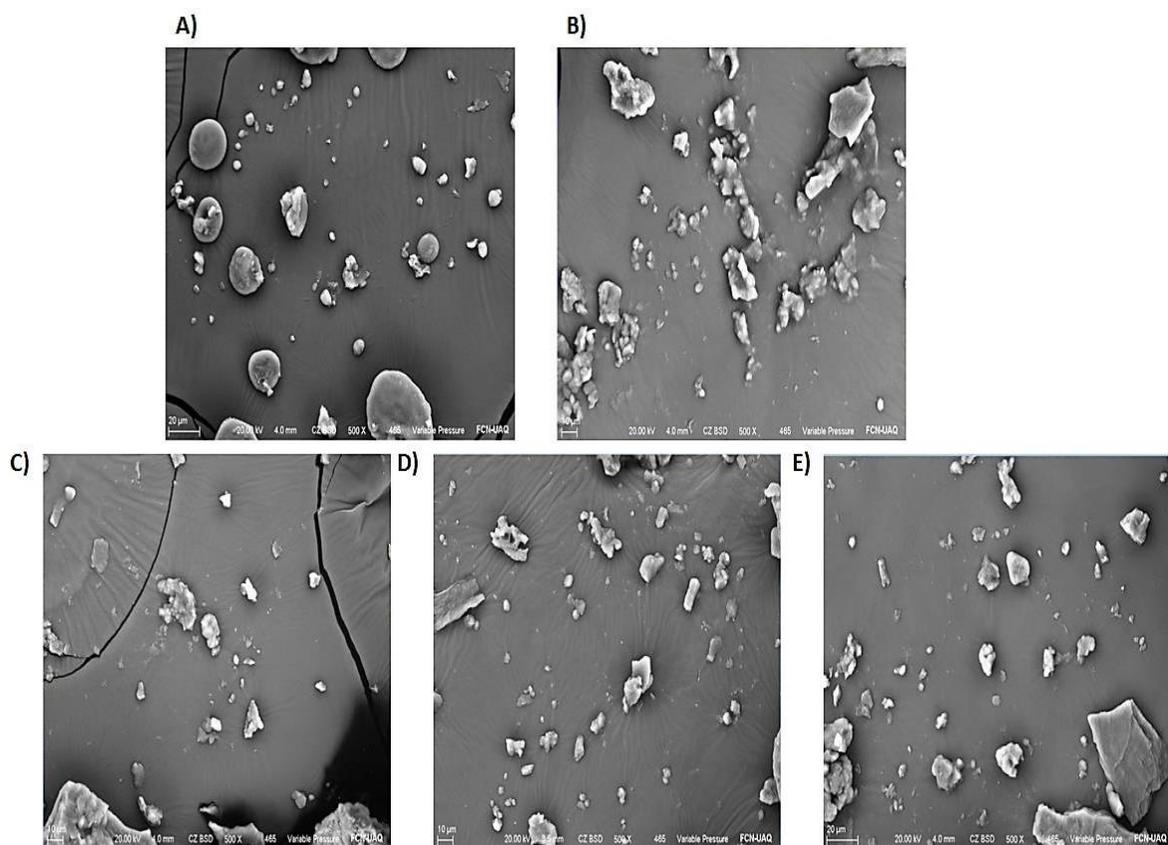


Figura 3 Microestructura de la miga de pan de trigo y amaranto con y sin sustitutos de gluten (SEM 500X, 20 000 kV). A) pan de trigo, B) pan de amaranto, C) pan de amaranto CH-GX (2.32:2.68), D) pan de amaranto CH-GX (3.03:1.97), E) pan de amaranto CH-GX (5:0). CH: Clara de huevo, GX: Goma xantana

5.6 Digestibilidad del almidón (*in vitro*)

El Cuadro 5 muestra los datos resultantes de la hidrólisis del almidón de los diferentes panes elaborados, para ello se determinó la concentración de maltosa liberada. Se puede observar que el que presenta una mayor concentración maltosa es el pan de trigo a los 60 min (1.364 ± 0.010 mg/ml).

La hidrólisis de los panes elaborados con sustitutos de gluten CH-GX (2.32-2.68 y 3.03-1.97) son los que presentaron una menor concentración de maltosa, mientras que el pan de amaranto sin sustitutos de gluten y el pan con 5% de CH presentaron concentraciones similares durante todo el proceso de hidrólisis.

Cuadro 5. Digestibilidad *in vitro* del almidón de las diferentes formulaciones y concentración de maltosa..

Tiempo (min)	Maltosa (mg/ml)				
	Trigo (C+)	Amaranto (C-)	2.32-2.68 (CH-GX)	3.03-1.97 (CH-GX)	5-0(CH-GX)
0	0.060 ± 0.001 ^a	0.059 ± 0.005 ^a	0.054 ± 0.007 ^a	0.050 ± 0.001 ^a	0.052 ± 0.003 ^a
5	0.097 ± 0.014 ^b	0.048 ± 0.003 ^a	0.055 ± 0.002 ^a	0.072 ± 0.030 ^b	0.051 ± 0.001 ^a
15	0.110 ± 0.005 ^c	0.049 ± 0.005 ^a	0.066 ± 0.003 ^b	0.075 ± 0.002 ^b	0.060 ± 0.002 ^b
30	0.133 ± 0.005 ^d	0.104 ± 0.010 ^b	0.065 ± 0.005 ^b	0.072 ± 0.001 ^b	0.077 ± 0.002 ^c
60	1.364 ± 0.010 ^e	0.180 ± 0.008 ^c	0.088 ± 0.005 ^c	0.075 ± 0.004 ^b	0.100 ± 0.002 ^d

C+: Control positivo; C-:Control negativo, CH: Clara de huevo, GX: Goma xantana. Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p>0.05$)

6. DISCUSIÓN

6.1 Volumen

El pan de amaranto presenta un volumen menor en comparación al pan de trigo, esto se debe a que el amaranto es un cereal naturalmente libre de gluten. El gluten es el componente que se encarga de aportar elasticidad y fuerza a las masas, estas propiedades afectan directamente al volumen específico del pan.

Si la masa presenta alta elasticidad y fuerza, mayor será la capacidad de retención de CO₂ y por lo tanto se obtendrán panes con volúmenes mayores. El trigo al poseer alrededor de 30 a 36% de gluten permite obtener panes de volúmenes altos (Kaushik y col., 2015; Yeşil y Levent, 2022).

La adición de los sustitutos de gluten generó panes de volumen específico mayor que el obtenido en el pan de trigo. Esto se puede atribuir que la clara de huevo actúa como un tensoactivo que permite obtener masas viscoelásticas cohesivas fuertes permitiendo una mayor retención de CO₂ y por lo tanto mayor volumen (Han y col., 2018).

La goma xantana también mostró buena capacidad para aumentar la retención de CO₂, ya que permite la formación de masas viscosas y estables en rangos amplios de pH y temperatura (Preichardt y col., 2011; Benkadri y col., 2020).

A pesar de que la adición de GX aumenta el volumen del pan, se puede observar que el efecto de la adición de esta goma es menor que el de la clara de huevo.

6.2 Análisis de imagen

La circularidad es parámetro que nos indica lo circulares que son los poros de la miga del pan (Scheuer y col., 2015). Los resultados obtenidos demuestran que el adicionar sustitutos de gluten en el pan de amaranto aumenta la circularidad de los poros.

Sin embargo, no presentan diferencia significativa en este parámetro la proporción y el tipo de sustituto utilizado. La solidez es un parámetro que permite determinar si un objeto es sólido o si presenta una forma irregular; si el valor de solidez es cercano a uno, indica que el objeto es sólido (Onipe y col., 2020).

De acuerdo a los valores obtenidos en todas las muestras, se tienen migas sólidas y compactas, por lo que la porosidad de los panes es baja, este es un factor importante ya que es un indicador de la calidad de productos de panificación e influye directamente en la estructura, digestibilidad y volumen del pan (Petrusha y col., 2017).

Los parámetros de segundo momento angular y entropía son indicadores de homogeneidad, entre mayor segundo momento angular y menor entropía se tenga, más homogénea es la muestra (Guo y col., 2022).

Se puede observar que la adición de los sustitutos de gluten provocaron que el valor de entropía disminuyera, una causa podría ser la capacidad que tiene la GX para promover una distribución homogénea del agua, así como la generación de la estabilidad de finas celdas de aire, produciendo panes más suaves con cortezas más gruesas (Habibi y Khosravi-Darani, 2017; Tebben y col., 2018).

La adición de la CH también disminuyó la entropía de la miga de las muestras, esta al igual que la GX mejora la estructura de la miga, debido a que disminuye el tamaño de las celdas de gas (Han y col., 2019).

6.3 Modelo de optimización

El modelo de optimización realizado fue de deseabilidad compuesta, ya que ésta permite obtener los valores establecidos como deseables a partir de la combinación de todas las variables.

Un valor de deseabilidad de 1 indica que se obtuvieron los valores deseados, en este caso el valor obtenido en el modelo fue de 0.998, el cual indica que se obtuvieron resultados muy semejantes a los deseados (Levy, 2012).

El valor de deseabilidad individual también se representa en el modelo, en el cual se puede observar que el momento angular y la entropía tienen el valor de 1, mientras que el de volumen es de 0.99.

Las formulaciones obtenidas a partir del modelo solo representan la formalización matemática generada a partir de datos empíricos (Ostwald, 2020), es por ello que es

necesario realizar la validación del modelo, la cual consiste en realizar y evaluar los panes cuya formulación se obtuvo del modelo de validación.

Los valores obtenidos de estas formulaciones presentaron mejores propiedades que los evaluados en el diseño de mezclas, la formulación 5-0 CH-GX. El pan 5-0 CH-GX es el que presentó mayor volumen, menor entropía, mayor segundo momento angular y circularidad.

6.4 Microscopía electrónica de barrido

La modificación de la estructura del pan de amaranto cuando se añaden los sustitutos de gluten (GX y CH) se atribuye a que al agregar goma xantana se promueven las propiedades de textura aumentando la capacidad de absorción de agua, estabilidad de la masa y resistencia a la extensión y extensibilidad, de acuerdo con estudios farinográficos realizados por Vázquez-Chávez (2022).

Por otro lado, la clara de huevo, llevada a punto de nieve o turrón, se forma al batir las claras hasta que se forme espuma, con ello las proteínas son atrapadas junto con el aire, ocasionando que aumente su volumen y estabilidad del pan y la miga (Koppmann, 2012).

La Figura (2) muestra que en los panes que llevan amaranto las estructuras de almidón se perdieron, esto puede ser consecuencia de la degradación de la amilasa, porque no se presentó la red de gluten (Mtelisi-Dube y col., 2020).

6.5 Digestibilidad del almidón

El Cuadro 5 muestra los resultados de la digestión del almidón, mediante la medición de maltosa liberada durante la hidrólisis.

De acuerdo con el Cuadro (5), el almidón del trigo se digirió de manera rápida y constante, al liberar 1.36 mg/ml de maltosa en el transcurso de 60 minutos.

De acuerdo con Miranda y Molina (2015), una mayor rapidez de liberación de maltosa implica que se tiene un almidón de rápida digestión.

Por otro lado, el pan de amaranto sin sustitutos de gluten tiene una liberación de maltosa de 0.18 mg/ml en el mismo tiempo.

Esto demuestra que la digestión del almidón proveniente del pan de amaranto es lenta o resistente, ya que está comprobado que puede presentar hasta 0.5% de almidón resistente en sus semillas (Huamanchumo-Prado y col., 2020).

Finalmente, los panes de amaranto con sustitutos de gluten analizados tuvieron un comportamiento similar entre ellos, sugiriendo que los sustitutos de gluten que se agregan ocasionan cambios en la digestibilidad del gluten, ya que la liberación de maltosa fue más rápida que el control negativo, pero menor que el control positivo.

7. CONCLUSIONES

Este estudio desarrolló y aplicó con éxito una metodología para la optimización de tres concentraciones de aditivos para la producción de pan de amaranto libre de gluten. Esto se obtuvo partiendo de un diseño experimental, análisis de imagen y evaluación de los resultados usando programas estadísticos. Mediante un proceso de optimización de mezclas, se concluyó que es posible determinar las concentraciones óptimas de sustitutos de gluten para la producción de pan de amaranto cuyos factores físicos fueran similares a los de un pan de trigo.

8. REFERENCIAS

- AACC** Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 10-05.01. Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement **1985**. Cereals & Grains Association, St. Paul, MN, U.S.A.
- Arzate-Vázquez I**, Chanona-Pérez JJ, Calderón-Domínguez G, Terres-Rojas E, Garibay-Febles V, Martínez-Rivas A, Gutiérrez-López GF. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydr Polym*, **2012**;87:289-299.
- Bedolla S**, Duenas C, Esquivel I, Favela T, Guerrero R, Mendoza E, Navarrete A, Olguín LE, Ortíz J, Pacheco O, Quiroz M, Ramírez A, Trujillo M. Introducción a la Tecnología de Alimentos. Academia del Area de Plantas Piloto de Alimentos. 2a. edición. México: Editorial Limusa, **2004**.
- Benkadri, S.**, Salvador, A., Sanz, T., & Nasreddine Zidoune, M. Optimization of Xanthan and Locust Bean Gum in a Gluten-Free Infant Biscuit Based on Rice-Chickpea Flour Using Response Surface Methodology. *Foods*, **2020**;10:1-12.
- Biesiekierski JR**. What is gluten? *J Gastroen Hepatol* **2017**;32;78-81.
- Butterworth J**, Los L. Coeliac disease. *Medicine* **2019**;47;314-319.
- Cajas JE**, González LC, Loubes MA, Tolaba MP. Optimization of rice bread formulation by mixture design and relationship of bread quality to flour and dough attributes. *LWT-Food Sci Technol* **2019**;113.
- Caputo L**, Visconti A, De Angelis M. Selection and use of a *Saccharomyces cerevisiae* strain to reduce phytate content of wholemeal flour during bread-making or under simulated gastrointestinal conditions. *Food Sci Technol-LEB*. **2015**;63:400-407.
- Cárdenas-Hernández A**, Beta T, Loarca-Piña, GF, Castaño-Tostado E, Nieto-Barrera JO, Mendoza S. Improved functional properties of pasta: enrichment with amaranth seed flour and dried amaranth leaves. *J Cereal Sci*. **2016**;72:84-90.
- Cardoso RVC**, Fernandes Â, Heleno SA, Rodrigues P, González-Paramás AM, Barros L, Ferreira ICFR. Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chem* **2019**;280:123-129.
- Corral ML**, Cerrutti P, Vázquez A, Califano A. Bacterial nanocellulose as a potential additive for wheat bread. *Food Hydrocolloid* **2017**;67:189-196.

- Craheix D**, Bergez JE, Angevin F, Bockstaller C, Bohanec M, Colomb B, Doré T, Fortino G, Guichard L, Pelzer E, Méssean A, Reau R, Sadok W. Guidelines to design models assessing agricultural sustainability, based upon feedbacks from the DEXi decision support system. *Agron Sustain Dev* **2015**;35:1431-1447.
- Crucean D**, Debucquet G, Rannoua C, le-Bailac A, le-Bailbc P. Vitamin B4 as a salt substitute in bread: A challenging and successful new strategy. Sensory perception and acceptability by French consumers. *Appetite* **2019**;134:17-25.
- De Vuyst L**, Van Kerrebroeck S, Leroy F. Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. *Adv Appl Microbiol* **2017**;100:58-64.
- Dewettinck K**, Van Bockstaele F, Kühne B, Van de Walle D, Courtens TM, Gellynck X. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *J Cereal Sci* **2008**;48(2):243–257.
- Drabińska N**, Krupa-Kozak U. Calcium in Gluten-Free Life: Health-Related and Nutritional Implications. *Foods*, **2016**;5(4), 2-11.
- Ekechukwu OV**, Madu AC, Nwanya SC, Agunwamba JC. Optimization of energy and manpower requirements in Nigerian bakeries. *Energ Convers Manage* **2011**;52:564-568.
- Encina-Zelada CR**, Cadaveza V, Monteiro F, Teixeira JA, Gonzales-Barron U. Combined effect of xanthan gum and water content on physicochemical and textural properties of gluten-free batter and bread. *Food Res Int* **2018**;111:554-555
- Ficco DBM**, Saia S, Beleggia R, Fragasso M, Giovanniello V, De Vita P. Milling overrides cultivar, leavening agent and baking mode on chemical and rheological traits and sensory perception of durum wheat breads. *Sci Rep-UK* **2017**;7:1-13.
- González AM**. ImageJ: una herramienta indispensable para medir el mundo biológico. *Sociedad Argentina de Botánica; Folium* **2018**,9:1-17
- Guo L**, Wang W, Zhong L, Guo L, Zhang F, y Guo Y. Texture analysis of the microstructure of internal curing concrete based on image recognition technology. *Case Stud Constr Mater*, **2022**;17:136-142.
- Habibi H y Khosravi-Darani K**. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. *Biocatal Agric Biotechnol*, **2017**;10:130-140.
- Hager AS**, Arendt EK. Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum

- and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. *Food Hydrocolloid* **2013**;32:195-203.
- Han A**, Romero Hollman MM, Nishijima N, Ichimura T, Handa A, Xu C, Zhang Yue. Effect of egg white solids on the rheological properties and bread making performance of gluten-free batter. *Food Hydrocolloids*, **2018**;87:287-296.
- Han W**, Ma S, Li L, Zheng X, Wang X. Gluten aggregation behavior in gluten and gluten-starch doughs after wheat bran dietary fiber addition. *LWT- Food Sci Technol* **2019**;106:1-6.
- Hernández-Carrión M**, Hernando I, Sotelo-Díaz I, Quintanilla-Carvajal MX, Quiles A. Use of image analysis to evaluate the effect of high hydrostatic pressure and pasteurization as preservation treatments on the microstructure of red sweet pepper. *Innovative Food Sci Emerg Technol*, **2015**;27:69-78.
- Hecker FT**, Hussein WB, Paquet-Durand O, Hussein MA, Becker T. A case study on using evolutionary algorithms to optimize bakery production planning. *Expert Syst Appl* **2013**;40:6837-6847.
- Holm J**, Lundquist I, Björck I, Eliasson AC, Asp NG. Degree of starch gelatinization, digestion rate of starch in vitro, and metabolic response in rats. *Am J Clin Nutr.* **1988**;47:1010-1016.
- Huamanchumo-Prado WJ**, Martín-Esparza ME, Albors-Sorolla AM. Pseudocereales andinos: valor nutritivo y aplicaciones para alimentos libres de gluten. *Universitat Politècnica de València, IIAD*, **2020**:1-28
- Inglett GE**, Chen D, Liu SX. Physical properties of gluten-free sugar cookies made from amaranth-oat composites. *LWT-Food Sci Technol.* **2015**;63:214-220.
- Ireti A**, Omeiza A, Oluwasegun K, Adeyemi I, Adewale O, Gnozi E. Comparison of Imagej Analysis of Structure of Two Constructional Steel. *Am J Eng App Sci*, **2018**;11:318-326.
- Kaushik R**, Kumar N, Sihag MK, Ray A. Isolation, characterization of wheat gluten and its regeneration properties. *J Food Sci Technol*, **2015**;52(9):5930-5937.
- Koppmann M**. El huevo: un abanico de aplicaciones culinarias. *Ciencia hoy* **2012**;22(128):53-55.

- Levy R.** Probabilistic Models in the Study of Language draft, November 6, 2012
Capítulo: 6 Generalized Linear Models pp 107-172
- Ludvigsson JF, Murray JA.** Epidemiology of celiac disease. *Gastroenterol Clin N* **2018**;1-18.
- Madoumier M, Trystram G, Sébastien P, Collignan A.** Towards a holistic approach for multi-objective optimization of food processes: A critical review. *Trends Food Sci Tech* **2019**;86:1-15.
- Menzies T, Kocagüneli E, Minku L, Peters F, Turhan B.** Chapter 24. Using goals in model-based reasoning. En: *ACM/IEEE International Conference on Model Driven Engineering Languages and Systems*. Menzies T, Kocaguneli E, Minku LL, Peters F, Turhan B (Eds.). Elsevier **2015**:321-353.
- Mesas JM, Alegre MT.** El pan y su proceso de elaboración. *Cienc Tecnol Aliment* **2002**;3(5):307-313
- Mir SA, Shah MA, Naik HR, Zargar IA.** Influence of hydrocolloids on dough handling and technological properties of glutenfree breads. *Trends Food Sci Tech* **2016**;51:49-57.
- Miranda B, Molina ME.** Evaluación de factores que pueden influir en el proceso de sacarificación-fermentación simultáneas para la producción de etanol a partir de materiales amiláceos. *Rev UCR* **2015**.
- Mondal A, Datta AK.** Bread Baking—A Review. *J Food Eng* **2008**;86:465-476.
- Monteau JY, Purlis E, Besbes E, Jury V, Le-Bail A.** Water transfer in bread during staling: Physical phenomena and modelling. *J Food Eng* **2017**;211:95-103.
- Mtelisi-Dube N, Xu F, Zhao R.** The efficacy of sorghum flour addition on dough rheological properties and bread quality: A short review. *Grain Oil Sci Technol*, **2020**;3(4):164-171.
- Naqash F, Gani A, Gani A, Masoodi FA.** Gluten-free baking: Combating the challenges - A review. *Trends Food Sci Tech* **2017**;66:98–107.
- Nugent AP.** Health Properties of Resistant Starch- A review. *Br Nutr Found* **2005**;30:27-54.
- Onipe OO, Beswa D, Jideani AIO.** Confocal Laser Scanning Microscopy and Image Analysis for Elucidating Crumb and Crust Microstructure of Bran-Enriched South African Fried Dough and Batter. *Foods*, **2020**;9:1-22

- Ostwald** The General Linear Model 20/21 Dirk Ostwald CC BY-NC-SA 4.. Probab
modell, **2020**
- Packkia-Doss** PP, Chevallier S, Pare A, Le-Bail A. Effect of supplementation of wheat
bran on dough aeration and final bread volume. J Food Eng **2019**;252:28-35.
- Papadimitriou** K, Zoumpopoulou G, Georgalaki M, Alexandraki V, Kazou M, Anastasiou
R, Tsakalidou E. Chapter 6 - Sourdough Bread. Innovations in Traditional Foods
2019:127-158.
- Pareyt** B, Finnie SM, Putseys JA, Delcour JA. Lipids in bread making: sources,
interactions and impact on bread quality. J Cereal Sci **2011**;54:266-279.
- Payahuanca-Mamani** I, Matos-Chamorro A. La formación de la masa, la fermentación
y los métodos de proceso en la elaboración del pan. UPeU: Lima; **2011**.
- Pérez-Nieto** A, Chanona-Pérez JJ, Farrera-Rebollo RR, Gutiérrez-López GF, Alamilla-
Beltrán L, Calderón-Domínguez G. Image analysis of structural changes in dough
during baking. LWT - Food Sci Technol, **2010**;43(3):535-543.
- Petrusha** O, Daschynska O, Shulika A. Development of the measurement method of
porosity of bakery products by analysis of digital image. Technol Audit Prod Reserves,
2017;2:61-66.
- Phongthai** S, D'Amico S, Schoenlechner R, Rawdkuen S. Comparative study of rice
bran protein concentrate and egg albumin on gluten-free bread properties. J Cereal
Sci **2016**;72:38-45.
- Pico** J, Bernal J, Gómez M. Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A
review. Food Res Int **2015**;75:200-215.
- Preichardt** LD, Vendruscolo CT, Gularte MA y Moreira A.d.S. The role of xanthan gum
in the quality of gluten free cakes: improved bakery products for coeliac patients. Int
J Food Sci Technol, **2011**;46:2591-2597.
- Scheuer** PM, Ferreira JAS, Mattioni B, Zavariz de Miranda M, de Francisco A.
Optimization of image analysis techniques for quality assessment of whole-wheat
breads made with fat replacer, Food Sci Technol Campinas, **2015**;35(1):133-142
- Silow** C, Axel C, Zannini E, Arendt EK. Current status of salt reduction in bread and
bakery products- A review. J Cereal Sci **2016**;72:135-145.

- Tamsen** M, Shekarchizadeh H, Soltanizadeh N. Evaluation of wheat flour substitution with amaranth flour on chicken nugget properties. *LWT-Food Sci Technol* **2018**;91:580-587.
- Tebben** L, Shen Y, Li Y. Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends Food Sci Tech* **2018**;81:10-24.
- Tortora** G, Case CL, Funke BR. *Microbiology: an introduction*. 9a. edición. New York: Cram101 Textbook Reviews, **2017**.
- Vázquez-Chávez** L. Efecto de goma xantana en masas de trigo. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, **2022**
- Villarroel** P, Gómez C, Vera C, Torres J. Almidón resistente: Características tecnológicas e interés fisiológicos. *Rev Chil Nutr* **2018**;45(3):271-278.
- Waites** MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higton G. *Microbiology: an introduction*. USA: John Wiley & Sons, **2009**.
- Xu** J, Wang W, Li Y. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. *J Func Foods* **2019**;52:629-639.
- Yeşil** S y Levent H. The influence of fermented buckwheat, quinoa and amaranth flour on gluten-free bread quality. *LWT*, **2022**;160:113-301.
- Zhu** F. Influence of ingredients and chemical components on the quality of Chinese steamed bread. *Food Chem* **2014**;163:154-162.
- Zubair** AR, Alo OA. Grey level co-occurrence matrix (GLCM) based second order statistics for image texture analysis. *Int J Sci Eng Investig* **2019**;8(93):64-73.